



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Alternativas al uso de antibióticos en conservación seminal (con especial
mención en porcino)

Alternatives to the use of antibiotics in seminal conservation (specially in swine)

Autor/es

Emilio Polo Gracia

Director/es

Antonio Del Niño Jesús García

Facultad de Veterinaria

2020

ÍNDICE

1. Resumen/Abstract.....	4
2. Introducción.....	5
2.1 Aparato genital del verraco.....	6
2.2 El espermatozoide porcino	8
2.3 Evaluación seminal y características del eyaculado porcino.....	9
2.4 Conservación seminal.....	10
2.4.1 Rooibos como solución al choque térmico	11
2.4.2 Diluyentes seminales.....	12
2.5 Agentes contaminantes del semen porcino.....	14
2.5.1 Métodos para reducir la carga bacteriana de los eyaculados.....	17
3. Justificación y objetivos.....	19
4. Metodología.....	20
5. Resultados y discusión.....	21
5.1 Centrifugación coloidal del semen.....	21
5.2 Péptidos antimicrobianos.....	23
5.3 Plasma seminal microfiltrado.....	26
5.4 Materiales de envasado de las dosis seminales.....	26
5.5 Conservación del semen de verraco a 5°C sin antibióticos.....	27
6. Conclusiones	28
7. Valoración personal.....	30
8. Bibliografía.....	31

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1.....	8
Imagen 2.....	16
Imagen 3.....	24
Imagen 4.....	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	10
Tabla 2.....	14
Tabla 3.....	15
Tabla 4.....	15
Tabla 5.....	19

1. Resumen/Abstract

Alternativas al uso de antibióticos en conservación seminal (con especial mención en porcino)

El aumento de las resistencias bacterianas a los antibióticos que se está produciendo en los últimos años, y las cuales suponen un importante riesgo para la salud pública, se asocian, entre otras causas, al uso excesivo de antibióticos en la producción animal. Debido a la nueva normativa que regula y controla el uso de antibióticos en la producción animal (**Reglamento (UE) 2016/429**) surge la necesidad de encontrar alternativas al uso de estas sustancias en todos los campos que abarca la producción animal y la veterinaria, siendo el área de la reproducción una de las más directamente afectadas, ya que, se añade gran cantidad de antimicrobianos a los diluyentes seminales. El objetivo que se pretende conseguir con este trabajo es conocer las diferentes alternativas que se están investigando en la actualidad para, a corto o medio plazo, sustituir el uso de antibióticos empleados en conservación seminal en la especie porcina, pero que sean igual o más efectivos. Para realizarlo, se llevó a cabo una revisión de los estudios y artículos publicados sobre péptidos antimicrobianos, centrifugación coloidal de espermatozoides, microfiltración y materiales de envasado de dosis seminales. No obstante, tras analizarlos, se concluyó que el empleo de una sola de las alternativas (por ejemplo, péptidos antimicrobianos o centrifugación coloidal) no conseguía el objetivo marcado, por lo que probablemente, la solución estaría en una combinación de ellas, además, del empleo de estrictas medidas de higiene durante todo el proceso (desde la recogida hasta la inseminación).

Alternatives to the use of antibiotics in seminal conservation (specially in swine)

The increase in bacterial resistance to antibiotics that has been occurring in recent years, and which involve a significant risk to public health, is associated with the excessive use of antibiotics in animal production. Due to the new regulations that regulate the use of antibiotics in animal production (Regulation (EU) 2016/429), it's necessary to find alternatives to the use of these substances in all fields that include animal and veterinary production, being the area of reproduction one of the most affected, due to the large amount of antimicrobials that are added to the seminal diluents. The objective of this review is to know which alternatives are being investigated to replace antibiotics in seminal preservation and if they work with the same effectivity. The alternatives studied were antimicrobial peptides, colloidal sperm centrifugation, microfiltration, and seminal dose packaging materials.

After analyzing all of them, it was concluded that the use of only one of these alternatives (for example, antimicrobial peptides or colloidal centrifugation) did not achieve the set objective so, probably, the solution would be in a combination of some of them, in addition to the use of strict hygiene measures throughout the process (from collection to insemination).

2. Introducción

Durante los últimos años se ha producido un aumento de las resistencias antimicrobianas en veterinaria debido a un uso incorrecto y masivo de antibióticos en producción animal, lo que supone un elevado riesgo en materia de salud pública. Durante el año 2016, el Parlamento Europeo aprobó un proyecto legislativo cuyo objetivo era restringir el uso de antibióticos como respuesta a las resistencias antimicrobianas. Este hecho se ve reflejado en el Reglamento (UE) 2016/429 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 9 de marzo de 2016 relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal (Legislación sobre sanidad animal), en cuyo punto 32 establece:

“(32) La resistencia a los antimicrobianos, entendida como la capacidad de los microorganismos para sobrevivir o multiplicarse en presencia de una concentración de un agente antimicrobiano que normalmente es suficiente para inhibir o matar microorganismos de la misma especie, está aumentando. En la acción nº 5 que se propone en la Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo y al Consejo titulada «Plan de acción contra la amenaza creciente de las resistencias bacterianas» se hace hincapié en la función preventiva del presente Reglamento y en la consiguiente reducción que se espera se haga del uso de antibióticos en animales. Esta resistencia de los microorganismos a antibióticos a los que antes reaccionaban complica el tratamiento de las enfermedades infecciosas tanto en seres humanos como en animales y por lo tanto puede representar una amenaza para la salud humana o animal. Como consecuencia de ello, los microorganismos que han desarrollado la resistencia a los antibióticos han de ser tratados como si fueran enfermedades transmisibles y, por tanto, deben entrar en el ámbito de aplicación del presente Reglamento. Esto permitirá tomar medidas contra los organismos resistentes a los antibióticos cuando proceda y sea necesario”.

Debido a que el uso irracional e indiscriminado de los antibióticos supone un elevado riesgo para la salud pública mundial y además conlleva una elevada carga económica, el Parlamento Europeo aprobó un nuevo reglamento con el objetivo de paliar tanto las consecuencias económicas como sanitarias que tiene el uso indebido de antimicrobianos.

Así, se ve reflejado en el Reglamento (UE) 2019/6 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 11 de diciembre de 2018 sobre medicamentos veterinarios y por el que se deroga la Directiva 2001/82/CE, en cuyo punto 41 establece que:

“(41) La resistencia a los antimicrobianos en los medicamentos de uso humano y los medicamentos veterinarios es un problema sanitario cada vez más grave en la Unión y a nivel mundial. Debido a la complejidad del problema, a su dimensión transfronteriza y a la elevada carga económica, su impacto va más allá de sus graves consecuencias para la salud humana y la sanidad animal y se ha convertido en un problema de salud pública mundial que afecta al conjunto de la sociedad y exige una acción intersectorial urgente y coordinada, en consonancia con el planteamiento de «Una sola salud». Dicha acción incluye el refuerzo de la utilización prudente de los antimicrobianos, evitando su uso profiláctico y metafiláctico rutinario, acciones destinadas a limitar el uso en animales de antimicrobianos que son de importancia crucial para prevenir o tratar infecciones humanas potencialmente mortales, y fomentar e incentivar el desarrollo de nuevos antimicrobianos. Hay que garantizar asimismo que en las etiquetas de los antimicrobianos veterinarios se indiquen advertencias y consejos adecuados. El uso no amparado por los términos de la autorización de comercialización de determinados antimicrobianos nuevos o de importancia crucial para las personas debe restringirse en el sector veterinario. Las normas relativas a la publicidad de los antimicrobianos veterinarios deben ser más estrictas, y los requisitos de autorización deben abordar adecuadamente los riesgos y los beneficios de tales medicamentos”.

Tomando como base esta nueva legislación, se están llevando a cabo diversos estudios que tienen como objetivo encontrar diferentes alternativas al uso de antibióticos en el ámbito veterinario, especialmente en las especies de abasto.

2.1 Aparato genital del verraco

Resulta fundamental conocer la anatomía del aparato reproductor para poder estudiar y entender la reproducción en cualquier especie (**Climent et al., 2013**). Dicho aparato tiene tres funciones principales como la producción de los espermatozoides en los testículos; la maduración, almacenamiento y transporte de espermatozoides en el sistema tubular; y el posterior depósito mediante el pene en el aparato reproductor de la hembra (**Simpson et al., 2000**). El aparato genital del verraco consta de dos testículos envueltos por el escroto, los epidídimos, los conductos deferentes, el pene, la próstata, glándulas vesiculares o vesículas seminales, glándulas bulbouretrales y uretra.

Los **testículos** están en su mayoría formados por los túbulos seminíferos, que forman una intrincada red de conductos en los cuales se producen los espermatozoides. Se encuentran también las células de Sertoli, células especializadas que intervienen en la maduración de los espermatozoides. Las células intersticiales de Leydig, cuya principal función es la producción de testosterona, los vasos sanguíneos y linfáticos y los nervios se encuentran entre los túbulos seminíferos. Las interacciones entre las células de Sertoli y Leydig regulan prácticamente todos los aspectos de la función reproductiva del macho (**Williams, 2013**).

La ubicación externa de los testículos necesita de un sistema anatómico para la termorregulación, formado por un complejo vascular testicular de arterias y venas del cordón espermático, llamado plexo pampiniforme (**Garner y Hafez, 1993**).

El **epidídimo** forma tres secciones distintas que son cabeza, cuerpo y cola. El conducto contorneado del epidídimo está rodeado por una importante capa circular de fibras musculares y contiene un epitelio columnar estratificado con cilios.

A continuación, se encuentra el **conducto deferente** que es un tubo grueso, fuertemente musculado a través del cual el espermatozoide es transportado desde la cola del epidídimo a la uretra pélvica.

Adyacentes a la uretra pélvica se sitúan las glándulas sexuales secundarias, formadas por glándulas vesiculares o vesículas seminales y glándulas bulbo-uretrales. Las vesículas seminales son responsables de la mayoría del volumen líquido del plasma seminal, segregan altos niveles de fructosa y ácido cítrico que se utilizan como sustratos de energía para los espermatozoides, mientras, las glándulas bulbo-uretrales secretan la fracción gelatinosa característica del eyaculado porcino.

La **próstata** se encuentra al lado de las glándulas vesiculares y su principal función es la secreción de sustancias alcalinas que neutralizan las secreciones vaginales ácidas.

La porción terminal del sistema urogenital es la **uretra**, que es el tubo central dentro del pene. La uretra peneana se abre en el glande del pene, siendo en el verraco de forma espiralada (**Garner y Hafez, 1993**).

El **pene** del verraco es de tipo fibroelástico ya que tiene mayor proporción de tejido conectivo en relación con el eréctil y una longitud de 300-500mm. Presenta una flexura sigmoidea que cuando se alarga, produce la erección. El glande del pene termina en forma de espiral y está altamente innervado, debiendo estimularlo correctamente para que se produzca la eyaculación (**Garner y Hafez, 1993**).

2.2 El espermatozoide porcino

El espermatozoide es el gameto masculino y está constituido por dos porciones esenciales como la cabeza y la cola. Las principales organelas de la cabeza son el núcleo y el acrosoma, una vesícula que contiene varias enzimas hidrolíticas y que se ubica muy cerca del núcleo. La cola se ve subdividida en cuello, porción media, porción principal y porción terminal (**Imagen 1**).

Referente a la **cabeza** del espermatozoide, la forma del núcleo determina la forma de la cabeza, que varía según las especies. El núcleo se caracteriza por una alta densidad de cromatina y tiene una forma específica de especie. En la cabeza se encuentra también el acrosoma que puede definirse como una vesícula limitada por membranas y que recubre el polo anterior de la cabeza.

El **cuello** es una estructura relativamente corta y estrecha que se sitúa entre la cabeza y la porción intermedia. Se compone de un centriolo situado centralmente y de nueve fibras gruesas periféricas (**Williams, 2013**).

La **porción media** tiene la estructura característica de un flagelo, con dos fibrillas centrales y nueve pares periféricos que constituyen el complejo filamentos axial. Están rodeadas por nueve fibras dispuestas longitudinalmente que se van adelgazando hacia el exterior. Estas a su vez, están rodeadas por mitocondrias en una disposición helicoidal (**Williams, 2013**).

La **porción principal** es la parte más larga de la cola del espermatozoide, compuesta por el complejo filamentos axial y con una estructura idéntica a la porción media y rodeada por la continuación de las fibras externas de la porción media.

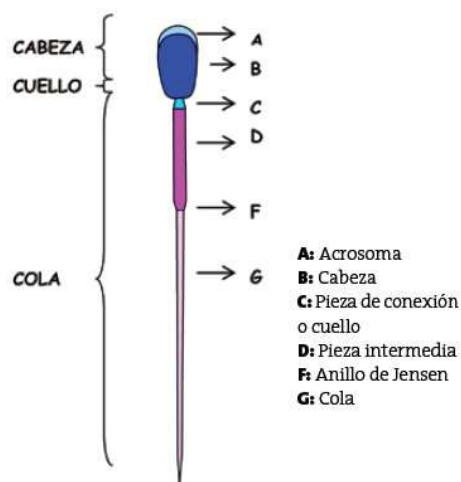


Imagen 1. Morfología del espermatozoide porcino (www.porcicultura.com, 2012)

El espermatozoide de cerdo tiene unas dimensiones promedio de: **cabeza** 8,5 μ ; **cola** 10 μ ; **largo total** 54,6 μ .

2.3 Evaluación seminal y características del eyaculado porcino

Inmediatamente después de la extracción seminal y durante la conservación, es imprescindible determinar la calidad de los eyaculados para garantizar su funcionalidad y su capacidad fértil.

El semen debe mantenerse en todo momento en condiciones óptimas de temperatura (20°C) ya sea diluido o no con un diluyente apropiado, en casos en que la evaluación no pueda hacerse de inmediato. En dicha evaluación, se analizan los siguientes parámetros:

- **Color:** se puede evaluar a simple vista, considerándose normales las muestras que presenten un color gris a blanco grisáceo. En caso de observarse un color distinto es signo de contaminación, como por ejemplo color rojo (presencia de sangre) o amarillo (orina, bacterias).
- **Concentración espermática:** la cantidad total de espermatozoides por eyaculado es un parámetro importante ya que refleja indirectamente la capacidad de producción gonadal y de almacenamiento en las reservas no gonadales del aparato genital del verraco (**Amann, 1981**). Para evaluarla, se pueden usar tanto métodos manuales como el conteo en cámara de Bürker, como métodos electrónicos que proporcionan más objetividad (técnicas de espectrofotometría o refractometría, entre otras).
- **Motilidad espermática:** la motilidad se estima generalmente de forma subjetiva, es decir, un operador estima el porcentaje de espermatozoides que muestran motilidad progresiva y lineal. En un eyaculado considerado normal, la motilidad espermática es de manera habitual superior a un 70%. Debido a que este parámetro se evalúa de forma subjetiva y es muy susceptible de ser influenciado por el operario, se usa el sistema informático CASA (Computer Assistent Sperm Analysis), que proporciona datos más objetivos y permite medir el porcentaje de espermatozoides motiles, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y la velocidad de movimiento (**Stornelli y de la Sota, 2006**) (**Tabla 1**).
- **Morfología:** la evaluación morfológica del semen es de enorme valor diagnóstico y requiere de un manejo adecuado de las muestras a analizar. Dicha evaluación incluye la localización de anomalías presentes en las distintas partes del espermatozoide como la cabeza (incluyendo acrosoma), pieza media (incluyendo la presencia de gotas citoplasmáticas) y cola. En el cerdo se consideran parámetros normales de morfología cuando las anomalías de cabeza espermática no sobrepasan el 10% y cuando ninguno de los otros parámetros (acrosomas, pieza media, cola, gotas citoplasmáticas proximales) sobrepasan el 5% cada uno o el 10-15% del total (**Rodríguez-Martínez, 2005**) (**Tabla 1**).

	Rangos de aceptabilidad
Volumen eyaculado (ml)	100-300
Nº total espermatozoides ($\times 10^9$)	10-100
Motilidad progresiva (%)	70-90
Anormalidades cabezas espermáticas (%)	2 - 5
Gotas citoplasmáticas proximales (%)	1 - 5
Defectos de acrosoma (%)	1 - 2
Anormalidades pieza media (%)	2 - 5
Colas dobladas (%)	1 - 5

Tabla 1. Rangos de aceptabilidad del eyaculado porcino (Rodríguez-Martínez, 2005).

2.4 Conservación seminal

Durante los últimos años, la inseminación artificial se ha convertido en la técnica más utilizada en la especie porcina debido a todos los avances y mejoras que se han ido produciendo en los protocolos de conservación del semen, además de las numerosas ventajas que ofrece respecto a la monta natural.

Los espermatozoides pueden conservarse durante largos periodos de tiempo mediante la reducción de su actividad metabólica, lo cual puede conseguirse mediante la dilución en un medio adaptado a cada especie y una reducción adecuada de la temperatura (Pinto et al., 1999). Tanto la refrigeración como la congelación, se consideran los principales métodos utilizados para disminuir el metabolismo basal del semen, el cual puede conservarse y prolongar la vida espermática sin ver afectada su capacidad fecundante (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001).

Uno de los principales problemas en los procesos de conservación del semen es el conjunto de alteraciones que se producen en el espermatozoide, conocidas colectivamente como “choque térmico”. En este proceso se produce una disminución e irregularidad de la motilidad, alteración de la membrana acrosomal y plasmática y pérdida de componentes intracelulares de los espermatozoides (Watson, 1990), además, son observables otras lesiones como la disminución de la producción energética y el aumento de la permeabilidad de membrana.

Para que el semen mantenga su capacidad fecundante y no se produzcan daños durante su almacenamiento a 16°C, es imprescindible que se cumplan una serie de condiciones como utilizar un diluyente de larga duración; diluir en un periodo inferior a 15 minutos desde la recogida del semen, con una dilución semen: diluyente entre 1:4 y 1:25 (siendo el grado óptimo de dilución 1:10) a 37°C; descender lentamente la temperatura de 37°C a 23°C (durante 1,5-2 horas), a la temperatura ambiente del laboratorio (20 - 25°C) y posteriormente introducir en la estufa a 16°C (**Kubus 2010**).

2.4.1 Rooibos como solución al choque térmico

Recientemente, y para reducir los daños producidos por el choque térmico a la hora de llevar a cabo un almacenamiento bien en refrigeración o bien en congelación, **Ros-Santaella y Pintus (2017)** realizaron un estudio sobre el efecto del extracto de rooibos (*Aspalathus linearis*) en la conservación seminal. Rooibos es una planta característica de Sudáfrica que en las últimas décadas ha ganado mucha popularidad debido a sus propiedades medicinales y antioxidantes.

En el presente estudio se observó que, en general, la motilidad de los espermatozoides del verraco disminuía, pero se veía claramente influenciada por diferentes extractos de rooibos. Sobre todo, los mejores efectos sobre la motilidad espermática se consiguieron con tratamientos de rooibos fermentados.

Además de actuar sobre la motilidad espermática, también tienen efecto sobre la integridad de membrana y el acrosoma. En el estudio se vio que, sin tratamiento con rooibos fermentados, el porcentaje de espermatozoides con la membrana intacta durante el almacenamiento disminuía de manera significativa a las 96 horas.

En la actualidad, las dosis de semen vendidas por empresas son, a menudo, diluidas con diluyentes comerciales, que consecuentemente se traduce en una reducción del plasma seminal si se compara con semen sin diluir. Recientemente, se demostró la influencia positiva del plasma seminal del verraco en la calidad espermática durante el almacenamiento, ya que, mantiene la motilidad espermática, protege la estructura del acrosoma y mantiene la integridad de membrana. Sin embargo, al diluir las dosis, esas propiedades disminuyen. (**Barranco et al., 2015**). El plasma seminal posee esas características debido probablemente a la presencia de numerosos componentes químicos con funciones antioxidantes (**Koziorowska-Gilun et al., 2011**). Por este motivo, se añade el diluyente, cuyo objetivo es amortiguar la pérdida de esas propiedades e incluso, mejorar los parámetros que aportaba el plasma seminal.

La adición de antioxidantes en el diluyente de conservación de semen porcino se ha convertido en una práctica habitual de las empresas que lo comercializan, sin embargo, añadir dichos antioxidantes hace que aumente el precio de las dosis. Como alternativa a los antioxidantes, en el presente estudio se probaron los efectos del extracto de rooibos añadido directamente al semen, obteniendo resultados positivos en numerosos parámetros como la motilidad y el mantenimiento de la integridad de membrana y acrosoma durante el almacenamiento del semen hasta las 96 horas.

Se comprobó que los mejores resultados de almacenamiento se obtenían con una adecuada concentración de rooibos fermentados y que además ofrecen una ventaja importantísima ya que son una alternativa barata y natural de los antioxidantes en el almacenamiento del semen porcino.

2.4.2 Diluyentes seminales

Una vez que se ha producido la extracción, el eyaculado debe ser procesado, diluido y enfriado de manera particular en función de sus características, lo que permite su preservación a lo largo del tiempo y que permanezca fértil (**Iguer-Ouada y Verstegen, 2001**). Para que esto pueda llevarse a cabo, es necesario añadirle diluyentes seminales, soluciones acuosas que permiten aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias y preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado (**Gadea, 2003**).

Las peculiares particularidades que presenta el espermatozoide porcino hacen que sea muy sensible al shock por frío, produciendo una alteración de la viabilidad espermática. Esta susceptibilidad al choque por frío supone que en la práctica las muestras seminales deban ser conservadas a 15-20°C, ya que una reducción en la temperatura de almacenamiento limita la viabilidad de las muestras seminales (**Paulenz et al., 2000**).

Por otro lado, el efecto de dilución lleva a que determinados compuestos presentes en el plasma seminal estén en muy bajas concentraciones en el semen diluido y alteren la viabilidad espermática, como por ejemplo la reducción de la concentración de potasio o de proteínas plasmáticas (**Harrison et al., 1978**).

Estas sustancias tienen la capacidad de aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de los espermatozoides, proteger sus membranas de los daños que ocasionan los cambios de temperatura, además de, estabilizar el pH, evitar el desarrollo microbiano o controlar la osmolaridad y la concentración iónica del medio (**Forsberg-Linde, 1991; Johnston et al., 2011; Savignone et al., 2007**).

Los diluyentes se han clasificado en dos grandes grupos, los que tienen como objetivo la conservación a corto plazo (menos de 1-3 días), o aquellos que tienen por objetivo la conservación a largo plazo (más de 4 días) (**Tabla 2**). Las ventajas que aportan los diluyentes de larga duración son la posibilidad de transporte a largas distancias, permiten realizar pruebas diagnósticas sobre el semen antes de ser utilizadas (como PCR para detectar la presencia de diversos virus o análisis completos de la calidad seminal), permite una mejor organización de las tareas en los centros de recogida seminal y facilita en gran medida la distribución de las muestras a las granjas de reproducción (**Gadea, 2003**).

Los diluyentes más utilizados son los que contienen una base de TES (N-Tris hidroximetil-2-aminometano ácido sulfónico) o TRIS (Tris hidroximetilaminometano) con ácido cítrico, al que se le agregan diferentes sustancias como macromoléculas protectoras de membrana (lipoproteínas de yema de huevo, proteínas de la leche, glicoproteínas), azúcares energéticos permeables (fructosa, glucosa), crioprotectores (glicerol, propanodiol, etilenglicol, dimetilformamida) o antibióticos (penicilina, estreptomina) (**Savignone et al., 2007**). Los diluyentes con yema de huevo mantienen la calidad espermática durante periodos más largos de refrigeración y con valores superiores de motilidad y viabilidad (**Rota et al., 1995; Johnston et al., 2011**), aunque no es imprescindible para periodos de conservación menores de 3 días. Esto se debe a que la yema de huevo aporta lipoproteínas de baja densidad, principalmente fosfolípidos que actúan estabilizando la membrana plasmática de los espermatozoides, manteniendo su funcionalidad (**Stornelli et al., 2006**).

Desafortunadamente, este compuesto es biológicamente peligroso ya que es una fuente de contaminación a la vez que favorece el crecimiento de microorganismos debido a las características de su composición bromatológica (**Farstad, 2009**). Los diluyentes tienen una composición básica similar a la de cualquier medio de cultivo bacteriano, por lo que pueden favorecer el crecimiento microbiano y la contaminación.

En cuanto a los diluyentes empleados en los procesos de congelación del semen porcino se puede decir que están basados en la utilización de yema de huevo y glicerol como agentes crioprotectores, una concentración elevada de azúcares y la adición de un agente detergente. De los diluyentes utilizados destacamos el medio lactosa-yema de huevo que es el empleado de manera más frecuente y el descrito por Pursel y Johnson denominado BF-5, en cuya composición se incluye glucosa, yema de huevo y TRIS como agente regulador del pH, que se utiliza en los procesos de congelación en píldoras (pellets) sobre nieve carbónica (**Gadea, 2003**).

Corta duración (1-3 días)	Larga duración (más de 4 días)
Beltsville Liquid (BL-1)	Acromax®
Beltsville Thawing Solution (BTS)	Androstar®
Illinois Variable Temperature (IVT)	Modena®
Kiev®	MR-A®
Vital®	Mulberry III®
	Reading®
	X-Cell®
	Zorlesco
	Zorpva

Tabla 2. Tipos de diluyentes según su duración (**Gadea, 2003**).

2.5 Agentes contaminantes del semen porcino

Para poder llevar a cabo la inseminación, es necesaria la elaboración de dosis seminales y para ello hay que empezar recogiendo el semen. Este último, puede verse contaminado durante dicha recolección, y esto se da en mayor o menor medida en función de la técnica que se use.

El semen de verraco se recoge generalmente por el método de mano con guantes, lo que permite posibilidades de contaminación bacteriana durante el proceso de recogida, así como durante el procesamiento posterior del semen. El personal también representa una fuente de contaminación para el semen y, además, las bacterias ambientales se encuentran en las superficies y en el aire del laboratorio de procesamiento, así como el agua para el lavado de equipos procedentes de tanques de agua y tuberías (**Morrell, 2016**).

El eyaculado del verraco puede estar contaminado por diferentes agentes como son virus, bacterias, micoplasmas y otros agentes. Los virus son los que suponen un mayor riesgo ya que, los especialistas reconocen que la mayor parte de éstos pueden encontrarse en el semen pudiendo transmitir enfermedades epizoóticas a nivel de granja (**Decuadro-Hansen, 2000**) (**Tabla 3**).

Enfermedades	Aislamiento viral demostrado en el semen	Riesgo potencial de transmisión
Aujeszky	Sí	Existe
Peste Porcina Clásica	Sí	Existe
Peste Porcina Africana	Sí	Existe
Fiebre aftosa	Sí	Bajo
Ojo azul	Sí	Existe
Enfermedad vesicular	Sí	Bajo
Gripe y TGE*	Sí	Bajo
PRRS	Sí	Existe
Enterovirus**	Sí	Existe
Adenoreovirus	Sí	Bajo
Parvovirus	Sí	Existe

*TGE= Gastroenteritis transmisible. **Incluye Enfermedad de Teshen.

Tabla 3. Transmisión de enfermedades virales por semen de verraco (Decuadro-Hansen, 2000).

La contaminación bacteriana puede darse durante la realización de la técnica (recogida, preparación de dosis, etc.) o estar presente en el propio animal en zonas como pueden ser los testículos y glándulas anexas, prepucio y su divertículo y aparato urinario. Esta flora seminal puede ser banal o potencialmente patógena (Tabla 4).

1. Aerobacter	11. Klebsiella
2. Alcaligenes	12. Micrococcus
3. Bacillus (subtilis, cereus)	13. Moraxella
4. Bacteroides	14. Neisseria
5. Bordetella bronchiseptica	15. Peptostreptococcus
6. Brucella suis	16. Proteus
7. Citrobacter	17. Pseudomona aeruginosa
8. Corynebacterium (Suis, pyogenes)	18. Serratia
9. E.coli	19. Staphylococcus (epidermidis, aureus)
10. Enterobacter	20. Streptococcus (D, L, C, E... y hemolítico)

Tabla 4. Principales bacterias encontradas en el semen de verraco (Decuadro-Hansen, 2000).

Otros patógenos contaminantes encontrados, pero de manera más ocasional, son micoplasmas (*hyopneumoniae*, *hyorinis* y *verecundum*) y los ureoplasmas, sin embargo, no existe consenso general respecto a su presencia en el semen, ya sea debido a la baja frecuencia de aislamientos realizados a partir de muestras de semen o a las dificultades prácticas para poner en evidencia estos agentes por cultivo microbiológico. Podrían encontrarse también levaduras, pero probablemente, serían resultado de una contaminación exógena.

Las bacterias tienen un efecto negativo sobre la calidad de los espermatozoides, ya sea por la competencia directa con los espermatozoides por los nutrientes que aporta el diluyente seminal o por la producción de subproductos metabólicos tóxicos y endotoxinas (**Morrell y Wallgren, 2014**). Los efectos negativos observados son tales como la disminución de la motilidad y viabilidad de los espermatozoides, reacción prematura del acrosoma o aglutinación de espermatozoides (**Imagen 2**). Además, las bacterias pueden causar la producción de anticuerpos dirigidos contra el complejo glicocálico de los espermatozoides dando lugar a su destrucción (**Morrell, 2016**).

Por otra parte, las bacterias pueden causar inflamación o enfermedad en las hembras inseminadas. Esto se debe a que, de manera natural, el tracto reproductivo femenino ha desarrollado mecanismos de defensa frente a la contaminación a la que se ve expuesto durante la monta natural, como son la eliminación del semen excedente del útero a través del reflujo y la activación de varios mecanismos inmunes para atacar y eliminar las bacterias antes de la llegada del embrión al útero para su implantación. El problema viene porque esta exposición con la inseminación artificial no se da, por lo que la hembra carece de esa defensa natural, siendo más susceptible a infectarse. Algunas de las enfermedades que se han relacionado con una inseminación realizada con semen contaminado son descarga vulvar, reducción del tamaño de la camada, muerte embrionaria o fetal, endometritis e infección sistémica (**Morrell, 2016**).



Imagen 2. Aglutinación de espermatozoides debido a contaminación bacteriana (**Kubus, 2010**).

2.5.1 Métodos para reducir la carga bacteriana de los eyaculados

Las muestras de semen que se van a utilizar para la preparación de dosis de inseminación podrían estar contaminadas, bien desde el propio animal o bien durante el proceso de recogida y procesamiento. Dicha contaminación, sobre todo la que se produce de manera natural en el animal suele ser baja, pero hay que tener en cuenta que, al incluir los diluyentes necesarios para la preparación de dosis se favorece el crecimiento de agentes contaminantes. La proliferación de estos agentes contaminantes se debe a que los diluyentes además de permitir la supervivencia de los espermatozoides permiten la multiplicación de patógenos porque aportan las condiciones óptimas para ello.

Para evitar esto, lo que se ha venido haciendo es añadir una serie de antibióticos a los diluyentes para frenar el crecimiento de patógenos que pudieran ocasionar problemas. Esta práctica que se hizo cada vez más habitual tuvo que ser regulada por directrices nacionales e internacionales con el fin de establecer el tipo y cantidad de antibióticos que pueden contener las dosis seminales que posteriormente se comercializarán (**Morrell, 2016**).

Aún con las regulaciones establecidas, el uso de antimicrobianos siempre plantea problemas ya que muchos tienen un efecto perjudicial sobre la supervivencia de los espermatozoides, y la elección de agentes que pueden añadirse a los diluyentes del semen es limitada. Existe la tendencia de usar una mezcla de antimicrobianos de amplio espectro, altamente potentes, cada uno a una concentración menor de la que se requeriría individualmente en un esfuerzo por reducir la toxicidad espermática. Sin embargo, incluso una pequeña cantidad de uso de antibióticos puede dar lugar al desarrollo de resistencias dentro de una especie animal, por lo tanto, sería prudente reducir el uso de antibióticos tanto como sea posible (**Morrell y Wallgren, 2014**).

Para tal fin, España se acoge a la **Decisión de la Comisión de 10 de septiembre de 1999 que modifica los anexos de la Directiva 90/429/CEE del Consejo por la que se fijan las normas de policía sanitaria aplicables a los intercambios intracomunitarios y a las importaciones de espermatozoides de animales de la especie porcina**, en cuyo punto 2 del anexo C perteneciente al Capítulo II, cita:

“(2) Una combinación de antibióticos, eficaces en particular contra leptospiros y micoplasmas, deberá añadirse al espermatozoides, previa disolución final o bien al diluyente. En el caso del espermatozoides congelado, deben añadirse los antibióticos antes de proceder a la congelación.

Dicha combinación deberá tener, al menos, un efecto equivalente a las disoluciones siguientes:

- 500 µg de estreptomicina por mililitro de disolución final
- 500 UI de penicilina por mililitro de disolución final
- 150 µg de lincomicina por mililitro de disolución final
- 300 µg de espectinomicina por mililitro de disolución final

Inmediatamente después de añadir los antibióticos se deberá conservar el esperma diluido a una temperatura de al menos 15°C durante 45 minutos como mínimo.”

En 2014, **Morrell y Wallgren**, realizaron un análisis de riesgos y beneficios sobre el uso de antibióticos en los diluyentes seminales que se puede resumir en la **Tabla 5**. A parte del uso de antibióticos, las autoridades competentes, tanto nacionales como internacionales, han establecido una serie de normas en cuanto a las medidas de higiene a seguir durante todo el proceso, tanto en la realización de cada paso como medidas de higiene del personal que trabaja en los centros de inseminación o producción seminal, para evitar en la medida de lo posible la contaminación exógena por procesamiento.

Además, tanto los centros de inseminación como los animales que a ellos llegan deben cumplir una serie de normas reguladas mediante decisiones de la Comunidad Europea (**Directiva 90/429/CEE**), para garantizar una calidad sanitaria elevada, sin riesgo de transmisión de enfermedades. Algunas de estas medidas son la distancia mínima que debe existir entre los centros de producción seminal y las granjas, el control del personal y animales que tienen acceso al mismo o controles a realizar a los animales que entren como reproductores, entre otras.

	Riesgo	Beneficio
NO ANTIBIÓTICO	Las bacterias compiten con los espermatozoides por nutrientes en el extensor de semen, producen subproductos tóxicos y LPS; Puede causar enfermedad en las hembras después de la IA.	No hay toxicidad antibiótica para los espermatozoides; No hay riesgo de contribuir a la propagación de la resistencia a los antibióticos.
ANTIBIÓTICO	Puede ser tóxico para los espermatozoides; Las bacterias encontradas en el semen pueden ser resistentes a los antibióticos; Puede conducir a la contaminación del ambiente; Puede conducir al desarrollo de resistencia a los antibióticos; Puede liberar LPS.	Mata a las bacterias contaminantes antes de tener la oportunidad de crecer o competir por nutrientes en el extensor de semen; Las bacterias no son transferidas a la hembra a través de la IA (a menos que sean resistentes).

Tabla 5. Uso de antibióticos en diluyentes seminales porcinos (Morrell y Wallgren 2014).

Como se ha venido comentando en todos los puntos tratados anteriormente y, valorando los riesgos y beneficios que tiene el uso de antibióticos en la preparación de dosis seminales, resultaría del todo conveniente encontrar alternativas a los antimicrobianos para controlar los microorganismos en las dosis de semen para inseminación artificial ya que, sería beneficioso tanto para mejorar la calidad de los espermatozoides y la supervivencia y para frenar el desarrollo de la resistencia a los antibióticos (Morrell, 2016).

3. Justificación y objetivos

El uso incorrecto e indiscriminado de los antibióticos en conservación seminal y en lo que se refiere a la producción de dosis seminales en ganado porcino, se ha convertido en la actualidad en una praxis habitual. La mayoría de los diluyentes que se usan en reproducción animal tienen en su composición diferentes mezclas de antimicrobianos de amplio espectro a una baja concentración, siendo éste el motivo por el cual la nueva legislación europea tuvo que intervenir para regular el uso incorrecto de los antibióticos.

Además, se está produciendo un aumento significativo de las resistencias bacterianas en el ámbito veterinario, lo que hace necesario buscar diferentes alternativas para reducir todo lo que se pueda el uso de estas sustancias.

Es por estos motivos que en este estudio se plantean los siguientes objetivos:

- Estudiar los métodos existentes para reducir los agentes contaminantes que se pueden encontrar en el eyaculado porcino y los diferentes métodos de conservación que se utilizan en reproducción animal.
- Evaluar las ventajas e inconvenientes del uso de antibióticos en los diluyentes seminales que se emplean en la especie porcina.
- Conocer las alternativas existentes a los antimicrobianos y su forma de interacción con el semen para determinar si realmente son alternativas fiables que permitan sustituir a los antibióticos.

4. Metodología

Para la realización de este estudio, se va a llevar a cabo una revisión bibliográfica de artículos relacionados con la reproducción animal, en los cuales, se analizan las diferentes alternativas que se encuentran en investigación para reducir el uso de antibióticos en la conservación de dosis seminales.

Dicha revisión se apoyará en la búsqueda en plataformas digitales, como *Pubmed*, *Scihub*, *Web of Science*, *Google Scholar*, páginas web como www.3tres3.com o www.porcicultura.com, y revistas científicas. Para una localización más rápida y adecuada de la información se utilizarán palabras clave como “espermatozoide porcino”, “verraco”, “diluyente”, “conservación seminal”, “semen”, “antibióticos”, “contaminantes semen”.

5. Resultados y discusión

Los antibióticos son de gran importancia en los extensores de semen para asegurar una larga vida útil de los espermatozoides y para reducir la transmisión de patógenos en el tracto reproductivo de la hembra. Sin embargo, los antimicrobianos pueden tener un efecto perjudicial sobre la supervivencia de los espermatozoides, limitando así la elección de agentes que pueden añadirse a los diluyentes del semen.

En un esfuerzo por reducir esa toxicidad, se utiliza una mezcla de estos agentes de amplio espectro, altamente potentes, pero cualquier uso de ellos puede contribuir al desarrollo de resistencias y, esa resistencia, puede ser transferida a otras bacterias presentes en otras especies. Por este motivo, ha resultado esencial investigar posibles alternativas al uso de antibióticos y, algunas de ellas, se revisarán a continuación (**Morrell, 2016**).

5.1 Centrifugación coloidal del semen

A lo largo de los años, se han desarrollado diferentes tipos de técnicas de selección espermática (migración, filtración o centrifugación coloidal a través de coloides), cuyo principal objetivo es eliminar el plasma seminal, restos de diluyentes o ciertas partículas contaminantes, a la vez que recuperar a los espermatozoides que ofrezcan una mejor calidad para la fecundación (**Morrell y Wallgren 2011**).

En 2016, **Maes et al.**, informaron del uso de la centrifugación coloidal del semen como un medio para separar físicamente los espermatozoides de las bacterias en el eyaculado, la cual, podría ser una alternativa eficaz a la adición de antibióticos a los diluyentes seminales sobre todo si se combina con una mejora en las técnicas de crioconservación del semen. En concreto, la centrifugación a través de coloides con diferente densidad se ha utilizado para la selección de espermatozoides en la reproducción asistida (**Morrell et al., 2009**).

Estos coloides constan de partículas de sílice coloidal cubiertas con sileno, un material no tóxico e ideal para la separación de materiales biológicos. Esta técnica, aprovecha la diferente densidad de los espermatozoides de modo que, aquellos que presentan mejor motilidad y morfología irán al fondo del tubo tras la centrifugación, aislándose de otros constituyentes que se acumulan en el coloide.

La técnica más común se basaba en la utilización de coloides de diferente densidad, sin embargo, actualmente existe un método de selección de espermatozoides mediante centrifugación que ha sido desarrollada por **Morrell et al. (2008)**, el cual emplea una sola capa de coloide o Single Layer Centrifugation (SLC).

Esta técnica es más simple que la centrifugación a diferentes gradientes, pero en primera instancia, igual de eficaz. Ha sido utilizada satisfactoriamente para separar espermatozoides motiles, con la cromatina intacta y morfológicamente normales del resto del eyaculado (**Morrell et al., 2009**).

Recientemente, se han desarrollado diferentes formulaciones para usarse en reproducción asistida tanto humana como animal, incluida también la especie canina (Androcoll-C®) (**Morrell y Rodríguez-Martínez, 2011**).

La centrifugación coloidal del semen porcino ha sido realizada esporádicamente durante al menos 20 años, comenzando con la centrifugación por gradiente de densidad y llegando a la más reciente, que es la centrifugación en una sola capa.

En 2014, un estudio de **Morrell y Wallgren**, demostró que el procesamiento mediante SLC de eyaculados de verraco usando Androcoll-P®, el cual es un coloide usado en el procesado de semen de la especie porcina, es capaz de procesar toda la fracción rica en espermatozoides, mejorando tanto la supervivencia a la congelación del espermatozoide como la capacidad fertilizante de los espermatozoides descongelados.

Durante la realización de este estudio, se observó que la separación de espermatozoides y bacterias fue más efectiva para algunas bacterias que para otras, dependiendo de si las bacterias poseían un flagelo o podían adherirse a los espermatozoides, pero también de su tamaño y si podían agregarse. Otro factor determinante parecía ser si la centrifugación coloidal se llevó a cabo inmediatamente después de la recogida del semen o después de varias horas de almacenamiento. Curiosamente, hubo alguna indicación de que las bacterias que habían tenido éxito al pasar a través del coloide mostraban una capacidad reducida para multiplicarse a pesar de la falta de antibióticos en la formulación coloidal.

Los resultados del estudio sugieren que el control de la contaminación bacteriana en el semen de porcino puede ser posible sin el uso de antibióticos, pero aún con todo, la centrifugación coloidal debe utilizarse como un complemento a la estricta higiene en la manipulación y conservación de las muestras, no como un reemplazo.

5.2 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAM) son compuestos naturales de aminoácidos, tóxicos para las bacterias y que se pueden encontrar en casi todos los organismos como una primera defensa contra los gérmenes (www.portalveterinaria.com, 2014). Los PAM endógenos son péptidos de defensa y componentes importantes del sistema inmune innato, exhiben un alto potencial para eliminar una amplia gama de patógenos, poseen acción inmunomoduladora, actúan como quimiocinas, promueven la cicatrización de heridas y modulan la respuesta de las células dendríticas en el sistema inmune adaptativo.

Además de su actividad antimicrobiana, participan en la proliferación celular y la angiogénesis. Gracias a estas propiedades se ha visto que se podrían usar, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades periodontales (Michea et al., 2016).

Se componen generalmente de secuencias cortas de aminoácidos (aproximadamente 10-50), con composición y estructura muy diversa. Dependiendo de su tamaño, estructura y la organización de aminoácidos que los conforman, se pueden agrupar en 3 familias: defensinas, catelicidinas y lactoferrinas (Schulze et al., 2016).

La carga catiónica y la anfipaticidad son las principales características que determinan su actividad selectiva sobre las membranas bacterianas ya que éstas, son ricas en lípidos cargados negativamente, a diferencia de las membranas eucariotas. Las interacciones electrostáticas impulsan la acumulación de péptidos catiónicos en las membranas bacterianas cargadas negativamente que, al interaccionar, producen cambios conformacionales destruyendo la membrana bacteriana. La ausencia de lípidos aniónicos y el alto contenido de colesterol que contienen disminuyen la actividad citolítica y citotóxica de los PAM contra las células eucariotas (Schulze et al., 2014).

Los PAM catiónicos están siendo actualmente estudiados como agentes antimicrobianos en la conservación del semen porcino y, a pesar de la necesidad urgente de encontrar alternativas a los antibióticos en los diluyentes, los informes sobre posibles nuevos antimicrobianos han sido escasos.

En 2016, Schulze et al., determinaron el efecto de dos hexapéptidos cíclicos (**c-WWW** y **c-WFW**) y el derivado helicoidal magainina II amida (**MK5E**), el cual no es tóxico para las células eucariotas mientras que mantiene una alta eficacia contra procariotas, sobre la calidad del semen de verraco durante el almacenamiento a 16°C durante 4 días.

Los resultados de este estudio revelaron efectos negativos dependientes de la concentración del péptido en la motilidad e integridad de la membrana de los espermatozoides. Sin embargo, estos efectos fueron mucho más pronunciados para MK5E que para muestras suplementadas con hexapéptidos. Cuando se usaban bajas concentraciones de hexapéptidos cíclicos, la calidad del semen era comparable a la que se tenía con el diluyente con antibióticos convencionales durante el almacenamiento. Esta suplementación con hexapéptidos dio como resultado un movimiento más progresivo y lineal y una velocidad media ($\mu\text{m/s}$) de los espermatozoides más alta.

El estudio concluyó que el semen porcino suplementado con c-WFW dio como resultado tasas normales de fertilidad después de la inseminación artificial.

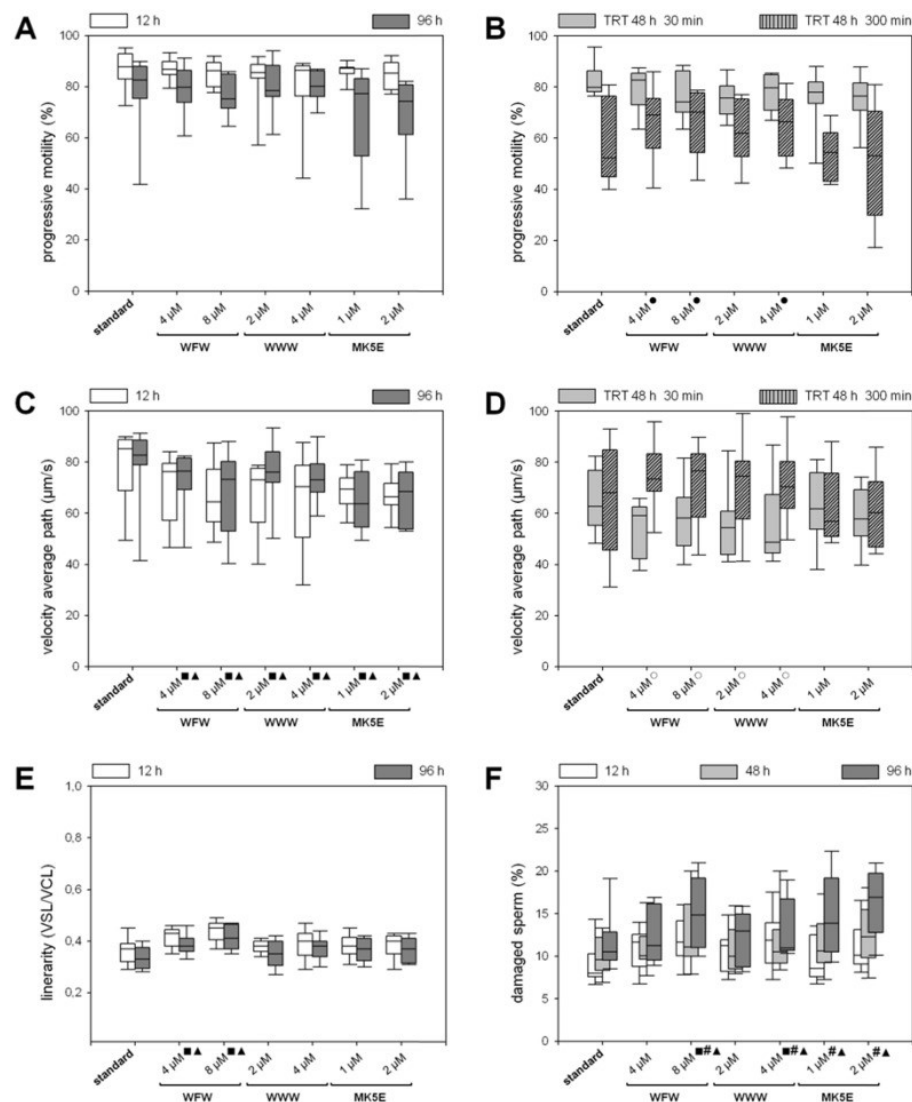


Imagen 3. Parámetros de movimiento y porcentaje de daño de los espermatozoides con presencia de gentamicina (standard) y concentraciones crecientes de WFW, WWW y MK5E, desde las 12 horas de almacenamiento hasta las 96 (Schulze et al., 2014).

Una segunda investigación llevada a cabo en 2014 por **Speck et al.**, abordó la idoneidad de los PAM como alternativas a los antibióticos convencionales en la conservación en fresco del semen porcino. La actividad antibacteriana de c-WWW, c-WFW y MK5E se estudió *in vitro* contra 2 bacterias gran-positivas y 11 gram-negativas incluyendo cepas de referencia como *Escherichia coli* *multirresistente* y otros cultivos aislados de semen porcino. Se determinaron concentraciones inhibitorias mínimas para todos los péptidos y, todos los PAM, mostraron reactividad a la mayoría de las bacterias, excepto *Proteus spp.* (todos los PAM) y *Staphylococcus aureus* (MK5E). Además, se demostró la acción sinérgica utilizando hexapéptidos en combinación con una pequeña cantidad de gentamicina que actúa contra el crecimiento bacteriano en semen de porcino *in situ*.

Bacteria	MIC (μg/mL) determined for gentamicin	MIC (μg/mL) determined for gentamicin when combined with	
		c-WWW (2 μM)	MK5E (1 μM)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.45–0.9*	0.6–0.7	0.6–0.8
<i>Escherichia coli</i> DH5α	0.113	0.3–0.5	0.2–0.5
<i>Escherichia coli</i> (hemolytic)	0.45	0.8–0.9	0.9
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.113–0.225	0.2–0.4	0.3–0.4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.225–0.45	0.4–0.7	0.5–0.6
<i>Proteus myxofaciens</i>	0.45–0.9	0.7–0.9	0.7–0.9
<i>Proteus vulgaris</i>	0.45	0.6–0.8	0.5–0.8
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 347	0.113	0.05–0.1	0.1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0.225–0.7*	0.6–0.7	0.5–0.6

Imagen 4. Concentración mínima inhibitoria (MIC) determinada para gentamicina y cuando se combina con c-WWW o MK5E (**Speck et al., 2014**).

Por otra parte, se observó que la presencia de NaHCO_3 aumentaba significativamente la actividad de los PAM contra las bacterias. Los resultados sugieren que el uso de PAM, aunque no ofrece una alternativa completa a los antibióticos tradicionales, promete soluciones para reemplazar a estos y, por lo tanto, limitar la selección de cepas bacterianas multirresistentes.

Otro grupo de péptidos, ricos en aminoácidos específicos tales como arginina, fenilalanina o triptófano, se producen como agentes antimicrobianos de proteínas naturales y también son candidatos prometedores para el desarrollo de PAM eficaces debido a su selectividad bacteriana, la estabilidad proteolítica y resistencia termodinámica. Además, el riesgo de respuesta inmune es limitado debido a su pequeño tamaño.

Recientemente, estudios sobre péptidos antimicrobianos endógenos porcinos como PMAP-36, PMAP-37 y PR-39 determinaron el efecto citotóxico e inhibitorio del crecimiento bacteriano en el almacenamiento de las dosis (**Bussalleu et al., 2017**), mientras otros PAM endógenos como las beta-defensinas 1 y 2, o la protegrina 1 no poseían ese efecto (**Puig-Timonet et al., 2018**).

5.3 Plasma seminal microfiltrado

La microfiltración es una tecnología común utilizada para reducir la contaminación bacteriana, pero puede retener sustancias seminales que influyen en la calidad espermática durante el almacenamiento.

Para comprobar si resultaba útil emplearlo a mayor escala, **Barone et al.**, realizaron en 2016 un estudio preliminar, con un tamaño pequeño de muestras en el que se comparaban dosis que habían sido microfiltradas con y sin antibióticos, con otras sin microfiltrar de las mismas características.

Se observó que las dosis de inseminación con microfiltrado y sin adición de antibióticos preservaron la viabilidad de los espermatozoides, el potencial de membrana mitocondrial, la integridad del acrosoma y la motilidad objetiva, con valores absolutos iguales o incluso mejores que los observados en dosis convencionales.

En conclusión, este estudio sugiere que la microfiltración puede ser un método simple y factible en las granjas para sustituir el uso de antimicrobianos en dosis seminales almacenadas a 16°C durante un periodo de tiempo de hasta 7 días, pero, habría que investigarlo más porque no hay evidencia científica suficiente como para demostrarlo de forma exacta.

5.4 Materiales de envasado de las dosis seminales

Hoy en día, muchas de las empresas dedicadas a la producción de materiales para la reproducción, han apostado por solucionar el problema de las resistencias bacterianas creando productos que permitan inhibir la proliferación bacteriana en las muestras seminales sin necesidad de añadir antibióticos. Una muestra de ello es la bolsa de almacenamiento de dosis seminales, creada por IMV Technologies y llamada BactiBag®.

BactiBag® consiste en una bolsa de almacenamiento cuyo interior ha sido recubierto con BactiGuard, una molécula bacteriostática, que cuando está en contacto con la bacteria se intercala en las membranas celulares bacterianas y altera las actividades de las membranas sin provocar fugas de componentes intracelulares. De este modo, las membranas son más porosas y permite prevenir tanto la apropiación de nutrientes como el desarrollo bacteriano. BactiGuard, a su vez, también bloquea la biosíntesis de ácidos grasos, que es necesaria para la multiplicación de las bacterias (www.imv-technologies.com, 2018).

Esto tiene dos efectos: desaceleración significativa de la multiplicación de bacterias y aumento de la permeabilidad de las membranas bacterianas (especialmente las gram-negativas) y, por tanto, de la eficacia del antibiótico.

5.5 Conservación del semen de verraco a 5°C sin antibióticos

En 2020, **Paschoal et al.**, han publicado un estudio cuyo objetivo es determinar un rango de velocidad de enfriamiento óptimo para el semen de verraco, que se almacena a 5°C en un diluyente sin antibióticos. La reducción de la temperatura convencional de almacenamiento de los espermatozoides de 17 a 5°C, se propuso como un concepto novedoso para eliminar el uso de antibióticos en los diluyentes seminales (**Waberski et al., 2019**). Sin embargo, el daño causado por el frío a los espermatozoides es una preocupación importante ya que, este hecho, impide su uso a gran escala. En comparación con otras especies, la sensibilidad de los espermatozoides de porcino se asocia a una baja proporción de esteroides/fosfolípidos y a una transición de fase termotrópica en los lípidos de membrana entre 30 y 10°C (**Schmid et al., 2013**).

En el presente estudio, se demostró que la pérdida de motilidad e integridad de membrana causada por un enfriamiento inicial rápido, se hace cada vez más evidente durante el almacenamiento habitual de semen a 17°C y, podría ser incluso más pronunciada a 5°C. En consecuencia, se recomendó llevar a cabo un enfriamiento lento con tiempos de mantenimiento a temperatura ambiente antes del almacenamiento a 17°C (**Schulze et al., 2013**).

Se estableció un rango de velocidad de enfriamiento para el semen de verraco de 0,01 a 0,09°C/min para reducir la temperatura de 30 a 25°C, seguido de 0,02 a 0,06°C/min para llegar a 10°C y, por último, de 0,01 a 0,02°C/min para alcanzar la temperatura de almacenamiento final (**Paschoal et al., 2020**). Las velocidades de enfriamiento moderadas y lentas permiten mantener alta la calidad del espermatozoide, aunque se almacene durante largos periodos de tiempo, pero para ello, previamente se debe utilizar un extensor protector que ha demostrado preservar las características de los espermatozoides y su capacidad de fertilización durante el almacenamiento a 5°C (**Waberski et al., 2019**).

Aunque el enfriamiento lento parece ventajoso, se debe considerar el riesgo de crecimiento bacteriano durante este proceso. La presencia de contaminantes bacterianos, principalmente la familia *Enterobacteriaceae* (**Althouse y Lu, 2005**), puede afectar a la viabilidad y la motilidad de los espermatozoides de forma dosis-dependiente. Estudios anteriores mostraron que, esos efectos perjudiciales de las bacterias (*E. coli*, *Cl. Perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*), sólo fueron aparentes cuando dichos agentes estaban en concentraciones muy altas, oscilando entre 10⁶ y 10⁸ UFC/ml (**Pinart et al., 2017; Sepúlveda et al., 2016; Sepúlveda et al., 2014; Sepúlveda et al., 2013**).

6. Conclusiones

Tras la realización de este trabajo en el que se ha llevado a cabo una revisión de las posibles alternativas al uso de antibióticos en los diluyentes de conservación seminal, ha quedado clara la necesidad de encontrar esas alternativas porque el aumento de las resistencias de ciertas cepas bacterianas supone un gran riesgo tanto para la salud humana como animal.

A pesar de ello, todavía no hay muchos estudios ni evidencias científicas claras sobre qué técnicas podrían suponer el reemplazo total de los antimicrobianos, pero sí que están avanzados una serie de firmes candidatos que a medio plazo podrían sustituir a los agentes utilizados en la actualidad.

Por tanto, según se ha ido viendo durante la realización de este estudio, se puede concluir que:

- Usar técnicas que producen la separación física de las bacterias de los eyaculados, como la centrifugación coloidal, permiten mejorar tanto la supervivencia a la congelación del esperma como la capacidad fertilizante de los espermatozoides descongelados, además, reduce al máximo la capacidad de multiplicación de las bacterias.
- El uso de péptidos antimicrobianos permite la inhibición de la multiplicación bacteriana ya que, utilizados a bajas concentraciones, se puede obtener una calidad seminal muy similar a la que se obtendría con el uso de antibióticos, sin embargo, podrían presentar efectos negativos en lo que se refiere a la motilidad e integridad de la membrana del acrosoma del espermatozoide.
- Mantener estrictas medidas higiénicas durante todo el proceso (desde la recogida del semen hasta la inseminación) evita la contaminación de las muestras.
- El empleo de materiales de almacenamiento con sustancias bacteriostáticas permite, sin necesidad de añadir antibióticos, inhibir la proliferación bacteriana.

El primer objetivo marcado para este trabajo, que era conocer distintas formas de reducir la carga microbiana de los eyaculados, se ha cumplido porque se ha visto que los métodos existentes son realmente efectivos para conseguir el objetivo pretendido.

Sin embargo, el segundo objetivo a conseguir, que se basaba en determinar si había alguna técnica que permitiera eliminar los antibióticos de los diluyentes seminales, no se ha conseguido ya que, actualmente, ninguna de las técnicas es lo suficientemente efectiva como para sustituir por completo a los antibióticos.

Conclusions

After carrying out this review, it's been clear the need to find alternatives to the antibiotics in animal reproduction due to the risk that suppose the bacterial resistance to human and animal health. Despite this, there aren't scientific evidences yet on which techniques could lead to the total replacement of antimicrobials, but there are some strong candidates that could, in the medium term, replace the agents that are being currently used.

Therefore, it can be concluded that:

- Using techniques that produce the physical separation of the bacteria from the ejaculates, such as colloidal centrifugation, allow to improve both the survival to freezing of the sperm and the fertilizing capacity of the thawed sperm, in addition, it reduces the multiplication capacity of the bacteria
- The use of antimicrobial peptides allows the inhibition of bacterial multiplication since, used at low concentrations, a seminal quality can be obtained very similar to that obtained with the use of antibiotics, however, they could have negative effects on what refers to the motility and integrity of the sperm acrosome membrane.
- Following strict hygiene measures throughout the process (from semen collection to insemination) avoids contamination of the samples.
- The use of storage materials with bacteriostatic substances allows, without the need to add antibiotics, to inhibit bacterial proliferation.

The first objective for this work, which was to know different ways to reduce the microbial load of ejaculates, has been satisfied because it has been seen that current methods are really effective to achieve the intended objective.

However, the second objective to be achieved, which was based on determining if there was any method that would allow the elimination of antibiotics from the seminal diluents, hasn't been achieved because no one of the techniques is effective enough to replace the antibiotics.

7. Valoración personal

Todavía queda muchísimo por investigar en lo que se refiere a las posibles alternativas al uso de antibióticos en los diluyentes de conservación seminal utilizados en las distintas especies animales, pero, es muy importante y necesario llevarlo a cabo ya que, las resistencias de las cepas bacterianas no sólo tienen consecuencias sobre la sanidad animal, sino también sobre la salud humana. De hecho, debido a sus consecuencias sobre salud pública, resulta imprescindible adaptarse con la mayor brevedad posible a la nueva normativa sobre antimicrobianos que dictan las autoridades.

En esta revisión se ha querido mostrar algunas de las alternativas que se están estudiando hoy en día, algunas ya en fase avanzada de investigación, y el efecto que tienen sobre los diferentes componentes del eyaculado porcino, además, de la capacidad que poseen para inhibir o reducir al máximo el crecimiento bacteriano.

La realización de este trabajo no sólo me ha supuesto poner en práctica todos los conocimientos que he ido adquiriendo a lo largo de los estudios del Grado en Veterinaria, sino también un reto personal al tener que llevar a cabo una exhaustiva revisión bibliográfica ya que, es necesario aplicar cierto rigor científico para elegir información veraz y contrastada, publicada por autores de reconocido prestigio internacional. También, me ha ayudado a ver que, primero tienes que ver el trabajo desde un punto de vista global y pensar en el objetivo que pretendes conseguir para después, poder mostrar la información de forma organizada y encaminada hacia la conclusión final.

Sin embargo, este proyecto no podría haberlo llevado a cabo sin el inestimable apoyo, guía y paciencia que me ha brindado mi director de este Trabajo de Fin de Grado, el Dr. Antonio Del Niño Jesús.

8. Bibliografía

- **Althouse G.C., Lu K.G.**, 2005. *Bacteriospermia in extended porcine semen*. Theriogenology, vol. 63, nº 2.
- **Amann R.P.**, 1981. *A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics*. Journal of Andrology, vol. 2.
- **Barone F., Ventrella D., Bacci M.L.**, 2016. *Can Microfiltered Seminal Plasma Preserve the Morphofunctional Characteristics of Porcine Spermatozoa in the Absence of Antibiotics? A Preliminary Study*. Reproduction in Domestic Animals, vol. 51, nº 4.
- **Barranco I., Tvarijonavičiute A., Perez-Patiño C.**, 2015. *High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility*. Science of Reproduction, vol. 5.
- **Bussalleu E., Sancho S., Bonet S.**, 2017. *Do antimicrobial peptides PR-39, PMAP-36 and PMAP-37 have any effect on bacterial growth and quality of liquid-stored boar semen?* Theriogenology, vol. 89.
- **Climent S., Sarasa M., Latorre R.**, 2013. *Embriología y anatomía veterinaria*. Ed. Acribia, Zaragoza, España. Vol. 2.
- **Decuadro-Hansen, G.**, 2000. *Control sanitario de los verracos en un centro de producción de semen*. 5º Seminario Internacional de Suinocultura, Expo Center Norte, Sao Paulo.
- **Farstad W.**, 2009. *Cryopreservation of canine semen - new challenges*. Reproduction in Domestic Animals, vol. 44.
- **Forsberg-Linde C.**, 1991. *Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen*. Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice, vol. 21, nº 3.
- **Gadea J.**, 2003. *Los diluyentes de inseminación artificial porcina. Revisión*. Spanish Journal of Agricultural Research, vol. 2.
- **Garner D.L., Hafez E.S.E.**, 1993. *Spermatozoa and seminal plasma*. Reproduction in Farm Animals, 6ª ed., Philadelphia, USA.
- **Harrison R.A.P., Dott H.M., Foster G.C.**, 1978. *Effect of ionic strength, serum albumin and other macromolecules on the maintenance of motility and the surface of mammalian spermatozoa in a simple medium*. Journal of Reproduction and Fertility, vol. 52.
- **Iguer-Ouada M., Verstegen J.P.**, 2001. *Long term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders*. Theriogenology, vol. 55.

- **Johnston S.D., Root M.V., Olson P.N.S.**, 2011. *Canine and feline theriogenology*. Ed. Saunders, Philadelphia, USA.
- **Koziorowska-Gilun M., Koziorowski M., Fraser L.**, 2011. *Antioxidant defence system of boar cauda epididymidal spermatozoa and reproductive tract fluids*. *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 46.
- **Kubus S.A.**, 1999. *Manual de inseminación artificial porcina*. Ed. Mainzer Producción Gráfica, Madrid, España. 2010.
- **Maes D., Van Soom A., Appeltant R.**, 2016. *Porcine semen as a vector for transmission of viral pathogens*. *Theriogenology*, vol. 85.
- **Michea M.A., Briceño C., Alcota M.**, 2016. *Antimicrobial peptides and lipid mediators: Their role in periodontal diseases*. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, vol. 9.
- **Morrell J.M.**, 2016. *Antimicrobials in Boar Semen Extenders – A Risk/ Benefit Analysis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 2, nº 107.
- **Morrell J.M., Rodriguez-Martinez H.**, 2011. *Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency*. *Veterinary Medicine International*.
- **Morrell J.M., Rodriguez-Martinez H., Forsberg-Linde C.**, 2008. *Single layer centrifugation on a colloid selects motile and morphologically normal spermatozoa from dog semen: preliminary results*. *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 43.
- **Morrell J.M., Saravia F., Wallgren M.**, 2009. *Selection of boar spermatozoa using centrifugation on a glycidoxypropyltrimethoxy-silane-coated silica colloid*. *Journal Reproduction and Development*, vol. 55.
- **Morrell J.M., Wallgren M.**, 2011. *Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders*. *Animal Reproduction Science*, vol. 123.
- **Morrell, J.M., Wallgren, M.**, 2014. *Alternatives to Antibiotics in Semen Extenders: A Review*. *Pathogens*, vol. 3, nº 4.
- **Parlamento Europeo (UE)**. Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo de 9 de marzo de 2016 relativo a las *enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal»)*. Diario Oficial de la Unión Europea. 31 de marzo de 2016.

- **Parlamento Europeo (UE).** Reglamento (UE) 2019/6 del Parlamento Europeo y del Consejo de 11 de diciembre de 2018 sobre *medicamentos veterinarios y por el que se deroga la Directiva 2001/82/CE*. Diario Oficial de la Unión Europea. 7 de enero de 2019.
- **Paschoal A.F.L., Luther A-M., Scheinpflug K.,** 2020. *Determination of a cooling-rate frame for antibiotic-free preservation of boar semen at 5°C*. PLoS ONE, vol. 15, nº 6.
- **Paulenz H., Kommisrud E., Hofmo P.O.,** 2000. *Effect of Long-Term Storage at Different Temperatures on the Quality of Liquid Boar Semen*. Reproduction in Domestic Animals, nº 35.
- **Pinart E., Domènech E., Bussalleu E.,** 2017. *A comparative study of the effects of Escherichia coli and Clostridium perfringens upon boar semen preserved in liquid storage*. Animal Reproduction Science, vol. 177.
- **Pinto C.R., Paccamonti D.L., Eilts B.E.,** 1999. *Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen*. Theriogenology, vol. 52, nº 4.
- **Puig-Timonet A., Castillo-Martín M., Pereira B.A.,** 2018. *Evaluation of porcine beta defensins-1 and -2 as antimicrobial peptides for liquid-stored boar semen: Effects on bacterial growth and sperm quality*. Theriogenology, vol. 111.
- **Rodríguez-Martínez H.,** 2005. *Evaluación de la calidad seminal en el verraco*. Avances en tecnología porcina, vol. 2, nº 7-8.
- **Ros-Santaella J.L., Pintus E.,** 2017. *Rooibos (Aspalathus linearis) extract enhances boar sperm velocity up to 96 hours of semen storage*. PLoS ONE, vol. 12, nº 8.
- **Rota A., Ström B., Forsberg-Linde C.,** 1995. *Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 °C*. Theriogenology, vol.44.
- **Savignone C.A., Tittarelli C.M., Stornelli M.C.,** 2007. *Criopreservación del semen canino, aplicaciones y desarrollo*. Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay.
- **Schmid S., Henning H., Oldenhof H.,** 2013. *The specific response to capacitating stimuli is a sensitive indicator of chilling injury in hypothermically stored boar spermatozoa*. Andrology, vol. 1, nº 3.
- **Schulze M., Dathe M., Waberski D.,** 2016. *Liquid storage of boar semen: current and future perspectives on the use of cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders*. Theriogenology, vol. 85.
- **Schulze M., Henning H., Rüdiger K.,** 2013. *Temperature management during semen processing: Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions*. Theriogenology, vol. 80, nº 9.

- **Schulze M., Junkes C., Mueller P.,** 2014. *Effects of cationic antimicrobial peptides on liquid-preserved boar spermatozoa.* PLoS ONE, vol. 9, nº 6.
- **Sepúlveda L., Bussalleu E., Yeste M.,** 2013. *How do different concentrations of Clostridium perfringens affect the quality of extended boar spermatozoa?* Animal Reproduction Science, vol. 140, nº 1-2.
- **Sepúlveda L., Bussalleu E., Yeste M.,** 2014. *Effects of different concentrations of Pseudomonas aeruginosa on boar sperm quality.* Animal Reproduction Science, vol. 150, nº 3-4.
- **Sepúlveda L., Bussalleu E., Yeste M.,** 2016. *Effect of Pseudomonas aeruginosa on sperm capacitation and protein phosphorylation of boar spermatozoa.* Theriogenology, vol. 85, nº 8.
- **Simpson G.M., England G.C.W., Harvey M.J.,** 2000. *Manual de reproducción y neonatología en pequeños animales.* Ed. Servet, Barcelona, España.
- **Speck S., Courtiol A., Dathe M.,** 2014. *Cationic Synthetic Peptides: Assessment of Their Antimicrobial Potency in Liquid Preserved Boar Semen.* PLoS ONE, vol. 9, nº 8.
- **Stornelli M.A., de la Sota R.L.,** 2006. *Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado,* Instituto de Teriogenología, Ed. Analecta Veterinaria, La Plata, Argentina.
- **Waberski D., Luther A-M., Grünther B.,** 2019. *Sperm function in vitro and fertility after antibiotic-free, hypothermic storage of liquid preserved boar semen.* Science of Reproduction, vol. 9, nº 1.
- **Watson P.F.,** 1990. *Artificial insemination and the preservation of semen.* Marshall's physiology of reproduction. Male reproduction. Ed. Lamming, Londres, UK.
- **Williams S.,** 2013. *Eficiencia reproductiva del verraco.* Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (Argentina).

Webgrafía

- **García, T.,** 2014. *Los PAM podrían ser una alternativa a los antibióticos en la conservación del semen porcino.* España: Portal Veterinaria. Recuperado el 4 de noviembre de 2020 de <https://www.portalveterinaria.com/actualidad-veterinaria/actualidad/11744/los-pam-podrian-ser-una-alternativa-a-los-antibioticos-en-la-conservacion-del-semen-porcino.html>.
- **IMV Technologies,** 2018. *BactiBag - IMV Technologies.* Francia: IMV Technologies. Recuperado el 6 de noviembre de 2020 de <https://www.imv-technologies.com/product/bacti-bag-1>.

- **Úbeda J.**, 2012. *Procesamiento de las Dosis*. México: porcicultura.com. Recuperado el 2 de noviembre de 2020, de <https://www.porcicultura.com/micrositio/Magapor/Procesamiento-de-las-Dosis>.

- **333 Corporate 1998 S.L.**, 1998. *3tres3, la página del cerdo*. Barcelona: 3tres3.com. Recuperado el 2 de noviembre de 2020, de <https://www.3tres3.com/>.