

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**

**GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y AGROAMBIENTAL**



**“Efecto de la inclusión en el pienso de un postbiótico  
basado en bacterias ácido-lácticas sobre la calidad  
espermática de dos líneas de conejo seleccionadas por  
variabilidad ambiental del tamaño de camada”**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Julio-2025**

Autor: Juan Galvez Lorente

Tutora: María de la Luz García Pardo

Cotutor: Daniel Serrano Jara



## Resumen

Este estudio evaluó el impacto del consumo de postbióticos derivados de bacterias ácido lácticas sobre la calidad seminal en conejos machos reproductores de dos líneas genéticas seleccionadas divergentemente por variabilidad ambiental del tamaño de camada (líneas Low y High). Para la evaluación espermática se utilizó el sistema CASA. Los resultados mostraron que, aunque el volumen del eyaculado no se vio afectado, sí se observó una disminución en la motilidad total y el porcentaje de medios progresivos, junto a un incremento en la proporción de espermatozoides inmóviles. Asimismo se registró una bajada en la concentración espermática y en la producción total de espermatozoides, especialmente en la línea genética High. La reducción de la motilidad y concentración inducidas por el postbiótico, presentan una interacción ligeramente diferente en cada línea, que podría estar relacionada con variaciones en la microbiota asociada a cada línea genética.

**Palabras clave:** *Postbiótico, Motilidad espermática, Calidad seminal, CASA, Conejo.*

## Abstract

This study evaluated the impact of the consumption of postbiotics derived from lactic acid bacteria on semen quality in male breeding rabbits from two genetic lines divergently selected for environmental variability in litter size, Low and High. The CASA system was used for the analysis. The results showed that although ejaculate volume was not affected, there was a decrease in total motility and the percentage of progressive sperm, along with an increase in the proportion of immotile spermatozoa. A reduction in sperm concentration and total sperm production was also recorded, especially in the High genetic line. The reduction in motility and concentration induced by the postbiotic shows a slightly different interaction in each line, which could be related to variations in the microbiota associated with each genetic line.

**Keywords:** *Postbiotic, Sperm motility, Semen quality, CASA, Rabbit.*

# Índice

|                                                                                                                                                                                                                                                 |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE.....</b>                                                                                                                                                                                               | <b>0</b>  |
| <b>“Efecto de la inclusión en el pienso de un postbiótico basado en bacterias<br/>ácido-lácticas sobre la calidad espermática de dos líneas de conejo<br/>seleccionadas por variabilidad ambiental del tamaño de camada” .....</b>              | <b>0</b>  |
| <b>Resumen.....</b>                                                                                                                                                                                                                             | <b>2</b>  |
| <b>Abstract.....</b>                                                                                                                                                                                                                            | <b>2</b>  |
| <b>1. Introducción.....</b>                                                                                                                                                                                                                     | <b>6</b>  |
| 1.1 Situación internacional en el sector cunícola.....                                                                                                                                                                                          | 6         |
| 1.2 Situación en el sector cunícola a nivel nacional.....                                                                                                                                                                                       | 7         |
| 1.3 El uso de aditivos derivados de microorganismos en la alimentación.....                                                                                                                                                                     | 8         |
| 1.4 Factores vía hembra que influyen en la inseminación artificial.....                                                                                                                                                                         | 11        |
| La inseminación artificial, también llamada IA, es una técnica ampliamente<br>utilizada en la cunicultura. Los factores que influyen en la IA pueden<br>clasificarse en aquellos que dependen de la hembra y los que dependen del<br>macho..... | 11        |
| 1.5 Factores vía macho que influyen en la inseminación artificial.....                                                                                                                                                                          | 12        |
| <b>2. Objetivos.....</b>                                                                                                                                                                                                                        | <b>15</b> |
| <b>3. Materiales y métodos.....</b>                                                                                                                                                                                                             | <b>16</b> |
| 3.1 Material Animal.....                                                                                                                                                                                                                        | 16        |
| 3.3 Diseño experimental.....                                                                                                                                                                                                                    | 16        |
| 3.4 Análisis estadístico.....                                                                                                                                                                                                                   | 21        |
| <b>4. Resultados y discusión.....</b>                                                                                                                                                                                                           | <b>22</b> |
| 4.1 Efecto de la selección genética por resiliencia sobre la calidad seminal....                                                                                                                                                                | 22        |
| 4.2 Efecto de la alimentación con postbiótico sobre la calidad seminal en cada<br>una de las líneas.....                                                                                                                                        | 26        |
| <b>5. Conclusión.....</b>                                                                                                                                                                                                                       | <b>32</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>                                                                                                                                                                                                                        | <b>33</b> |

# Índice de tablas.

**Tabla 1.** Número de muestras recolectadas...19

**Tabla 2.** Efecto de la línea genética Low y High en volumen del eyaculado y el pH (media  $\pm$  desviación estándar)...22

**Tabla 3.** Efecto de la línea genética Low y High en la motilidad espermática (media  $\pm$  desviación estándar)...23

**Tabla 4.** Efecto de la línea genética Low y High en el porcentaje de espermatozoides Rápidos y Medios progresivos (media  $\pm$  desviación estándar)...23

**Tabla 5.** Efecto de la línea genética Low y High en el porcentaje de espermatozoides No progresivos e Inmóviles (media  $\pm$  desviación estándar)...24

**Tabla 6.** Efecto de las líneas genéticas (control) en la Concentración, Producción total y Dosis potenciales (media  $\pm$  desviación estándar)...25

**Tabla 7.** Efecto de las líneas genéticas en la Concentración, Producción total y Dosis potenciales (media  $\pm$  desviación estándar)...26

**Tabla 8.** Efecto de la alimentación para cada una de las líneas Low y High del volumen eyaculado y el pH (media  $\pm$  desviación estándar)...26

**Tabla 9.** Efecto de la alimentación para cada una de las líneas Low y High en la Motilidad (media  $\pm$  desviación estándar)...27

**Tabla 10.** Efecto de la alimentación para cada una de las líneas Low y High en los espermatozoides Rápidos y Medios progresivos (media  $\pm$  desviación estándar)...28

**Tabla 11.** Efecto de la alimentación para cada una de las líneas Low y High en el porcentaje de espermatozoides No progresivos e Inmóviles (media  $\pm$  desviación estándar)...29

**Tabla 12.** Efecto de la alimentación para la línea Low en la Concentración, Producción total y Dosis potenciales (media  $\pm$  desviación estándar)...30

**Tabla 13.** Efecto de la alimentación para la línea High en la Concentración, Producción total y Dosis potenciales (media  $\pm$  desviación estándar)...31

# Índice de fotografías y figuras.

**Figura 1.** Exportaciones nacionales procedentes de la EU. (MAPA,2023)

**Fotografía 1.** Modelo comercial de vagina artificial ref. 10.803

**Fotografía 2.** Diluciones Tris-cítrico-glucosa

**Fotografía 3.** Goldcyto y tubo de ensayo graduado

**Fotografía 4.** Placa térmica

**Fotografía 5.** Sistema CASA

**Fotografía 6.** pH-metro

Este estudio forma parte del programa AGROALNEXT y ha sido financiado por MCIN con fondos de la Unión Europea NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) y por la Generalitat Valenciana.

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todos aquellos que de forma directa o indirecta, han participado en la realización de este TFG. Especialmente he de nombrar a:

La Dra. María De La Luz Garcia Pardo, por darme la oportunidad de formar parte en este proyecto, por su guía en este importante paso hacia mi futuro profesional y por su orientación y dedicación en la realización de este trabajo.

A Daniel Serrano Jara, cotutor del presente TFG, sin el cual no habría sido posible su realización. Gracias por trabajar a mi lado, por la confianza depositada y por darme la oportunidad de aprender de ti. Por la constante dedicación y ayuda a la finalización de este trabajo.

A todos los profesores que durante estos años me han formado como ingeniero y profesional, por resolver incontables dudas e inquietudes.

A los miembros investigadores y trabajadores de la granja de la EPSO, por esa experiencia en verano que me enseñó y enamoró de primera mano de nuestro sector, siempre guardaré esa experiencia.

Y, por último, a mis amigos y familia, en especial a mis padres, hermano y mi pareja, por su amor, tiempo y apoyo, siendo los pilares que me han protegido y llevado donde estoy.

## **1. Introducción**

Desde hace años, el foco para aumentar los valores productivos y reproductivos del conejo han sido dirigidos a mejorar su aptitud cárnica y maternal, junto a su capacidad de resiliencia al estrés.

Respecto al macho, en los últimos años, el uso de la inseminación artificial ha tomado un papel importante, pues ha incrementado el ratio de hembras que pueden ser inseminadas por macho a partir de una muestra de eyaculado siendo este (1/20-50).

Sin embargo, independientemente de la especie de interés zootécnico, predecir la fertilidad masculina a partir de los caracteres seminales todavía representa un desafío (Theau-Clément., 2015), por lo que los esfuerzos se centran en maneras de afectar positivamente a la motilidad.

Algunas de las investigaciones para su modificación han sido a través de la adición de aditivos en la alimentación, siendo los aditivos más novedosos los postbióticos. Estos se definen como productos solubles o metabolitos, excretados por las bacterias durante su vida o tras su lisis, que producen beneficios fisiológicos para el huésped (Aguilar-Toalá, 2018).

La primera utilización de productos bacterianos fue para mejorar la eficiencia metabólica en vacuno y caprino, aumentando los rendimientos de producción de leche. Pero en el sector cunícola es una herramienta poco usada e investigada, donde destacan autores como García et al. (2021), que mostraron unos resultados positivos basados en una ligera mejora en la integridad del acrosoma y un aumento del porcentaje de espermatozoides con cola normal en machos de conejo.

### **1.1 Situación internacional en el sector cunícola**

La producción ganadera representa un componente muy importante de la economía agrícola, cuya aportación no se limita a la producción de alimentos, sino que incluye también la producción de pieles y fibras, además de abonos. Así la producción ganadera española supone el 43 % de la producción agraria final nacional (MAPA, 2024).

El sector cunícola, dedicado a la cría y producción de conejos, ha sido tradicionalmente una actividad agropecuaria de importancia secundaria dentro del sector ganadero español. A lo largo de las últimas décadas, el sector ha experimentado notables transformaciones impulsadas por factores como la modernización de las explotaciones, los cambios en los hábitos de consumo, la globalización del mercado agroalimentario y el endurecimiento de las normativas de bienestar y sanidad animal (MAPA, 2024).

En este momento, el mayor productor de carne de conejo a nivel mundial es China, con una producción cercana a las 262.235,34 toneladas de carne. El siguiente es la

República Popular Democrática de Corea, que alcanza una producción de 150.475 toneladas y, en tercera posición, se encuentra Egipto con una producción de 72.000 toneladas (FAO, 2023).

En el marco europeo, España destaca con una producción de 29.862 cabezas (MAPA, 2023), situándose en primer lugar, seguida por Francia con 15.133 cabezas. Ambos son países exportadores y, al mismo tiempo, dependientes de otros mercados, ya que exportan productos de alto valor mientras importan de mercados con menor poder adquisitivo para suplir la demanda nacional (Giusti et al., 2011) permitiendo así disponer de un balance positivo.

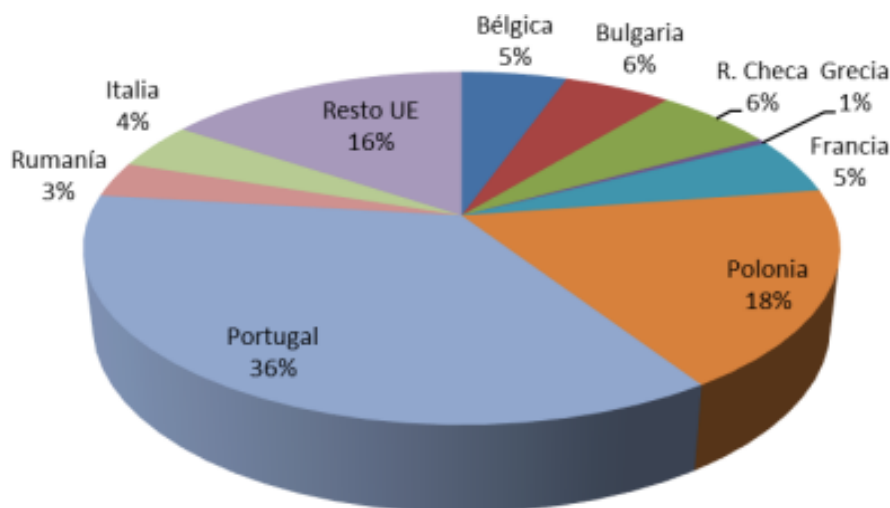
El consumo medio en el mundo se estima sobre los 300 gramos de conejo por persona al año. China, a pesar de ser el primer productor mundial, presenta un consumo de carne residual de menos de 10 gramos por habitante (Giusti et al., 2011), destinando principalmente el conejo a la industria peletera. Los mayores consumidores a nivel mundial son la República Popular Democrática de Corea y Egipto. En Europa, el consumo medio alcanza los 0,7 kg por habitante al año, siendo Italia el país más consumidor con 5,3 kg, seguida por otros países mediterráneos, como Francia y España (Giusti et al., 2011; MAPA, 2025).

## **1.2 Situación en el sector cunícola a nivel nacional**

Actualmente, el sector cunícola español se enfrenta a importantes desafíos que comprometen su viabilidad a medio y largo plazo, entre los cuales destaca la reducción del consumo de carne de conejo.

El último año, ha registrado una bajada del 6,5% de cabezas sacrificadas y una reducción del peso de canal de aproximadamente un 8,2%, según datos del MAPA (2025), lo que ha provocado un descenso relevante en los kilogramos de producción nacional. A todo esto, se añade el incremento de costes en alimentación y electricidad, factores que dificultan una producción sostenible; la alimentación representa entre un 60 y un 70% de los costes totales (Giusti et al., 2011). Actualmente, el coste medio de pienso se sitúa en 293 €/Tn para reproductoras y 278,82 €/Tn para cebo (MAPA, 2025). Este aumento ha provocado una subida en la curva de precios del conejo, elevándose de una media de 2,15 €/kg hasta los 2,515 €/kg en el mismo periodo del año (comparación abril 2019 y 2025, MAPA).

No solo la demanda nacional ha experimentado una bajada, sino que también se ha observado una tendencia similar en las exportaciones, que se han reducido un 14,9%, alcanzando el volumen más bajo de la década con 6.579 toneladas, siendo los principales destinos de exportación Portugal, Polonia y otros Estados miembros (Figura 1).



**Figura 1. Exportaciones nacionales procedentes de la EU. (MAPA,2023)**

En este momento, España tiene a Francia y Portugal como sus principales fuentes de importación, sumando un total de 2807 toneladas.(MAPA, 2025). En cuanto al número de explotaciones registradas nacionalmente, en los últimos dos años se ha mantenido estable, fluctuando entre las 3260-3300 explotaciones (MAPA, 2024), con un ligero aumento en el último año.

### **1.3 El uso de aditivos derivados de microorganismos en la alimentación**

Según el Reglamento (CE) N.º 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, se entiende por aditivo para la alimentación animal toda sustancia, microorganismo o preparado que se añade intencionadamente al pienso o al agua con el fin de desempeñar una o varias funciones específicas. En cunicultura, el uso de aditivos en la alimentación animal está orientado a mejorar la eficiencia productiva, garantizar el equilibrio digestivo y prevenir enfermedades entéricas, que son comunes en esta especie.

Entre los aditivos más empleados se encuentran los probióticos, prebióticos y últimamente los postbióticos. Oligosacáridos como la inulina, bacterias como *Lactobacillus sp* y metabolitos de varios tipos, ácidos grasos de cadena corta, lipopolisacáridos, entre otros, son usados principalmente para mejorar la salud intestinal al modular la microbiota y reducir el riesgo de enteropatías.

En 2021, la ISAPP (Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos) emitió una declaración de consenso sobre los postbióticos, definiéndolos como una preparación de microorganismos inanimados o sus componentes, incluido únicamente el sobrenadante de fermentación o la pared celular bacteriana y su contenido, que resultan beneficiosos para la salud del huésped.

Durante su ciclo vital, las bacterias generan diversas moléculas que tienen un rol clave para sus funciones vitales, conocidas como metabolitos. Estas sustancias actúan en los procesos celulares del huésped uniéndose a compuestos químicos del microbioma, modificando su estructura. Como resultado, pueden producirse distintas respuestas, una mayor secreción de enzimas o nutrientes, la mejora del sistema inmunitario y la optimización de procesos metabólicos, generando resistencia frente a cepas perjudiciales y procesos antiinflamatorios. Por otro lado, pueden producirse alteraciones en los mecanismos biológicos del huésped, afectando parcial o totalmente su funcionalidad.

Los probióticos han sido estudiados en diversos campos. Autores como Taverniti y Guglielmetti (2011) apuntan que, aunque en su mayoría generan beneficios en los usuarios a los que se les aplican, tienen la probabilidad de causar algún riesgo en los organismos. En comparación, el uso de postbióticos presentan menos riesgos de rechazo. Estos autores también destacan el empleo de paraprobióticos, sustancias definidas como “nonviable microbial cells” (células o membranas de origen bacteriano inactivadas que, en cantidades suficientes, pueden aportar beneficios a la salud de quien los consume) (Taverniti y Guglielmetti, 2011; Tsilingiri y Rescigno, 2013).

La desactivación de las células se lleva a cabo mediante mecanismos físicos (térmicos o de alta presión), radiación ultravioleta o químicamente. Todos estos métodos pueden alterar las membranas celulares, provocar pérdida de nutrientes e iones, agregación de ribosomas, ruptura de filamentos de ADN, inactivación de enzimas esenciales y coagulación de proteínas (Almada et al., 2016). Debido a esto, los postbióticos han aumentado su popularidad, ya que no se producen pérdidas de sus propiedades en su obtención.

Los metabolitos poseen composiciones distintas entre sí que permiten diferenciarlas. Entre las identificadas, encontramos compuestos como lípidos, butirato, propionato y plasminógenos derivados de acetil dimetilo, que son característicos de ciertas bacterias fermentadoras de fibra, como las del género *Clostridium sp* o *Faecalibacterium* (Wang et al., 2023).

En la categoría de proteínas destacan la lactocepina, una proteasa visible en algunas cepas de bacterias lácticas, esta enzima cumple funciones importantes, como la degradación de proteínas de la pared celular y la posible contribución a la textura en productos lácteos fermentados, comúnmente asociadas con cepas específicas de *Lactobacillus*.

Por otro lado, los ácidos orgánicos como el propiónico y el 3-fenil láctico se asocian frecuentemente con bacterias fermentadoras específicas, como *Propionibacterium* o algunas especies de *Lactobacillus*.

Los carbohidratos también permiten la identificación bacteriana, los polisacáridos ricos en galactosa son estructuras que se encuentran en bacterias grampositivas como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Wang et al., 2023).

En otros estudios se dividen según sus funciones fisiológicas, donde incluyen efectos antiinflamatorios, inmunológicos, antioxidantes, entre otros.(Aguilar-Toalá., 2018). Hay evidencias de que los metabolitos producidos por *Lactobacillus* tienen propiedades beneficiosas para la función hepática de los conejos (García et al.,2021).

Existen diversas estrategias para la obtención de postbióticos, las cuales se basan en técnicas de ruptura celular que permiten liberar compuestos bioactivos presentes en microorganismos. Entre los métodos más utilizados se encuentran el tratamiento térmico, los procesos enzimáticos, la sonicación y la extracción con solventes (Lee et al., 2002; Kim et al., 2006; Amaretti et al., 2013).

Estas técnicas, por lo general, se complementan con procedimientos de purificación como la centrifugación, la diálisis, la liofilización o el uso de columnas cromatográficas específicas (Sawada et al., 1990; Vidal et al., 2002; Matsuguchi et al., 2003). La centrifugación destaca, ya que ha resultado ser una herramienta efectiva para extraer el contenido intracelular en diferentes especies de bacterias lácticas y bifidobacterias (Amaretti et al., 2013).

Una vez obtenidos los compuestos, se usan técnicas como la resonancia magnética con carbono-13 y la espectrometría de masas para identificarlos y caracterizarlos (Arasu et al., 2015). En caso de querer analizar el perfil proteico se usan técnicas como la electroforesis bidimensional, que aportan información valiosa sobre su actividad bioquímica y adaptación tras la obtención de los metabolitos (Hamon et al., 2011; Heunis et al., 2014).

Investigaciones preliminares sugieren que estos compuestos pueden influir en el plasma seminal afectando a parámetros espermáticos como la motilidad, viabilidad, concentración y morfología, además de reducir el estrés oxidativo, un factor determinante en la funcionalidad espermática (Graaf SP et al ., 2014).

Un estudio reciente analizó el impacto de los postbióticos de *Lactobacillus*, a través de un gel vaginal aplicado *in vivo* a mujeres. Se demostró que los metabolitos promueven un ambiente microbiano saludable sin comprometer la funcionalidad espermática. Este descubrimiento es de gran importancia, ya que una microbiota vaginal equilibrada, dominada por *Lactobacillus*, protege contra infecciones y condiciones inflamatorias que sí podrían afectar negativamente la fertilidad femenina o incluso alterar la supervivencia espermática por vías indirectas (Liu et al., 2024).

En este mismo estudio también se analizó el uso del postbiótico derivado de *Lactobacillus rhamnosus* en los espermatozoides. Los resultados mostraron un efecto

negativo significativo sobre la motilidad espermática en condiciones *in vitro*, especialmente cuando se aplicó en concentraciones elevadas.

Se observó que la motilidad total y progresiva de los espermatozoides disminuyó conforme aumentaba la concentración del postbiótico. La concentración más alta fue la que produjo los efectos más relevantes, con una reducción considerable tanto de la motilidad total como de la motilidad progresiva.

Por otro lado, la dosis más baja usada en el laboratorio (5 %) no afectó significativamente ni a la motilidad progresiva ni a la integridad de los espermatozoides, manteniendo los parámetros dentro de los rangos funcionales. Esto sugiere que existe un umbral fisiológicamente seguro para la presencia de postbióticos, que además permite obtener beneficios en la microbiota vaginal.

#### **1.4 Factores vía hembra que influyen en la inseminación artificial**

La inseminación artificial, también llamada IA, es una técnica ampliamente utilizada en la cunicultura. Los factores que influyen en la IA pueden clasificarse en aquellos que dependen de la hembra y los que dependen del macho.

En el caso de la hembra, es necesario comprobar que la hembra esté en celo antes de inseminar. Las manifestaciones externas que indican el inicio del celo en la coneja se limitan al reflejo lordósico y al aumento de la turgencia y coloración de los labios vulvares (Vicente et al., 2014).

También es necesario tener en cuenta el estado fisiológico del animal, ya que, en periodo de lactación, su receptividad disminuye. En la hembra, el pico de aceptación *thea* ocurre en las horas posteriores al parto mientras que la menor aceptación se observa alrededor de los 4 días postparto. Tras este periodo, la receptividad vuelve a aumentar hasta llegar a valores adecuados para inseminar (Theau-Clément., 2010).

Para aumentar la tasa de receptividad y fertilidad es necesario el tratamiento con PMSG antes de la inseminación artificial. El intervalo óptimo de aplicación de la PMSG y la IA se extiende hasta 96 horas, sin diferencias significativas entre 24 y 72 horas (Lavara et al., 2004).

Sin embargo, el uso de esta hormona puede inducir la producción de anticuerpos que afectan negativamente la capacidad reproductora de la hembra, reduciendo su vida útil. La resistencia a la PMSG comienza a partir de la cuarta administración, por lo que no se recomienda un uso excesivo del protocolo. Investigaciones posteriores sugirieron que la cantidad de hormonas en cada dosis también influye. Theau-Clément (2010) demostró que administraciones con 8 IU provocan menor resistencia que concentraciones de 25 IU.

En una tesis doctoral desarrollada en la Universidad de Murcia se resaltó la relevancia de este factor, especialmente ante las variaciones estacionales, ya que permite coordinar la ovulación con la inseminación, incrementando así las probabilidades de éxito (Vicente, 2002).

Dicho esto, y aunque la PMSG representa una de las grandes herramientas en la IA, se busca modificar la forma de estimular al animal mediante métodos alternativos, donde destaca la bioestimulación. Estas técnicas ya se utilizan en el día a día, entre ellas destacan la separación de la madre y las crías antes de la inseminación, el cambio en el método de lactancia o en el régimen de iluminación.

El método más utilizado es la técnica de lactancia controlada, siendo esta la que ha demostrado mejor respuesta en diversos estudios. Eiben et al. (2004) observaron que, al interrumpir la lactancia 3 días antes de la inseminación, se obtiene un incremento en la fertilidad y prolificidad y no influye en el crecimiento de los gazapos lactantes ni aumenta la mortalidad.

La efectividad de este método depende del grado de contacto con los gazapos, ya que la separación total sin estímulos visuales, olfativos y auditivos es más efectiva que una separación parcial con contacto sensorial.

Sin embargo, extender el control de lactancia hasta 7 días provoca una disminución en el crecimiento de las crías. Por ello, a nivel fisiológico, sería suficiente con una separación madre-crías de 48 horas previas a la inseminación, generando una reducción en la secreción de prolactina y un aumento en la concentración plasmática de estradiol-17 $\beta$ , mejorando así la respuesta de LH al tratamiento con GnRH (Rebollar et al., 2005, 2006).

Aunque este método resulta útil para mejorar el potencial de la madre, también puede reducir el crecimiento de los gazapos, por lo que se recomienda aplicar lactancia controlada solo durante los dos días previos a la inseminación (Theau-Clément et al., 2010).

### **1.5 Factores vía macho que influyen en la inseminación artificial**

En cuanto a los machos, las primeras pautas de comportamiento sexual se observan en los primeros tres meses de edad, las primeras eyaculaciones suelen ocurrir alrededor del cuarto mes y la primera cubrición fértil tiene lugar a principios del quinto mes (Lavara et al., 2004).

La producción espermática alcanza su punto máximo entre los 10 y 18 meses. Respecto a la concentración, esta no varía una vez que se estabiliza, manteniéndose constante hasta los 25 meses. No obstante, puede verse afectada por factores ambientales si no se controla adecuadamente el entorno en el que vive el animal (Lavara et al., 2004).

En cuanto al volumen producido, hay una caída a partir del año y medio de vida bajando hasta valores de 0.63 ml. Los registros sobre la calidad espermática indican que el macho mantiene una salud espermática, sin un aumento notorio de las anomalías o alteraciones del acrosoma, hasta los 2 años (Vicente et al., 2014).

La duración de la espermatogénesis es de unos 49 días con una producción diaria de unos 150-200 millones de espermatozoides, y su capacidad de almacenamiento total es de 1.300-1.900 millones de espermatozoides (Vicente et al., 2014).

Cada eyaculado contiene entre 200 y 600 millones de espermatozoides en un volumen promedio de 0,2 a 1 ml. Los registros indican que, tras la tercera extracción, los valores bajan considerablemente, por lo que no se recomienda más de una toma diaria (Lavara et al., 2004).

Entrando al análisis espermático, Lavara et al. (2005) publicaron un estudio que evaluó la correlación entre los parámetros de calidad seminal y los resultados de inseminación en conejos de granja. Tras estandarizar las dosis seminales, concluyeron que bajo condiciones no controladas y con refrigeraciones de más de un día se requieren al menos 500.000 espermatozoides por inseminación, pero en condiciones óptimas, la cantidad necesaria requerida se reduce a 50.000 (Farrell et al., 1993).

Tras analizar las dosis bajo las condiciones óptimas, observaron una correlación negativa entre el porcentaje de espermatozoides anormales y la tasa de partos. A la vez, existe una correlación positiva entre la motilidad total y la tasa de partos, lo que indica que son los principales marcadores para aumentar las probabilidades de éxito (Lavara et al. 2005).

El principal parámetro que determina la calidad de una muestra de semen es la motilidad de los espermatozoides. En este sentido, el sistema de análisis seminal computarizado (CASA) permite realizar una valoración tanto cuantitativa (producción espermática) como cualitativa (motilidad y cinética) del semen (Farrell et al., 1993; Lavara et al., 2005).

Otro parámetro a considerar en la calidad seminal es la presencia de gotas citoplasmáticas que está relacionada con trayectorias anormales y morfologías irregulares. Estas gotas suelen aparecer en machos que presentan inmadurez sexual, afectando a la capacidad del macho, impactando negativamente en el pool seminal. Esto indica que los defectos morfológicos como anomalías desde cabeza, eliminaciones de cola, entre otros, no solo disminuyen la posibilidad de fecundar, sino que también reducen la calidad del embrión y su viabilidad en las primeras etapas, afectando al tamaño de la camada y la prolificidad (Brun et al. 2016).

No solo el estado de madurez afecta a la fertilidad, una investigación en el CIAZ reveló mayores valores de volumen y concentración espermática en invierno. Además, en otoño se observó un aumento de la motilidad espermática, lo que indica el efecto positivo en la espermatogénesis inducido por la acumulación de horas de luz del verano (Domingues et al., 2016).

El-Sisy et al. (2007) también observaron el efecto estacional en las características seminales de machos de las razas Black Baladí y White New Zealand. Durante el invierno, el volumen de semen libre de gel fue de 0,68 mL, con concentraciones de 702 millones/mL y una motilidad cercana al 65,6%. Al llegar el verano, estos datos disminuyeron evidenciando el impacto ambiental en el rendimiento reproductivo del macho.

Por tanto, para evitar problemas de fertilidad, es necesario aumentar el número de espermatozoides por dosis en las estaciones desfavorables y en machos jóvenes. O bien, mantener unas condiciones ambientales controladas con temperaturas óptimas cercanas a los 25 °C y un régimen lumínico que simule las horas de luz en verano, para maximizar la eficiencia reproductiva (Safaa H et al., 2010 ; Aamdal et al., 2015) .

Otro criterio de selección que se ha usado en los últimos años son los valores de pH, puesto que también está correlacionado con la motilidad. La fructosa es la fuente principal de energía usada por el espermatozoide; tras catabolizarla, se expulsa ácido láctico, el cual provoca un decrecimiento del pH (Brun et al., 2002), que indica la presencia de rápidos progresivos por su mayor actividad.

En cuanto a los métodos de conservación del material genético, el uso de diluyentes seminales naturales y extensores es fundamental para la IA. Algunos estudios han explorado alternativas a los compuestos comerciales tradicionales. Por ejemplo, Solís-Esquivel et al. (2021) demostraron que el agua de coco puede actuar como un diluyente eficaz, mejorando los valores de fertilidad y prolificidad.

Entre los extensores químicos destaca el INRA 96, que mantiene más del 80 % de motilidad durante las primeras 10 horas, superando a otros diluyentes comerciales. También, se confirmó la viabilidad espermática de la dosis hasta las 36 h posteriores. En cuanto a la fertilidad, la inseminación con semen al que se añadió el extensor INRA 96 dio una tasa de fertilidad del 77,8% y un tamaño de camada de 8,5 crías (Carluccio et al., 2010).

## 2. Objetivos

El objetivo de este trabajo de fin de grado es analizar el efecto de la suplementación con postbióticos, especialmente de los metabolitos provenientes de *Lactobacillus*, en los parámetros seminales de dos líneas seleccionadas divergentemente por variabilidad del tamaño de la camada al nacimiento.



### 3. Materiales y métodos

La información y datos recopilados para este estudio han seguido la línea de procedimiento aprobado por la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Generalitat Valenciana con el código 2022/VSC/PEA/0226.

#### 3.1 Material Animal

Para el análisis de la calidad seminal fueron usados un total de 40 machos. Todos ellos procedían de la 17ª generación de dos líneas genéticas seleccionadas divergentemente por variabilidad del tamaño de camada (Blasco et al., 2017). Veinte conejos pertenecían a la línea High (seleccionada para disminuir la variabilidad del tamaño de camada) y 20 a la línea Low (seleccionada para aumentar la variabilidad del tamaño de camada).

Los machos pertenecientes a una misma línea genética fueron divididos en dos subgrupos según su alimentación: N1 (línea Low y alimentación control); N2 (línea High y alimentación control); N3 (línea Low y alimentación con el postbiótico); N4 (línea High y alimentación con el postbiótico).

Este experimento se llevó a cabo en la Granja Docente Cunicola de la Universidad Miguel Hernández de Elche, la cual se encuentra ubicada en Orihuela (Desamparados) en la Escuela Politécnica Superior (EPSO).

Los animales permanecieron durante todo el experimento dentro de jaulas de acero galvanizado individuales, equipadas con bebedero automático de tipo chupete. La alimentación fue *ad libitum*. El ambiente fue controlado con un fotoperíodo 16L:8D, la temperatura osciló entre los 10 y 20 °C y la humedad relativa entre 46 y el 98%

#### 3.3 Diseño experimental

Los grupos se conformaron en junio de 2024. El experimento se realizó entre enero y marzo de 2025. Antes de incorporarse al experimento, todos los machos fueron entrenados durante dos semanas para la recolección seminal mediante vagina artificial. Las muestras de semen se tomaron en 2 sesiones, al principio y al final del experimento. El número total de muestras fue de 72. Los datos presentados en la tabla 1 corresponden al número de tomas que superaron los filtros de recolección y muestreo.

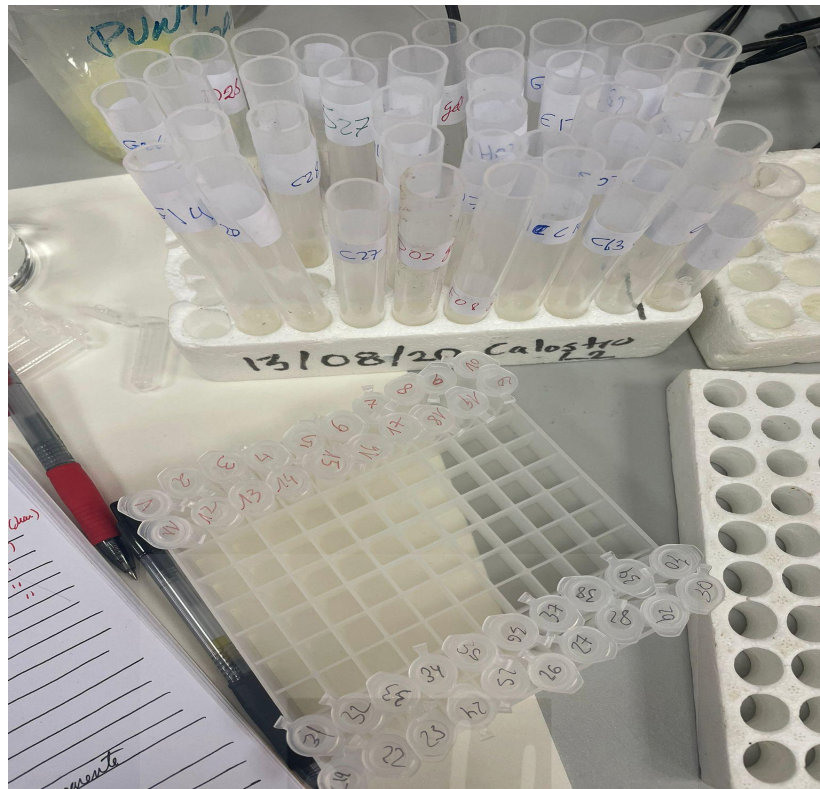


***Fotografía 1. Modelo comercial de vagina artificial ref. 10.803***

Las extracciones se realizaron siempre a las 9 AM mediante una vagina artificial previamente calentada a 45 °C (Fotografía 1). En cada muestra se verificó la presencia de gel y se retiró. Posteriormente, se midió el volumen de cada eyaculado con un tubo de ensayo milimetrado (C/Borde 13 x 150 mm).

Las muestras fueron diluidas en una proporción 1:15 con Tris-cítrico-glucosa (Fotografía 2) siguiendo el protocolo sugerido por la casa comercial para poder utilizar el sistema CASA (Sperm Class Analyzer 6.6.59, Microptic, Barcelona, España) con el objetivo de hacer una valoración cuantitativa (producción y concentración) y cualitativa (movimiento).

UNIVERSITAS  
Miguel Hernández



***Fotografía 2. Diluciones Tris-cítrico-glucosa***

Para el análisis microscópico, 5  $\mu$ l de cada muestra de semen diluido se introdujo en cámaras Goldeyto (Goldeyto Biotech corp, Guangzhou, People's Republic of China; Fotografía 3). Antes y durante el análisis, las cámaras se mantuvieron a 37 °C (Fotografía 4) con el fin de minimizar la pérdida de motilidad por choque térmico, este sistema está descrito en Lavara et al. (2005).



**Fotografía 3. Goldcyto y tubo de ensayo graduado**

**Tabla 1.** Número de muestras recolectadas en cada uno de los grupos del experimento (N1 Low (control), N2: High (control), N3: Low (aditivo), N4:High (aditivo))

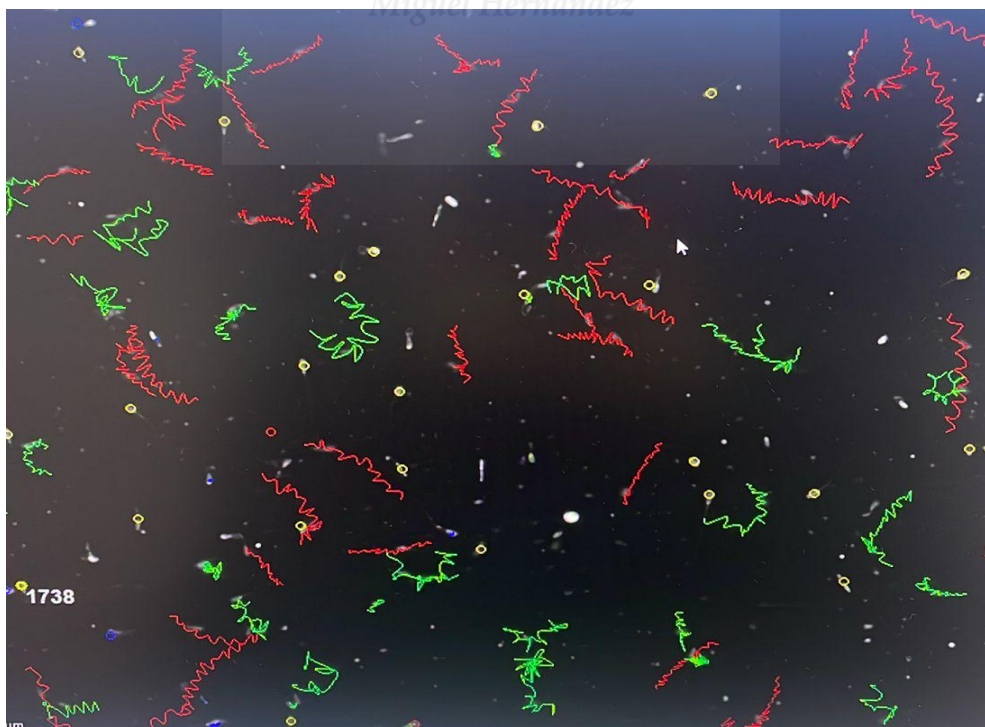
| Grupos | Semana 1 (muestras) | Semana 2 (muestras) |
|--------|---------------------|---------------------|
| N1     | 10                  | 9                   |
| N2     | 7                   | 7                   |
| N3     | 6                   | 7                   |
| N4     | 9                   | 7                   |

Cada célula fue evaluada usando un microscopio electrónico proporcionado por el departamento. Tras la calibración en neutro y la colocación de la pieza del kit de accesorios del sistema CASA para mejorar el contraste de los espermatozoides, se aplicó el aumento x10 para el análisis de la muestra.



**Fotografía 4. Placa térmica y muestras S1**

Se tomaron fotografías de cinco campos distribuidos a lo largo de cada célula, estableciéndose como criterio mínimo la presencia de al menos 200 espermatozoides para considerar la toma como viable (Fotografía 5). En caso de que ninguna de las células analizadas alcanzara dicho umbral, el software clasificaba la muestra como “no normozoospermia”. Al repetir el procedimiento, si se obtenían resultados similares, las muestras eran eliminadas del experimento como criterio de exclusión.



### ***Fotografía 5. Sistema CASA***

Dentro del sistema de análisis CASA, hay distintos parámetros observables respecto al movimiento de los espermatozoides. En primer lugar, se distingue la motilidad total, en esta categoría se encuentran los progresivos que son aquellos que tienen un porcentaje de espermatozoides con un índice de rectitud mayor al 70%. Los espermatozoides con motilidad progresiva se distinguen en tres poblaciones según su velocidad: los rápidos progresivos con velocidades superiores a 50  $\mu\text{m/s}$ , los medios progresivos entre 10 y 50  $\mu\text{m/s}$  y los no progresivos inferiores a 10  $\mu\text{m/s}$ .

Los espermatozoides sin movimiento se consideran inmóviles, son catalogados como espermatozoides sin valor funcional real, ya que no pueden fecundar por sí solos debido a su ausencia de desplazamiento.



***Fotografía 6. pH-metro y muestras puras.***

### **3.4 Análisis estadístico**

El modelo utilizado para la evaluación espermática incluyó el efecto Línea (High y Low), el tipo de dieta (Control o Tratamiento), la semana de toma de muestras como efecto ruido, el animal como efecto aleatorio y su peso como covariable.

Todos los análisis se realizaron utilizando metodología bayesiana. Se utilizó como base el programa Rabbit desarrollado por el Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (Valencia, España).

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Efecto de la selección genética por resiliencia sobre la calidad seminal

La tabla 2 muestra los resultados en volumen y pH para cada una de las líneas genéticas. Se observa diferencia en el volumen seminal entre las líneas genéticas alimentadas con un pienso control (0,995 mL Low vs 0,766 mL High,  $P=97,48$ ), específicamente en los machos del grupo Low presentan 0,23 mL más de volumen que la línea High, que puede atribuirse a los efectos indirectos de la selección genética realizada durante 17 generaciones (Blasco et al., 2017). Cuando los machos son alimentados con un pienso enriquecido con un postbiótico, generado a partir de la fermentación de bacterias ácido-lácticas, se mantienen las diferencias genéticas entre las líneas (0,983 mL Low vs 0,752 mL High,  $P=95,36$ ). El volumen espermático es superior en la línea Low en comparación a los registrados en otras líneas de conejo (Brun et al 2015; Theau-Clément et al., 2015).

**Tabla 2.** Efecto de la línea genética Low y High en volumen del eyaculado y el pH (media  $\pm$  desviación estándar).

| Control | Volumen (ml)      | pH                | Postbiótico | Volumen (ml)      | pH                |
|---------|-------------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------------|
| Low     | 0,995 $\pm$ 0,076 | 7,908 $\pm$ 0,110 | Low         | 0,983 $\pm$ 0,096 | 7,811 $\pm$ 0,137 |
| High    | 0,766 $\pm$ 0,09  | 7,725 $\pm$ 0,123 | High        | 0,752 $\pm$ 0,091 | 7,83 $\pm$ 0,126  |
| P (%)   | 97,48             | 87,52             | P (%)       | 95,36             | 55,32             |

P: probabilidad de que la diferencia encontrada sea distinta de 0.

El volumen del eyaculado es un factor fundamental en la elaboración de dosis seminales, ya que influye directamente en la cantidad total de espermatozoides disponibles. Por lo tanto, un mayor volumen puede compensar una concentración moderada o baja, permitiendo obtener un mayor número de dosis con una sola eyaculación, mejorando el valor del macho (Theau-Clément et al., 2015).

El pH es ligeramente superior en la línea Low que (7,908 pH Low vs 7,725 pH High,  $P=87,52\%$ ) cuando son alimentadas con un pienso control. La alimentación con un pienso enriquecido con postbióticos provocó que ambas líneas tuvieran un pH similar (7,811 pH Low vs 7,83 pH High,  $P=55,32\%$ ). El pH encontrado en torno a 7,8 es superior al encontrado en machos de otros experimentos, con alta motilidad, que se sitúa alrededor de 6,9 (Brun et al 2015; Theau-Clément et al., 2015).

Respecto al pH, la fructosa constituye la fuente principal energética para el espermatozoide, durante su catabolismo se genera la energía necesaria para la actividad

del aparato locomotor espermático, liberando como subproducto ácido láctico, lo que provoca una acidificación del líquido seminal (Brun, 2002).

**Tabla 3.** Efecto de la línea genética Low y High en la motilidad espermática (media  $\pm$  desviación estándar).

| Control | Motilidad (%)    | Postbiótico | Motilidad (%)    |
|---------|------------------|-------------|------------------|
| Low     | 78,58 $\pm$ 5,35 | Low         | 70,60 $\pm$ 6,82 |
| High    | 81,49 $\pm$ 6,16 | High        | 71,83 $\pm$ 6,42 |
| P (%)   | 63,96            | P (%)       | 54,72            |

P: probabilidad de que la diferencia encontrada sea distinta de 0.

La tabla 3 muestra los resultados de motilidad para cada una de las líneas genéticas. Ambas líneas presentan la misma motilidad (78,58% Low vs 81,49% High, P=63,96%) cuando son alimentados con un pienso control. La alimentación con un pienso enriquecido con postbiótico (70,60 Low vs 71,83 High, P= 54,72%) también fue similar entre las líneas. El valor medio de la motilidad es inferior a los registrados por Theau-Clément et al. (2015) que encontraron valores del 85%. Esta diferencia puede ser debida a la selección genética y periodo de recolección. Por otro lado, los valores encontrados en este experimento son similares a Brun et al. (2002; 2015).

**Tabla 4.** Efecto de la línea genética Low y High en el porcentaje de espermatozoides Rápidos y Medios progresivos (media  $\pm$  desviación estándar).

| Control | Rápido Progresivo (%) | Medio Progresivo (%) | Postbiótico | Rápido Progresivo (%) | Medio Progresivo (%) |
|---------|-----------------------|----------------------|-------------|-----------------------|----------------------|
| Low     | 31,59 $\pm$ 3,94      | 36,57 $\pm$ 3,61     | Low         | 28,33 $\pm$ 5,04      | 29,38 $\pm$ 4,66     |
| High    | 28,31 $\pm$ 4,63      | 38,34 $\pm$ 4,13     | High        | 27,61 $\pm$ 4,69      | 28,14 $\pm$ 4,32     |
| P (%)   | 71,88                 | 62,12                | P (%)       | 54,48                 | 56,72                |

P: probabilidad de que la diferencia encontrada sea distinta de 0

Los valores de la tabla 4 respecto a los Rápidos Progresivos no muestran diferencias entre las líneas genéticas (31,59% Low vs 28,31% High, P= 71,88%) cuando hay consumo del pienso control. Tras el consumo de postbiótico (28,33% Low vs 27,61% High, P= 54,48), se repiten los valores, por lo que el efecto del postbiótico es similar en ambas líneas genéticas.

Estos datos son críticos para predecir el éxito reproductivo, Theau-Clément et al. (2015) sugirieron que los valores óptimos para los rápidos progresivos se sitúan en torno al 64

y el 79%. Su criterio de velocidad es  $>40 \mu\text{m/s}$ , mientras que la clasificación en este experimento es de  $>50 \mu\text{m/s}$ . Por lo que no se pueden comparar con los datos vistos en las investigaciones nombradas anteriormente debido al distinto criterio de velocidad.

En cuanto a los Medios Progresivos (36,57% Low vs 38,34% High,  $P= 62,12\%$ ) no se observan diferencias entre las líneas. Tras el consumo de la dieta enriquecida (29,38% Low vs 28,14% High,  $P=56,72\%$ ) no se ha provocado ningún cambio relevante.

El conjunto de Medios y Rápidos Progresivos está relacionado con el potencial del eyaculado, ya que representa el fondo fértil, por lo que ambas líneas genéticas presentan el mismo potencial (Theau-Clément et al., 2015; Vicente et al., 2019). La selección por resiliencia no ha afectado a la motilidad ni ha variado tras el consumo de probióticos entre ambas líneas.

**Tabla 5.** Efecto de la línea genética Low y High en el porcentaje de espermatozoides No progresivos e Inmóviles (media  $\pm$  desviación estándar).

| Control | No Progresivo (%) | Inmóviles (%)    | Postbiótico | No Progresivo (%) | Inmóviles (%)    |
|---------|-------------------|------------------|-------------|-------------------|------------------|
| Low     | 9,88 $\pm$ 2,49   | 21,62 $\pm$ 4,55 | Low         | 11,82 $\pm$ 3,20  | 29,45 $\pm$ 5,99 |
| High    | 14,01 $\pm$ 2,8   | 11,56 $\pm$ 5,19 | High        | 15,83 $\pm$ 2,9   | 29,03 $\pm$ 5,56 |
| P (%)   | 85,16             | 92,36            | P (%)       | 81,32             | 52,36            |

P: probabilidad de que la diferencia encontrada sea distinta de 0

Cuando los machos son alimentados con un pienso control se observa que hay una tendencia a una mayor población de no progresivos por parte de la línea High (9.88% Low vs 14,01% High,  $P=85.16$ , Tabla 5). Cuando se utiliza el pienso enriquecido con el postbiótico (11,82% Low vs 15.83% High,  $P=81.32$ ), esta tendencia se ve ligeramente reducida tras el efecto de los metabolitos, aunque aún se mantiene la línea High con un mayor porcentaje poblacional.

Aunque los No Progresivos se consideran móviles, no suelen participar en la fecundación, ya que no avanzan por el tracto reproductor. Su presencia elevada puede indicar problemas en la maduración epididimaria o en la integridad del axonema espermático (Vicente et al., 2014).

En cuanto al porcentaje de espermatozoides Inmóviles, la línea Low presenta un 10% más de estos espermatozoides que la línea High ( $P= 92,36\%$ ). Juntando este dato con los No Progresivos el valor de espermatozoides infértiles inicialmente es superior en la línea Low (31,5 %). Se observa que tras el consumo del postbiótico los valores son similares. (29,45% Low vs 29,03% High,  $P= 52,36\%$ ). Este dato es significativo, ya que

el porcentaje de espermatozoides infértiles de la línea High se sitúa en 44,86%, frente al 41,27% de la línea Low.

También, es importante analizar que la inmovilidad se ha establecido tras el consumo de postbiótico en 29%. Esto sugiere que existe una respuesta fisiológica convergente, posiblemente asociada a un umbral funcional de tolerancia del sistema reproductivo a los compuestos bioactivos del postbiótico.

**Tabla 6.** Efecto de las líneas genéticas (control) en la Concentración, Producción total y Dosis potenciales (media  $\pm$  desviación estándar).

| Control | Concentración (M/mL) | Producción total (M) | Dosis potenciales |
|---------|----------------------|----------------------|-------------------|
| Low     | 186,94 $\pm$ 47,73   | 195,58 $\pm$ 44,56   | 9,708 $\pm$ 2,23  |
| High    | 260,60 $\pm$ 54,28   | 207,29 $\pm$ 50,25   | 11,60 $\pm$ 2,51  |
| P (%)   | 84,72                | 56,76                | 71,92             |

P: probabilidad de que la diferencia encontrada sea distinta de 0.

Los datos de la tabla 6 muestran las diferencias de concentración, producción total y dosis potenciales entre las líneas genéticas tratadas con el mismo régimen de alimentación.

En el tratamiento control, los machos de la línea High presentaron una concentración espermática de 260,60 millones/mL vs 186,94 millones/mL de la línea Low con una tendencia estadística (P= 84,72%), lo que indica que la selección genética aplicada a los machos afecta a sus niveles de concentración.

Ambas concentraciones son bajas en comparación con machos estudiados por Brun et al. (2002), Theau-Clément et al. (2015; 2016), con una media de 406 millones/mL. Por lo que el efecto de la selección o el manejo de la recolección ha provocado unos datos inferiores, aunque los valores registrados por la línea High son similares a los 259.8 millones/mL de Lavara et al. (2005).

Respecto a la producción espermática total, esta se obtiene multiplicando el volumen del eyaculado por la concentración/ml, y es el parámetro que permite calcular el número de dosis por eyaculado. En los valores registrados (Low 195,58 Millones/eyaculado vs 207,29 Millones/eyaculado High , P= 56,76%) no se observan diferencias debido a la diferencia de volumen (tabla 2).

**Tabla 7.** Efecto de la líneas genéticas en la Concentración, Producción total y Dosis potenciales (media  $\pm$  desviación estándar).

| Postbiótico  | Concentración (M/mL) | Producción total (M) | Dosis potenciales |
|--------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| <b>Low</b>   | 156,59 $\pm$ 59,37   | 151,75 $\pm$ 57,18   | 7,63 $\pm$ 2,77   |
| <b>High</b>  | 159,92 $\pm$ 54,93   | 128,0 $\pm$ 53,56    | 6,34 $\pm$ 2,56   |
| <b>P (%)</b> | 52,04                | 61,6                 | 62                |

P: probabilidad de que la diferencia encontrada sea distinta de 0.

Tras la administración del postbiótico, ambas líneas presentan la misma concentración (156,59 M/ml Low vs 159,92 M/ml High, P= 52,04; Tabla 7). Siendo un indicativo de que el efecto de resiliencia por la mejora genética causa mayor susceptibilidad en la línea High.

En la producción total (151,75 Millones/eyaculado Low vs 128 Millones/eyaculado High) se observa la misma similitud (P=61,6), ya que el postbiótico no ha afectado al volumen (tabla 2), aun habiendo cambio en la concentración espermática no se ve afectada la producción total

#### 4.2 Efecto de la alimentación con postbiótico sobre la calidad seminal en cada una de las líneas.

La tabla 8 muestra los resultados en volumen y pH según el tipo de alimentación, control y postbiótico, en la misma línea genética. La alimentación con el postbiótico no afectó al volumen para ninguna de las dos líneas (0,995 C mL vs 0,983 P mL, P=54,96%; para la línea Low; 0,766 C mL vs 0,752 P mL, P= 52,24% para la línea High).

**Tabla 8.** Efecto de la alimentación para cada una de las líneas Low y High del volumen eyaculado y el pH (media  $\pm$  desviación estándar).

| Línea Low          | Volumen (ml)      | pH                | Línea High         | Volumen (ml)      | pH                |
|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Control</b>     | 0,995 $\pm$ 0,076 | 7,908 $\pm$ 0,110 | <b>Control</b>     | 0,766 $\pm$ 0,091 | 7,725 $\pm$ 0,123 |
| <b>Postbiótico</b> | 0,983 $\pm$ 0,096 | 7,811 $\pm$ 0,137 | <b>Postbiótico</b> | 0,752 $\pm$ 0,091 | 7,830 $\pm$ 0,126 |
| <b>P (%)</b>       | 54,96             | 71,96             | <b>P (%)</b>       | 54,24             | 74,72             |

P: probabilidad de que la diferencia encontrada sea distinta de 0.

El volumen de la línea Low fue cercano a 1 mL. Valor superior a los que se han encontrado en otras líneas como en Theau-Clément et al. (2015) y Vicente et al. (2019) en torno a 0,7 ml/eyaculado, similares al registrado en la línea High

Sin embargo, es importante considerar que un mayor volumen no siempre implica una mejor calidad, ya que existen otras variables determinantes. Por ejemplo, una baja motilidad o un considerable porcentaje de anomalías seminales provocan que el valor de la muestra sea inferior.

Al analizar los valores de pH entre las distintas alimentaciones vemos valores similares para los dos tipos de alimentación.

**Tabla 9.** Efecto de la alimentación para cada una de las líneas Low y High en la Motilidad (media  $\pm$  desviación estándar).

| Línea Low   | Motilidad (%)    | Línea High  | Motilidad (%)    |
|-------------|------------------|-------------|------------------|
| Control     | 78,58 $\pm$ 5,35 | Control     | 81,49 $\pm$ 6,16 |
| Postbiótico | 70,60 $\pm$ 6,82 | Postbiótico | 71,83 $\pm$ 6,42 |
| P (%)       | 82,68            | P (%)       | 86,64            |

P: probabilidad de que la diferencia encontrada sea distinta de 0; El símbolo  $\pm$  hace referencia a la desviación estándar.

Los valores recogidos en la tabla 9 muestran una tendencia negativa tras la administración del postbiótico, disminuyendo alrededor de un 10% el porcentaje de espermatozoides móviles en ambas líneas. Esto indica que el uso de la dieta enriquecida con postbióticos ha afectado a la motilidad general espermática y que hay una tendencia estadística ligeramente superior en la línea High.

La motilidad es el valor más importante de este estudio de cara a la funcionalidad del postbiótico para la mejora reproductiva. Theau-Clément et al. (2015) demostraron que la presencia o ausencia de gel, el volumen, la velocidad curvilínea y la frecuencia del movimiento flagelar no afectaron a la fertilidad ni la prolificidad de las conejas inseminadas. Sin embargo, la motilidad masal y el porcentaje de células móviles influyen significativamente en la fertilidad de las conejas (Brun et al., 2015).

Esto no implica que necesariamente impactaría de forma negativa en la fertilidad, especialmente si no se acompaña de cambios en otros parámetros funcionales como la morfología, integridad de membrana o capacidad de reacción acrosómica (Lavara et al. 2005, 2008).

Rebollo et al. (2023) analizaron la composición microbiana de ambas líneas. Según sus datos, los animales resilientes (Low) presentan una mayor abundancia de *Lactobacillus f.* y otros taxones asociados con efectos beneficiosos sobre la inflamación y la respuesta inmune. Esto sugiere que su ecosistema intestinal está mejor adaptado para interactuar con las bacterias *Lactobacillus* y sus metabolitos.

Se puede afirmar que el efecto in vitro de los postbióticos aplicados directamente en el plasma seminal humano descrito por Liu S et al. (2024) se replica tras el consumo oral. En el presente estudio, los valores de motilidad son equiparables a los obtenidos por Liu bajo altas concentraciones. Agregado a lo anterior, estudios con distintos postbióticos ya confirmaron el efecto tóxico en el medio espermático. Kotarska (2024) concluyó que, en concentraciones elevadas, estas sustancias pueden resultar perjudiciales para la funcionalidad espermática de los ratones.

Tras la tendencia negativa sobre la motilidad vista en este proyecto, es recomendable investigar la dosis mínima y el periodo máximo de administración para evitar superar el umbral de toxicidad propuesto por Liu et al. (2024).

Para evaluar correctamente el efecto real de los metabolitos sobre la funcionalidad espermática, es necesario analizar cómo han afectado a cada uno de los tramos de velocidad, ya que una motilidad dentro del rango considerado fértil podría no reflejar una adecuada capacidad fecundante si se acompaña de un elevado porcentaje de espermatozoides No Progresivos.

**Tabla 10.** Efecto de la alimentación para cada una de las líneas Low y High en los espermatozoides Rápidos y Medios progresivos (media  $\pm$  desviación estándar).

| Línea Low   | Rápido Progresivo (%) | Medio Progresivo (%) | Línea High  | Rápido Progresivo (%) | Medio Progresivo (%) |
|-------------|-----------------------|----------------------|-------------|-----------------------|----------------------|
| Control     | 31,59 $\pm$ 3,94      | 36,57 $\pm$ 3,61     | Control     | 28,31 $\pm$ 4,63      | 38,34 $\pm$ 4,13     |
| Postbiótico | 28,33 $\pm$ 5,04      | 29,38 $\pm$ 4,66     | Postbiótico | 27,61 $\pm$ 4,69      | 28,14 $\pm$ 4,32     |
| P (%)       | 70,44                 | 89,28                | P (%)       | 54,16                 | 95,28                |

P: probabilidad de que la diferencia encontrada sea distinta de 0

En cuanto a los datos expuestos en la tabla 10 tenemos una reducción del porcentaje de progresivos en los grupos que han consumido el postbiotico, especialmente en los Medios progresivos. Según Liu et al. (2024) el porcentaje de espermatozoides Rápidos progresivos no presenta diferencias significativas al administrar altas dosis metabolitos.

Los Medios Progresivos tienen un movimiento más lento que los Rápidos Progresivos, pero aún mantienen una dirección definida, su capacidad fertilizante es variable y

depende de si pueden llegar al ovocito antes de agotarse, si bien no son el grupo más eficaz, contribuyen al fondo fértil del eyaculado (Castellini et al., 2012).

En cuanto al porcentaje de medios progresivos. (36,57 % C vs 29,38 % P, P=89,44 % (Low); 38,34 C % vs 28,14 P % P, P=95, 28% (High)). La valoración estadística nos da pruebas del descenso, tras el consumo de postbiótico, la línea High ha tenido una mayor caída sobre los  $10,20 \pm 6,06$  puntos ( $P < 0,95$ ).

El patrón descendente sugiere un desplazamiento del perfil cinético hacia formas de movimiento menos dinámicas, este cambio podría interpretarse como resultado de una menor eficiencia energética. El postbiótico administrado ha podido generar un desequilibrio o interferencia en los procesos fisiológicos implicados en la espermatogénesis y la maduración espermática.

No obstante, es posible que no se haya alcanzado una concentración suficiente del compuesto como para provocar una inmovilidad completa. Para confirmar esta hipótesis, sería necesario registrar los valores de velocidad unitaria tanto del grupo control como del tratado con diferentes concentraciones de metabolitos.

En el futuro, será necesario estudiar hasta qué punto ha sido mermada la fertilidad con hembras in vivo. Cabe destacar el criterio de velocidad usado, superior a otros autores, da mayor importancia en la fertilidad a los medios progresivos en este análisis, por lo que la bajada registrada en los Medios Progresivos debería reducir este parámetro.

**Tabla 11.** Efecto de la alimentación para cada una de las líneas Low y High en el porcentaje de espermatozoides No progresivos e Inmóviles (media  $\pm$  desviación estándar).

| Línea Low          | No Progresivo (%) | Inmóviles (%)    | Línea High         | No Progresivo (%) | Inmóviles (%)    |
|--------------------|-------------------|------------------|--------------------|-------------------|------------------|
| <b>Control</b>     | $9,88 \pm 2,49$   | $21,62 \pm 4,55$ | <b>Control</b>     | $14,01 \pm 2,8$   | $11,56 \pm 5,19$ |
| <b>Postbiótico</b> | $11,82 \pm 3,20$  | $29,45 \pm 5,99$ | <b>Postbiótico</b> | $15,83 \pm 2,9$   | $29,03 \pm 5,56$ |
| <b>P (%)</b>       | 69,12             | 85,12            | <b>P (%)</b>       | 67,32             | 99,04            |

P: probabilidad de que la diferencia encontrada sea distinta de 0

En la tabla 11 se observa la población de espermatozoides no progresivos e inmóviles. El porcentaje de espermatozoides no progresivos es similar para la línea Low. Estos valores indican a priori que tras el consumo del postbiótico no ha habido cambios significativos, pero es necesario analizar el siguiente grupo para poder afirmarlo.

En cuanto a los inmóviles (21,62 C % vs 29,45 P %, P=85,12% Low); (11,56 C % vs 29,03 P %, P=99,04 % High), definidos como espermatozoides completamente inactivos, sin movimiento flagelar. Representan células inviables o con daño estructural severo, son indicadores de baja calidad seminal general (Lavara et al. 2005). Los datos de probabilidad estadística nos indica que el uso de la dieta enriquecida con postbióticos aumenta la población de espermatozoides inmóviles, aunque de mayor manera en la línea High.

A pesar de que en los No Progresivos no se observa un aumento de la población a nivel estadístico. El incremento de los inmóviles podría haber disminuido su visibilidad estadística. Por lo que se podría asegurar que el postbiotico también ha incrementado su población.

Estos cambios negativos han podido ser provocados por las alteraciones en el perfil microbiano, que pueden modificar la disponibilidad de nutrientes y antioxidantes, generando un estrés oxidativo moderado, provocando un deterioro de la motilidad espermática (Vicente et al., 2019).

La línea High sería más susceptible, bajo esta teoría, al tener una menor capacidad de adaptación metabólica y antioxidante (Blasco et al. 2017). En el estudio de Liu et al. (2024) la motilidad no progresiva y la inmovilidad fueron significativamente mayores en los grupos de alta concentración, los datos de la tabla 11 indican que el presente estudio tiene la misma dinámica. Por esta razón no se descarta que una concentración menor o distinta de los metabolitos afecte de manera positiva.

**Tabla 12.** Efecto de la alimentación para la línea Low en la Concentración, Producción total y Dosis potenciales (media  $\pm$  desviación estándar).

| Línea Low   | Concentración (M/mL) | Producción total (M) | Dosis potenciales |
|-------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| Control     | 186,94 $\pm$ 47,73   | 195,58 $\pm$ 44,56   | 9,70 $\pm$ 2,23   |
| Postbiótico | 156,59 $\pm$ 59,37   | 151,75 $\pm$ 57,18   | 7,63 $\pm$ 2,86   |
| P (%)       | 66,04                | 73,72                | 72,88             |

P: probabilidad de que la diferencia encontrada sea distinta de 0

En la tabla 12 se observa el efecto de la alimentación para la línea Low en la Concentración, Producción total y Dosis potenciales. La alimentación no afectó a ninguno de los parámetros en la línea Low. Las líneas genéticas del presente estudio presentan valores bajos e irregulares, en comparación a otras investigaciones como Lavara et al. (2005) y García et al. (2021).

**Tabla 13.** Efecto de la alimentación para la línea High en la Concentración, Producción total y Dosis potenciales (media  $\pm$  desviación estándar).

| Línea High  | Concentración (M/mL) | Producción total (M) | Dosis potenciales |
|-------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| Control     | 260,60 $\pm$ 54,28   | 207,29 $\pm$ 50,25   | 11,60 $\pm$ 2,51  |
| Postbiótico | 159,92 $\pm$ 54,93   | 128,0 $\pm$ 53,56    | 6,34 $\pm$ 2,68   |
| P (%)       | 90,32                | 85,96                | 92,12             |

P: probabilidad de que la diferencia encontrada sea distinta de 0

En la tabla 13 se observa el efecto de la alimentación para la línea High en la Concentración, Producción total y Dosis potenciales. Todos los parámetros fueron inferiores al alimentar los machos con un postbiótico. El valor inicial registra la concentración frecuente en esta línea genética, aunque inferior a otras, tras la dosis enriquecida mostró los valores más inferiores entre los grupos. La bajada de  $99,28 \pm 78,64$  M/mL, sugiere la necesidad de investigar la influencia del postbiótico directamente en los mecanismos de la espermatogénesis, especialmente en líneas genéticas más predispuestas, como la High, puesto que el objetivo a futuro es alterar este mecanismo de forma positiva, y para ello necesitamos entenderlo completamente.

La producción total sigue la misma tendencia negativa, (207,29 M vs 128,0 M, P=85,96 %) decreciendo 77,28 M. Los efectos del postbiótico podrían haber interferido con la homeostasis microbiana, estudios previos han demostrado la fuerte influencia del ambiente, la nutrición y la genética sobre la calidad seminal (Lavara et al., 2008). Aunque estudios dietéticos, en animales, como la suplementación con lecitina, han mostrado beneficios (Brun et al., 2012), no todos los aditivos producen efectos positivos (Kotarska, K. 2024).

Teniendo en cuenta que la edad de los machos usados ha llegado al periodo de estabilidad fisiológica, ya que esta inicia en torno a los 10 meses y dura hasta los 18 (Farrell et al., 1993). El efecto de los metabolitos, en machos que consumen desde edades tempranas, no ha sido el esperado. No solo se ha producido una bajada en las concentraciones sino también en las dosis potenciales. Con una probabilidad estadística de un 92 % la reducción en la línea High provocaría pérdidas que desequilibrarían la economía de una granja, este dato nos vuelve a confirmar la tendencia a una mayor afección o susceptibilidad a los cambios ambientales.

## 5. Conclusión

En conclusión, la selección divergentemente por variabilidad del tamaño de camada ha afectado a los parámetros seminales de las líneas, particularmente en el volumen seminal, el pH, el número de espermatozoides inmóviles, la concentración espermática y el número de dosis totales. La inclusión de un postbiótico produjo un descenso en la motilidad, la concentración espermática, la producción total de espermatozoides y el número de dosis potenciales por eyaculado, afectando de forma diferente a las dos líneas genéticas.

El postbiótico no modificó el volumen eyaculado ni los valores de pH, ni tuvo relevancia estadística en los rápidos progresivos. En conjunto solo se observaron diferencias en la motilidad general y en la población de medios progresivos.

La reducción en la calidad seminal parece estar ligeramente relacionada con la composición genética de los animales. La producción total de espermatozoides y el número de dosis potenciales disminuyeron notablemente tras el consumo del postbiótico. Por tanto, se concluye que el uso de postbióticos, bajo las condiciones evaluadas en este estudio, no mejora la calidad seminal y compromete el rendimiento reproductivo.

Las investigaciones futuras podrían dirigirse a profundizar en la investigación de los mecanismos mediante los cuales los postbióticos afectan la espermatogénesis, incluyendo estudios moleculares, hormonales y de perfil microbiota-esperma, así como evaluar diferentes dosis, tiempos de administración y posibles sinergias con otros aditivos funcionales. Solo mediante un enfoque interdisciplinar será posible aprovechar el potencial de los postbióticos sin comprometer la salud y fertilidad de los animales.

## BIBLIOGRAFÍA

Amaretti, A., Di Nunzio, M., Pompei, A., Raimondi, S., Rossi, M., & Bordoni, A. (2013). Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: In vitro and in vivo activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 809–817.

Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Rejiniemon, T. S., Lee, K. D., Huxley, V. A. J., Kim, D. H., et al. (2015). Identification and characterization of *Lactobacillus brevis* P68 with antifungal, antioxidant and probiotic functional properties. *Indian Journal of Microbiology*, 55, 19–28.

Aamdal, H., de la Cruz-Cruz, L. A., Gómez-Muñoz, M. T., & Viudes-de-Castro, M. P. (2015). Seasonal influence on the number of motile spermatozoa per ejaculate in rabbits. *World Rabbit Science*, 23(2), 111–116.

Brun JM, Theau-Clément M, Bolet G. (2002). The relationship between rabbit semen characteristics and reproductive performance after artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 70:139–149.

Brun, J. M., Theau-Clément, M., Esquerré, D., & Bolet, G. (2012). Semen quality, testosterone, seminal plasma biochemical and antioxidant profiles of rabbit bucks fed diets supplemented with different concentrations of soybean lecithin. *Animal*, 6(5), 824–833.

Brun J.M., A. Sanchez, E. Ailloud, G. Saleil, M. Theau-Clément, (2015) Genetic parameters of rabbit semen traits and male fertilising ability, *Animal Reproduction Science*, *Animal Reproduction Science*, Volume 166, 2016, Pages 15-21, ISSN 0378-4320,

Blasco A, Martínez-Álvaro M, García ML, Ibáñez-Escriche N, Argente MJ. (2017). Selection for environmental variance of litter size in rabbits. *Genet Sel*, 49(1), 1-8.

Carluccio, A., Robbe, D., De Amicis, I., Contri, A., Tosi, U., Russo, F., & Paoletti, M. (2004). Technical Note: Artificial insemination in rabbits: laboratory and field trial with three different semen extenders. *World Rabbit Science*, 12(2), 65–79

Castellini, C., Dal Bosco, A., Cardinali, R., & Marconi, M. (2012). Differences in semen traits and antioxidant status in rabbit bucks of different genetic origin. *Animal*, 6(5), 720–728.

Caroline N. de Almada, Carine N. Almada, Rafael C.R. Martinez, Anderson S. Sant'Ana. (2016). Paraprobiotics : Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods, Trends in Food Science & Technology.

Chang J, Jia X, Liu Y, Jiang X, Che L, Lin Y, Zhuo Y, Feng B, Fang Z, Li J, Hua L, Wang J, Ren Z, Wu D, Xu S. (2024). Microbial mechanistic insight into the role of yeast-derived postbiotics in improving sow reproductive performance in late gestation and lactation sows. *Animals (Basel)* 14:162.

de Graaf SP, Rickard JP, Pini T, Druart X, Leahy T. (2014). Emerging roles of seminal plasma in sperm function and male fertility. *Reproduction* 148: R173-R184.

Eiben Cs., Kustos K., Gódor-Surmann K., Kotány Sz., Theau-Clément M., Szendrő Zs. (2004) b. Effect of nursing methods on productivity in lactating rabbits. In Proc.: 8 th World Rabbit Congress, September 7-10, Puebla, Mexico, 263-269

El-Sisy, G. A., El-Badry, M. A., & El-Ratel, I. T. (2007). Seasonal variations in semen characteristics of New Zealand White and Baladi Black rabbits. *World Rabbit Science*, 15(2), 105–110.

Farrell PB, Foote RH, Simkin ME, Clegg ED, Wall RJ. Relationship of semen quality, number of sperm inseminated, and fertility in rabbits. *J Androl.* (1993) Nov-Dec;14(6):464-71. PMID: 8294231

Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH. (1998). Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 49:871–879.

Fréour T, Jean M, Mirallié S, Dubourdieu S, Barrière P. (2010). Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) parameters and their evolution during preparation as predictors of pregnancy in intrauterine insemination with frozen-thawed donor semen cycles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 149:186–189.

Giusti M, Cordiviola CA, Arauz S, Rule R. (2011). Reseña sobre producción de 2011 conejos. *Introducción a la Producción Animal*, Fac. de Cs. Agrarias y Forestales, UNLP. 2 Laboratorio Central, Fac. de Cs. Veterinarias, UNLP. 1, 3 CIC PBA.

García-Pardo ML, Díaz JV, Argente MJ. (2021). Effect of postbiotic based on lactic acid bacteria on semen quality and health of male rabbits. *Animals* 11:1007.

Hamon, E., Horvatovich, P., Bisch, M., Bringel, F., Marchioni, E., Aoude-Werner, D., & Ennahar, S. (2011). Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC Microbiology*, 11, 63. 3

Heunis, T. D. J., Deane, S. M., Smit, S., & Dicks, L. M. T. (2014). Proteomic analysis of the acid stress response in *Lactobacillus plantarum* 423 through a gel-free, label-free quantitative approach. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6(3–4), 182–190.

J.E. Aguilar-Toalá, R. Garcia-Varela, H.S. Garcia, V. Mata-Haro, A.F. González-Córdova, B. Vallejo-Cordoba, A. Hernández-Mendoza (2018) Postbiotics: An evolving term within the functional foods field, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 75, 2018, Pages 105-114, ISSN 0924-2244.

Kim, J. Y., Park, H. J., Kim, Y. J., Kim, J. Y., & Lee, J. H. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of lactic acid bacteria from kimchi. *Journal of Food Science and Nutrition*, 11(4), 279–284.

Kim, D. H., Jeong, D., Kang, I. B., Kim, H., Song, K. Y., & Seo, K. H. (2011). Lipoteichoic acid of *Lactobacillus plantarum* inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by blocking the TLR4-MyD88 signaling pathway. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(11), 1926–1934.

Kotarska K. (2024) Moderate concentration of *Lactobacillus* metabolites does not adversely affect mouse sperm. *Syst Biol Reprod Med* 70:124-130.

Lee, D. K., Zang, Z., Choi, Y. J., Shin, H. S., & Ji, G. E. (2002). Immunomodulatory and antitumorigenic activity of heat-killed *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in mice. *Journal of Food Science and Nutrition*, 7(1), 77–81.

Lavara, Raquel & Garcia, M L & Andrés, I. & Caselles, P. (2004). Estudio de la edad de los machos de conejo en la inseminación artificial. *Boletín de Cunicultura*, ISSN 1696-6074, N° 135, 2004, pags. 17-25. 135.

Lavara R, Mocé E, Lavara F, de Castro MPV, Vicente JS. (2005). Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology* 64:1130–1141.

Lavara R, García ML, Torres C, Vicente JS, Baselga M. (2008). Genetic parameters for semen traits of rabbit males: II. Motility. En *Proc. 9th World Rabbit Congress*, Verona, Italy, 159-162.

Li, B., Lu, F., Wei, X., Zhao, R., & Zhao, Y. (2012). Isolation and identification of antioxidant peptides derived from *Lactobacillus* cell wall proteins and their effects on the oxidative stress in mice induced by high-fat diet. *Food Chemistry*, 135(3), 1292–1298.

Liu S, Alipour H, Zachar V, Kesmodel US, Dardmeh F. (2024). Effect of postbiotics derived from *Lactobacillus rhamnosus* PB01 (DSM 14870) on sperm quality: a prospective in vitro study. *Nutrients* 16:1781.

Matsuguchi, T., Takagi, A., Matsuzaki, T., Nagaoka, M., Ishikawa, K., & Yokokura, T. (2003). Use of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* cell wall components for enhancing immune function. *Journal of Dairy Science*, 86(9), 3084–3093.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2025, abril). *Resumen trimestral de indicadores de cunicultura: abril 2025*.

Pajarillo, E. A. B., Kim, S. H., Lee, J. H., Valeriano, R. A. M., & Kang, D. K. (2015). Proteomic characterization of the cytosolic proteins of *Lactobacillus mucosae* LM1 under bile stress. *Frontiers in Microbiology*, 6, 11.

Rebollar P.G., Milanés A., Esquifino A.I., Millán P., Lorenzo, P.L. (2005). Plasma oestradiol and prolactin in synchronized multiparous rabbit does. *World Rabbit Sci.*, 13, 290.

Rebollar PG., Milanès A., Pereda N., Millán P., Cano P., Esquifino A.I., Villarroel M., Silván G. And Lorenzo P.L. (2006). Oestrus synchronisation of rabbit does at early post-partum by doe-litter separation or ECG injection: Reproductive parameters and endocrine profiles. *Animal Reprod. Sci.*, 93, 218-230.

Robayo I, Montenegro V, Valdés C, Cox JF. (2008). CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. *Reprod Domest Anim* 43:393–399.

Rodríguez Martín, S. (2022). Resultados productivos de la inseminación artificial en conejas. Universidad de Extremadura. <https://dehesa.unex.es/handle/10662/14342>

Rebollo Casto, Cristina & Argente, María-José & Garcia, M L & Pena, Ramona & Blasco, Agustín & Ibanez, Noelia. (2023). Selection for environmental variance shifted the gut microbiome composition driving animal resilience. *Microbiome*. 11. 10.1186/s40168-023-01580-4.

Sawada, D., Sugawara, T., Ishida, Y., Aihara, K., Aoki-Yoshida, A., Takehara, I., & Fujiwara, S. (1990). Hypotensive activity of a polysaccharide–glycopeptide complex produced by *Lactobacillus casei* YIT 9018. *Journal of Dairy Science*, 73(12), 3550–3556.

Safaa H, Emarah M, Saleh N. Efectos estacionales en la calidad del semen en conejos machos de las razas Black Baladi y White New Zealand. *World Rabbit Sci.* (2010).

Solís-Esquivel, A., et al. (2021). Evaluación de agua de coco como diluyente seminal en cunicultura. Archivos de Zootecnia, 70(271), 405–412.

Salminen S, Collado MC, Endo A, Hill C, Lebeer S, Quigley EM, Sanders ME, Shamir R, Swann JR, Szajewska H, Vinderola G. (2021). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 18:649-667.

Shen, X.; Xu, L.; Zhang, Z.; Yang, Y.; Li, P.; Ma, T.; Guo, S.; Kwok, L.-Y.; Sun, Z. Postbiotic Gel Relieves Clinical Symptoms of Bacterial Vaginitis by Regulating the Vaginal Microbiota. Front. Cell Infect. Microbiol. (2023), 13, 1114364.

Theau-Clément M. Preparación de la coneja para la inseminación: una revisión. World Rabbit Sci. (2010)

Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). Genes Nutr. (2011) Aug;6(3):261-74.. Epub 2011 Apr 16. PMID: 21499799; PMCID: PMC3145061.

Tsilingiri K, Rescigno M. Postbiotics: what else? Benef Microbes.(2013) Mar 1;4(1):101-7. doi: 10.3920/BM2012.0046. PMID: 23271068

Theau-Clement, Michèle & Ailloud, Eliot & Sanchez, Amélie & Saleil, Georges & Brun, Jean. (2016). Relationships between rabbit semen characteristics and fertilising ability after insemination. Animal : an international journal of animal bioscience. -1. 1-6. 10.1017/S1751731115002372.

Vidal, K., Donnet-Hughes, A., & Granato, D. (2002). Lipoteichoic acid from *Lactobacillus johnsonii* La1 activates dendritic cells and induces Th1 type immune response. Journal of Immunology, 168(7), 3683–3690.

Vicente, J. S. (2002). Efecto del fotoperiodo y conservación del semen sobre la inseminación artificial en conejas. [Tesis doctoral, Universidad de Murcia]

Vicente, J. S., Lavara, R., Viudes de Castro, M. P., & Marco-Jiménez, F. (2014). Técnicas y manejo reproductivo del conejo. *Tecnología de producción de conejos para carne*, (216), 47–61.

Vania Domingues et al (2016). Influencia de la estacionalidad sobre los parámetros seminales. agrinews.es.

Vicente, J. S., Viudes-de-Castro, M. P., & García-Ximénez, F. (2019). Influence of testosterone and reproductive activity on rabbit seminal plasma characteristics. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(4), 561–567.

Wang, S., Ahmadi, S., Nagpal, R., Jain, S., Mishra, S. P., Kavanagh, K., Zhu, X., Wang, Z., McClain, D. A., Kritchevsky, S. B., et al. (2023). Postbiotics as Metabolites and Their Biotherapeutic Potential. MDPI.

Zamojska D, Nowak A, Nowak I, Macierzyńska-Piotrowska E. (2021). Probiotics and postbiotics as substitutes of antibiotics in farm animals: a review. *Animals* 11

