

MICROBIOLOGÍA DEL SEMEN BOVINO: EFECTO SOBRE LA CALIDAD

SEMINAL

Trabajo Final de Grado

De la alumna

TAMARA ANAHI LONDRA

Este trabajo ha sido presentado como requisito

Para la obtención del título de

Licenciado en Genética

Carrera

Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino,.....

MICROBIOLOGÍA DEL SEMEN BOVINO: EFECTO SOBRE LA CALIDAD

SEMINAL

Trabajo Final de Grado

De la alumna

TAMARA ANAHI LONDRA

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y
Apellido)

(Nombre y
Apellido)

(Nombre y
Apellido)

Dra. Biol. Silvina Goenaga

Dr. Mic. Fabrisio E. Alustiza

Dra. MSc. Med. Vet. Jorgelina Manes

Tutor

Co-Director

Director

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino,.....

CONTENIDO

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Anatomía y fisiología de la reproducción del toro	8
1.2. Composición del semen	11
1.2.1. Morfología y fisiología espermática.....	13
1.3. Inseminación Artificial: generalidades de la técnica	15
1.3.1. Ventajas y desventajas en el uso de la inseminación artificial	17
1.4. Criopreservación del semen	18
1.5. Uso, importancia y componentes de los diluyentes en la criopreservación del semen	20
1.6. Antibióticos en diluyentes	22
1.7. Resistencia a los antibióticos utilizados en criopreservación del semen	23
1.8. Métodos de extracción del semen.....	24
1.8.1. Vagina Artificial.....	24
1.8.2. Uso de Electroeyaculador	26
1.9. Evaluación del semen.....	28
1.9.1. Motilidad Masal	28
1.9.2 Motilidad Total	29
1.9.3. Motilidad Rectilínea Progresiva.....	29
1.9.4. Vigor.....	30

1.9.5. Funcionalidad de la Membrana Plasmática Celular.....	30
1.9.6. Integridad de la Membrana Plasmática Celular.....	31
1.9.7. Concentración.....	32
1.10. Bacterias saprófitas contaminantes del semen.....	33
1.11. Hongos y levaduras contaminantes del semen.....	35
1.12. Efectos deletéreos de la contaminación por microorganismos.....	36
1.13. Recomendaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal.....	37
2. HIPÓTESIS.....	39
3. OBJETIVOS.....	40
3.1. Objetivo general.....	40
3.2. Objetivos específicos.....	40
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
4.1. Experimento 1.....	41
4.2. Experimento 2.....	43
4.2.1. Determinación de la calidad seminal.....	43
4.2.2. Caracterización microbiológica de las muestras de semen bovino congeladas/descongeladas.....	48
4.2.2.1. Prevalencia microbiológica.....	48
4.2.2.2 Identificación de la población bacteriana.....	49
4.2.2.3. Tinción Gram.....	49
4.2.2.4. Perfil de resistencia a antibióticos de uso común en la criopreservación.....	50

4.3. Análisis estadístico	51
5. RESULTADOS.....	53
5.1. Experimento 1.....	53
5.2. Experimento 2.....	54
5.2.1. Determinación de calidad seminal	54
5.2.2. Prevalencia microbiológica.....	54
5.2.3. Efecto de la presencia de microorganismos sobre las variables de calidad del semen	56
5.2.4. Perfil de resistencia a antibióticos de uso común en la criopreservación.....	56
6. DISCUSIÓN	58
7. CONCLUSIÓN.....	62
8. ANEXO.....	63
9. BIBLIOGRAFÍA	65

RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar los microorganismos presentes en muestras de semen bovino congelado-descongelado, determinar la resistencia de los aislamientos a los antibióticos (atb) más utilizados en los diluyentes seminales y evaluar el impacto de la presencia de los mismos sobre los parámetros de calidad espermática. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron 100 muestras de semen bovino criopreservado de origen comercial. Las muestras permanecieron en termos con nitrógeno líquido hasta el momento de su evaluación. Al momento de la descongelación, en baño termostático a 37°C, se realizaron determinaciones de calidad seminal (motilidad espermática total, motilidad rectilínea progresiva, vigor, concentración, funcionalidad e integridad de la membrana plasmática) y en simultáneo, una alícuota de la muestra fue incubada en caldo de enriquecimiento BHI en estufa de cultivo en dos tiempos diferentes (2 hs vs 24 hs). Posteriormente fueron sembradas diluciones de los enriquecimientos en Mac Conkey, Hongos y Levaduras y TSA. Para realizar los aislamientos, una alícuota del semen se sembró e incubó en Agar Sangre y luego sobre los mismos, se determinó el perfil de resistencia antibiótica (Estreptomicina, Gentamicina, Penicilina, Azitromicina, Tetraciclina y Norfloxacin). Se determinó que la prevalencia de microorganismos en las pajuelas evaluadas fue del 28%, de los cuales el 47% correspondía a hongos y levaduras y el resto de los aislamientos se dividió entre 18% de bacterias Gram negativas y 30% de bacterias Gram positivas, mientras que el 6% restante no pudo ser identificado. También se determinó que la presencia de dichos agentes no afectó la calidad del semen. De los microorganismos hallados en las muestras, el 61% pudo ser caracterizado y en todos los casos fueron resistentes al menos a uno de los antibióticos ensayados. Se concluye que la incubación de las muestras de semen en caldo BHI durante 24 hs, mejoró la tasa de

aislamientos, que la prevalencia de microorganismos contaminantes en muestras de semen bovino criopreservadas fue del 28% sin afectar negativamente la calidad del semen y que los microorganismos aislados presentaron resistencia al menos a uno de los antibióticos ensayados y de uso frecuente en diluyentes seminales.

Es probable que el corto tiempo en el cual los espermatozoides han estado expuestos a los microorganismos y las bajas temperaturas en las que se procesa y mantiene el semen sean los factores condicionantes que minimizan los efectos deletéreos de los microorganismos sobre los gametos masculinos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Anatomía y fisiología de la reproducción del toro

El aparato reproductor del toro está formado por dos grupos de órganos: los órganos sexuales primarios y los sexuales secundarios (Frandsen & Spurgeon, 1992; Fig. 1). El primer grupo se encuentra constituido por los testículos, cuya función es la de producir gametos masculinos o espermatozoides (función exocrina) y secretar hormonas esteroides (función endócrina), como la testosterona (Galina & Valencia, 2009; Hernandez, 2014). Estos se encuentran ubicados dentro del escroto, el cual tiene como función proteger a los testículos y junto con los músculos específicos regular la temperatura para asegurar el correcto funcionamiento. La producción normal de espermatozoides en los testículos ocurre normalmente de 4°C a 7°C por debajo de la temperatura corporal. Los testículos del toro están formados por los túbulos seminíferos, rodeados de una capa fibrosa llamada túnica albugínea, de la cual emergen estructuras que forman una red de soporte (Frandsen & Spurgeon, 1992). En el nacimiento, las células germinativas de los machos se llaman gonocitos. Los túbulos seminíferos son pequeños y no tienen lumen, la población celular está compuesta por gonocitos y células de soporte que darán origen a las células de Sertoli (Galina & Valencia, 2009). Los túbulos se encuentran rodeados por gran cantidad de tejido intersticial que contiene principalmente células mesenquimales precursoras de las células de Leydig. Cuando la diferenciación celular de las células mesenquimales comienza a manifestarse, ocurre la formación del lumen del tubo seminífero (Galina & Valencia, 2009). El segundo grupo de órganos del tracto reproductivo del toro, está compuesto por los conductos excretores, las glándulas accesorias, el pene y el prepucio.

Uno de los primeros cambios al iniciarse la pubertad en el toro es el aumento en la liberación pulsátil de la hormona luteinizante (LH) proveniente del hipotálamo. Estas

secreciones de LH estimulan a las células de Leydig para producir testosterona, necesaria para la diferenciación de las células de Leydig y para la espermatogénesis en las células de Sertoli (Hafez & Hafez, 2002).

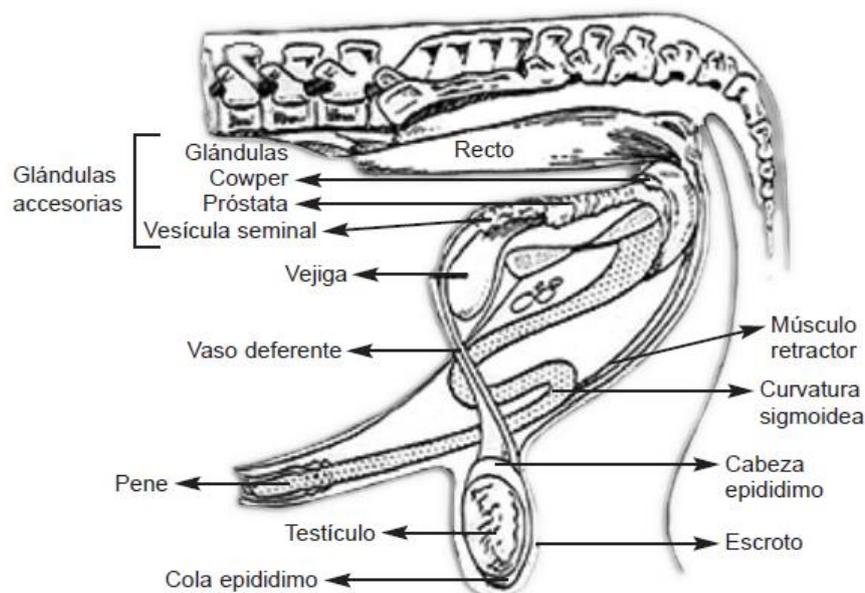


Figura 1. Aparato reproductor del toro. Fuente: Hidalgo *et al.* (2009).

La espermatogénesis es el proceso por el cual se produce la formación de las células sexuales del macho. Este proceso está controlado por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo, a través del cual la GnRH (Hormona liberadora de gonadotrofinas) secretada por el hipotálamo regula la liberación cíclica de LH y de hormona folículo estimulante (FSH) desde adenohipófisis (Barrios, 2012; Rodríguez Ávalos *et al.*, 2013). La LH tiene acción directa sobre la espermatogénesis a través de la estimulación de la producción de testosterona por las células de Leydig; y la FSH actúa sobre las células de Sertoli estimulando la espermiogénesis, proceso durante el cual una espermátida es modificada para dar origen a un espermatozoide inmaduro (Amann & Schanbacher,

1983). A su vez la testosterona es necesaria para el mantenimiento de la espermatogénesis y ejerce un mecanismo de retroalimentación negativa en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (Amann & Schanbacher, 1983; Ekstedt *et al.*, 1986); es decir los niveles de testosterona controlan tanto la liberación de GnRH como de gonadotrofinas, y por ende su propia concentración. Cuando las concentraciones de testosterona son altas, el sistema de retroalimentación negativa disminuye la producción de ésta debido a la inhibición que se produce sobre el hipotálamo y la hipófisis. Por el contrario, cuando las concentraciones de testosterona son bajas, no ocurre tal inhibición y el sistema incrementa la producción de testosterona (Bustos & Torres, 2012). La espermatogénesis es un proceso largo y dirigido en el que las células madres diploides de la base de los túbulos seminíferos, llamadas espermatogonias, se dividen por mitosis para mantener su número y que, de manera cíclica, generan progenie que sufre progresivas divisiones meióticas hasta diferenciarse en espermatidas haploides que se liberan como espermatozoides (Cunningham & Klein, 2009). El proceso espermatogénico consta de tres fases: 1) Espermatocitogénesis, que consiste en divisiones mitóticas sucesivas de las espermatogonias para dar lugar a los espermatocitos primarios. 2) En la segunda fase, se produce un proceso denominado meiosis que se desarrolla en dos fases: meiosis I y meiosis II. Durante la meiosis I, los espermatocitos primarios duplican su ADN y experimentan cambios nucleares progresivos de la profase meiótica, antes de dividirse para formar espermatocitos secundarios. Los espermatocitos secundarios se someten a una segunda división meiótica para formar células haploides, conocidas como espermatidas redondas. 3) En la tercera fase, se produce la espermiogénesis, que consiste en la diferenciación morfológica y fisiológica de las espermatidas a espermatozoides. Durante esta última etapa, ocurren cambios como condensación de la cromatina nuclear, la formación del flagelo y el desarrollo del capuchón acrosomal (Hafez & Hafez, 2002; De vos *et al.*, 2003; Pendás Rodríguez *et al.*,

2013). Los cambios que ocurren en las espermiogénesis consisten en: a) formación del acrosoma, que se extiende sobre la mitad de la superficie nuclear y contiene las enzimas que ayudarán a la penetración del ovocito; b) condensación del núcleo; c) formación del cuello, pieza media y flagelo y d) eliminación de la mayor parte del citoplasma (Rodríguez Ávalos *et al.*, 2013). Durante la espermiogénesis, a partir del centriolo se produce el flagelo del espermatozoide, necesario para el desarrollo de la movilidad espermática. Aquí las mitocondrias se reúnen y se acomodan en la base del núcleo, formando parte de la pieza media del espermatozoide. El aparato de Golgi dará origen a la vesícula acrosómica, el núcleo se condensa y el resto del citoplasma es eliminado (Gilbert, 2005).

La espermatogénesis puede ser afectada por diversos factores, pero el que se describe con mayor frecuencia es el incremento de la temperatura escrotal que puede ocurrir por procesos inflamatorios, fiebre, o temperatura ambiental muy elevada (Barrios, 2012). El estrés térmico escrotal produce alteraciones en la función testicular, pérdida del peso testicular, pérdida de células germinales e incremento de la apoptosis celular (Lue *et al.*, 1999). El efecto del estrés térmico sobre las células de la línea germinal masculina depende del grado de apoptosis o necrosis y de la capacidad de estas células de responder al estrés y reparar su ADN (Rockett *et al.*, 2001). Las células de cada una de las etapas tienen diferentes respuestas al estrés térmico. Algunas se eliminan por apoptosis, mientras que otras células germinales completan su desarrollo y dan lugar a espermatozoides móviles con daño en su ADN (Banks *et al.*, 2005).

1.2. Composición del semen

En condiciones naturales, el toro eyacula 4 a 10 ml de semen, con 800 a 2000 millones de espermatozoides por ml. En la producción de semen también influyen la

edad del toro, la estación del año y la frecuencia de eyaculación (Hafez & Hafez, 2002). El semen, además de espermatozoides, contiene 75% de agua, iones orgánicos e inorgánicos, minerales como Na^+ y K^+ y en menores cantidades Zn^{++} (actúa como antimicrobiano), Ca^{++} , Cu^{++} , Fe^{++} compuestos como fructosa, sorbitol, ácido cítrico, ácido ascórbico, péptidos, proteínas, lípidos, ácidos grasos, aminoácidos, inmunoglobulinas como IgA, hormonas y numerosas enzimas (Zini *et al.*, 1993).

El eyaculado está constituido por la porción líquida o plasma seminal y por la porción celular. El plasma seminal es una mezcla compleja de secreciones de los testículos, el epidídimo y glándulas sexuales accesorias que sirve de vehículo para transportar el espermatozoide eyaculado (Mann & Lutwak-Mann, 1981). El pH del plasma seminal varía desde 6.7 hasta 7.4 y tiene el potencial para neutralizar el pH ácido vaginal. Adicionalmente, el plasma seminal contiene inhibidores de la respuesta inmune, es decir cumple un rol protector espermático dentro del tracto reproductivo de la hembra modulando la respuesta inflamatoria tras la monta. Sus proteínas protegen selectivamente a los espermatozoides para no ser fagocitados por neutrófilos presentes en el útero que juegan un papel importante en el transporte y eliminación de espermatozoides muertos (Dostál *et al.*, 1997; Tovío Luna & Bernal Quintero, 2020). Complementariamente, ejerce sobre los espermatozoides funciones de nutrición, protección, regulación de la motilidad, capacitación de los espermatozoides, reconocimiento y unión entre gametos (Johnson, 1995).

Durante la eyaculación, las proteínas del plasma seminal participan en los procesos relacionados con la protección espermática durante su tránsito y almacenamiento en el epidídimo, en el eyaculado y durante el transporte en el tracto reproductivo de la hembra y fecundación del ovocito, también participan en la actividad inhibitoria y de estabilización

tanto de complejos enzimáticos como así la estabilización de la cromatina espermática. Estas proteínas, además, contienen propiedades inmunosupresivas e inmunomoduladoras y controlan la actividad enzimática en el metabolismo espermático (Strzezek, 2002; Tovío Luna & Bernal Quintero, 2020).

1.2.1. Morfología y fisiología espermática

Los espermatozoides de los mamíferos pueden dividirse en dos subunidades primarias: la cabeza y la cola, ambas rodeadas por la membrana plasmática. Las principales organelas de la cabeza son el núcleo y el acrosoma. Este último cubre las 2/3 partes del núcleo y se ubica en el ápice del mismo. La unión de la cabeza y cola se realiza a través del cuello. La cola, puede dividirse en tres segmentos: la porción o pieza principal, la porción media y la porción terminal (Stornelli & Luzbel, 2016). La cabeza del espermatozoide contiene el ADN, responsable del material genético masculino en la fecundación; la pieza intermedia incluye una alta proporción de mitocondrias que son fundamentales para la producción de energía y por último la cola responsable de la motilidad espermática. El acrosoma, el cual se extiende hasta la región ecuatorial, está cubierto por dos membranas (interna y externa) y contiene enzimas importantes para la fecundación (Hidalgo *et al.*, 2009; Fig. 2). Externamente, el espermatozoide está recubierto por una membrana plasmática cuya composición, estabilidad, fluidez y permeabilidad son factores esenciales en la capacitación espermática. La membrana plasmática contiene proteínas integrales, fosfolípidos, lípidos neutros y glicolípidos que se distribuyen asimétricamente entre los diferentes segmentos del espermatozoide (Galina & Valencia, 2009).

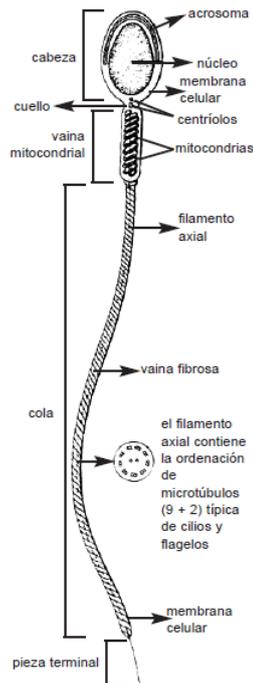


Figura 2. Esquema de espermatozoide bovino. Fuente: Hidalgo *et al.* (2009).

En los espermatozoides de mamíferos es necesario que se presenten tres procesos fisiológicos para que obtengan la capacidad fecundante, estos son: maduración epididimaria, capacitación y reacción acrosomal. La maduración del espermatozoide se adquiere mediante su tránsito por el epidídimo (Rodríguez Ávalos *et al.*, 2013). Durante el tránsito del espermatozoide por el epidídimo hacia el conducto deferente sufre una serie de modificaciones físicas y químicas que le confieren determinadas características conocidas como maduración espermática (Aviles, 2011). Uno de los cambios físicos que adquiere el espermatozoide es el desarrollo de la capacidad de movimiento progresivo, ya que al abandonar el testículo los espermatozoides presentan una movilidad nula o muy débil, debido en gran medida a la falta de maduración de su membrana plasmática (Yanagimachi, 1994). Se ha observado que los espermatozoides pasan de ser inmóviles a experimentar un movimiento circular no progresivo, hasta llegar a ser lineal y progresivo en regiones más distales del mismo (Hinton *et al.*, 1979).

Durante la maduración epididimaria la gota citoplasmática va a migrar desde la pieza de conexión al anillo de Jensen (Bedford, 1975). La presencia de una elevada proporción de espermatozoides con gotas citoplasmáticas en el eyaculado se asocia con alteraciones en la maduración epididimaria y con una capacidad fecundante reducida (Keating *et al.*, 1997).

Las modificaciones químicas que puede experimentar el espermatozoide durante su maduración comprende cambios en la composición de fosfolípidos de membrana y cantidad de colesterol en proporción a los fosfolípidos, incremento en las uniones disulfuro, re-localización de los antígenos de superficie, modificación, eliminación y adición de proteínas de superficie (Cooper, 1998).

1.3. Inseminación Artificial: generalidades de la técnica

A nivel mundial la técnica de la inseminación artificial en la producción bovina es una herramienta de gran valor para el mejoramiento genético de los rodeos (Villarreal *et al.*, 2020). La inseminación artificial ha sido responsable del elevado incremento de la producción de leche y carne en los rodeos. Conjuntamente con los modernos sistemas de procesamiento de datos, los cuales han permitido a los analistas de los modelos genéticos tomar decisiones sobre los futuros reproductores y mediante esta técnica, masificar la difusión de este valioso material genético a gran escala (Sumba, 2012). Por medio de esta biotécnica reproductiva, el semen de los machos es colectado artificialmente y se deposita en el tracto reproductivo de las hembras para producir la fecundación de los ovocitos maduros. Durante las últimas décadas, la inseminación artificial ha demostrado ser la tecnología reproductiva que más ha contribuido a acelerar el proceso genético de las diferentes especies ganaderas. Sin embargo, el éxito de esta tecnología depende de que el semen mantenga su poder fecundante tras ser diluido y

congelado (Muiño *et al.*, 2005). La metodología se podría dividir en tres etapas: la primera consiste en las técnicas para la identificación de la vaca en estro; la segunda se refiere al manejo del semen, y la última parte comprende el procedimiento de introducción del semen en el útero (Hernández Cerón & Ortega León, 2009). El período de estro es el momento en el que la hembra acepta la cópula o monta. Esta conducta está determinada por un incremento significativo de las concentraciones de estradiol producido por un folículo preovulatorio y por la ausencia de un cuerpo lúteo (Hernández Cerón & Ortega León, 2009). En cuanto a la segunda etapa es importante comprender el manejo del equipo utilizado para la inseminación artificial, las técnicas de descongelación y el manejo del semen para evitar el daño de los espermatozoides. Es importante además mantener una buena higiene para evitar la contaminación de elementos que se usan al momento de manipular el semen (Ortuño, 2019). La última etapa de esta técnica consiste en la introducción del semen en el útero; para que ocurra la fecundación del óvulo, es necesario que los espermatozoides se depositen antes de la ovulación y tengan tiempo de adquirir la capacidad fecundante (Galina & Valencia, 2009). La capacitación puede ser definida como una suma de cambios que permiten al espermatozoide adquirir la capacidad de fecundar al ovocito (Castellón *et al.*, 2018) y ocurre en el tracto reproductivo de la hembra. Durante este proceso, el gameto sufre una serie de fenómenos que lo conducen a la hiperactivación y reacción acrosómica (Barros & Berrios, 1977), procesos fundamentales para la penetración espermática a la zona pelúcida y para la posterior fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito. Entre los cambios que ocurren durante la capacitación, previo a la hiperreactivación y reacción acrosómica, se encuentran: alteración de glicoproteínas de la superficie del espermatozoide y modificaciones de las proteínas y lípidos de la membrana plasmática (Roldan & Yanagimachi, 1989).

La técnica de inseminación se denomina técnica recto-vaginal, debido a que con una mano se manipula el cérvix a través del recto y con la otra mano se introduce la pistola de inseminación por la vagina (Fig. 3). Una vez dentro del cérvix, este se manipula para que la pistola atraviese los tres anillos que conforman el cérvix del útero; cuando se ha pasado el último anillo cervical, se deposita el semen en el cuerpo del útero (Hernández Cerón & Ortega León, 2009). Uno de los errores más frecuentes es el depósito del semen en la vagina o en el cérvix.

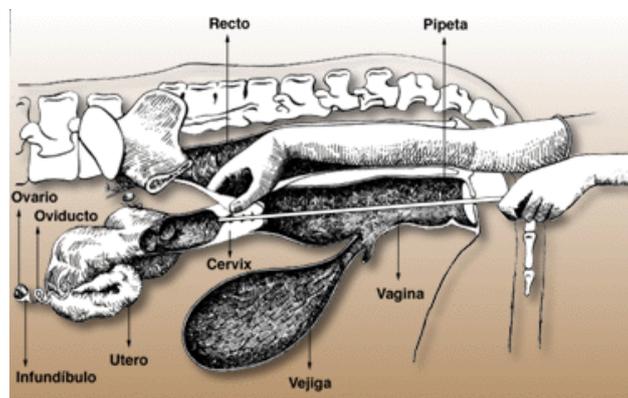


Figura 3. Depósito correcto del semen en el útero. Fuente: Revista Veterinaria Argentina, (2015).

1.3.1. Ventajas y desventajas en el uso de la inseminación artificial

Ventajas:

- Permite el mejoramiento genético acelerado mediante el uso de sementales sobresalientes.
- Prueba rápidamente el potencial productivo y reproductivo de un toro.
- Mejor utilización del semental ya que a partir de un eyaculado es posible inseminar a varias hembras.
- Evita la transmisión de enfermedades venéreas, cuando se utiliza semen sin contaminantes microbiológicos.

- Facilita el transporte y distribución de semen.
- Facilita la implementación de programas de sincronización y cruzamientos.
- Mejora el control de registros, cubriciones y nacimientos.
- Permite utilizar sementales con algún impedimento para la monta (problemas óseos, exceso de peso corporal, etc.).
- Reduce costos de preñez de las hembras; no se requiere la presencia de los toros, eliminando gastos de alimentación y manejo de los mismos.

Desventajas:

- Implica un dominio de la técnica, de lo contrario se puede reducir el porcentaje de concepción del rodeo.
- Las enfermedades pueden propagarse con gran rapidez de toros que no se les lleva un control sanitario estricto.
- Al iniciar un programa de inseminación artificial la inversión monetaria es elevada (compra de equipos, instalaciones, etc.).

1.4. Criopreservación del semen

La criopreservación de semen es una importante biotecnología reproductiva, que busca promover la conservación del germoplasma masculino por tiempo indeterminado (Ribeiro Peres *et al.*, 2014). El semen congelado ha sido una de las mayores contribuciones a la difusión de la inseminación artificial y al mejoramiento genético del ganado (Cavestany & Méndez, 1993). A su vez, mediante la criopreservación es posible detener el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo en el tiempo (Watson, 1995). Por otro lado, Critser *et al.* (1987) observaron que los espermatozoides descongelados motiles, con membranas intactas, no mantenían su viabilidad y capacidad fecundante durante mucho tiempo como los espermatozoides

provenientes de semen fresco. Durante la congelación y descongelación se producen alteraciones celulares que afectan la fertilidad del semen criopreservado en comparación con el semen fresco (Stornelli *et al.*, 2005). Estos efectos se relacionan tanto con la muerte de las células por efecto del procesamiento del mismo, como con la disfunción no letal instaurada en una parte de la población sobreviviente (Watson, 2000). La optimización del protocolo de congelación debe contemplar no solo la obtención de un alto número de espermatozoides sobrevivientes sino también la habilidad funcional de esta población (Stornelli *et al.*, 2005). La aplicación de los procedimientos de criopreservación ha sido más exitosa en bovinos que en otras especies de animales domésticos, y tiene como finalidad lograr índices de preñez por inseminación artificial de manera tan eficaz como después del apareamiento natural (Hafez & Hafez, 2002).

Existen dos métodos de congelación, el manual y el automatizado. En el método manual, una vez que las pajuelas han sido cargadas y selladas, se lleva a cabo una curva de enfriamiento lenta, la cual se inicia con la refrigeración de equilibrio a 4°C en un período de 4 horas. Luego se procede a la congelación de las pajuelas mediante el sistema de vapores de nitrógeno líquido a -100°C, colocando las gradillas con las pajuelas sobre el nivel del nitrógeno, contenido en un recipiente de poliestireno, manteniéndose por lo menos 10 minutos. Para finalizar, las pajuelas se introducen directamente en el nitrógeno líquido para ser conservadas a -196°C (Rivera Gaona, 2018). Esta técnica ha demostrado ser viable, aunque la estandarización de las curvas de enfriamiento y congelación son imprecisas, dependen de la calidad del material utilizado, el tamaño de la caja de poliestireno y el nivel de nitrógeno (Ribeiro Peres *et al.*, 2014). En el método automatizado, luego de envasarse, son refrigeradas y congeladas utilizando un equipo congelador de semen; la curva de congelación es dada

por el software que posee el equipo y puede ser predeterminada por recomendaciones del fabricante o modificada por el operario según crea conveniente. Luego de la congelación, las pajuelas son sumergidas en nitrógeno líquido y finalmente almacenadas en un termo de nitrógeno líquido (Vasconcelos Filho, 2010).

1.5. Uso, importancia y componentes de los diluyentes en la criopreservación del semen

Se denomina diluyente a aquel compuesto que proporciona a las células espermáticas una fuente de energía, protege a las células del daño relacionado con la temperatura y mantiene un pH y osmolaridad adecuados para que los espermatozoides puedan sobrevivir por periodos cortos o largos de tiempo (Salamon & Maxwell, 1995). Los diluyentes permiten también, incrementar el volumen de un eyaculado facilitando la producción de dosis con concentraciones óptimas (Gómez Velásquez, 2019). Los diluyentes deben mantener la vitalidad y capacidad fecundante de los espermatozoides y minimizar los efectos nocivos ocasionados por el descenso térmico.

Los medios para la conservación espermática deben cumplir las siguientes características:

- a. Contener sustancias de tipo iónico que mantengan una adecuada presión osmótica y que protejan a los espermatozoides de los cambios bruscos de pH.
- b. Contener lipoproteínas de baja densidad, las mismas son protectoras contra el shock por frío.
- c. Contener un agente crioprotector.
- d. Contener una fuente de energía, por ejemplo monosacáridos como glucosa.
- e. Contener antibióticos que protejan contra la proliferación de agentes patógenos (Salamon & Maxwell, 1995; Barbas & Mascarenhas, 2009; Rojas, 2014).

Cuando se utiliza inseminación artificial, tanto el volumen de inseminación como el número de espermatozoides que contiene cada dosis, se reducen sustancialmente al compararlo con la monta natural. Si se utilizara semen sin diluir, este volumen contendría un número de espermatozoides superior al deseado (Durán *et al.*, 2015). Uno de los pasos comprendidos en el proceso de la criopreservación de semen bovino es la dilución. La dilución apropiada del semen tiene como objetivo aumentar la capacidad de uso de la masa espermática para que, a partir de una sola eyaculación, se pueda fecundar mediante inseminación artificial al mayor número de hembras posibles (Derivaux, 1982). Al mismo tiempo, los componentes del diluyente le otorgan a los espermatozoides las condiciones óptimas para el mantenimiento de su vitalidad y capacidad fecundante a través del tiempo (Carballo *et al.*, 2009).

En general, los medios de crioprotección incluyen, como principales componentes los agentes crioprotectores, tanto penetrantes como no penetrantes, además contienen azúcares, lipoproteínas, detergentes, aditivos y antibióticos (Johnson *et al.*, 2000; Barbas & Mascarenhas, 2009). Los agentes penetrantes presentan bajo peso molecular y son permeables a la membrana celular; su acción protectora se atribuye a su habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelación. Además, minimizan la formación de cristales de hielo intracelulares que rompen la membrana y su bajo peso molecular permite el rápido ingreso al espermatozoide (Gardner *et al.*, 2017). Estos crioprotectores, modula la estabilidad y fases de la bicapa de fosfolípidos, así como también afectan los procesos de solvatación de agua. Los agentes penetrantes más utilizados son: glicerol, dimetilsulfoxido (DMSO) y propanediol (PROH) (Ávila Portillo *et al.*, 2006).

Los agentes no penetrantes, son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular (Ávila Portillo *et al.*, 2006), no son permeables para la membrana plasmática del espermatozoide y ejercen su acción en el medio externo (Vallecillo Hernández, 2011). Los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano.

Cuando los espermatozoides son congelados y descongelados se ven sometidos a varios ciclos de deshidratación e hidratación lo que resulta en cambios significativos de volumen. Estos cambios de volumen están asociados a cambios en la concentración de iones y electrolitos en las soluciones intra y extra celular (Stornelli *et al.*, 2005). Las células se comportan como osmómetros, variando su volumen en respuesta a cambios osmóticos extracelulares, así las células pierden o captan agua según se expongan a medios extracelulares híper o hipo osmóticos, respectivamente (Fernandez *et al.*, 2009). Los crioprotectores permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas y en consecuencia una menor concentración de electrolitos posibilitando la supervivencia celular durante el proceso de criopreservación (Gao *et al.*, 1993). Además del uso de crioprotectores para tal fin, el choque térmico puede ser mitigado por la presencia de ciertos fosfolípidos, una congelación lenta y preacondicionamiento en un medio con un nivel elevado de sales (Fernandez *et al.*, 2009).

1.6. Antibióticos en diluyentes

Los antibacterianos contenidos en los diluyentes seminales actúan controlando la contaminación microbiana que se produce principalmente durante el proceso de obtención del semen (Izquierdo *et al.*, 2015). La Directiva de la UE 88/407 (Consejo de las Comunidades Europeas, 1988) establece que estreptomomicina, penicilina, lincomicina y

espectinomicina son los antibióticos que se deben añadir al semen diluido. La adición de penicilina y estreptomina fue en principio la combinación más utilizada, sin embargo algunas bacterias han demostrado resistencia a estos fármacos (Yániz *et al.*, 2010). Posteriormente, se emplearon drogas del grupo de los aminoglucósidos, activos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas en concentraciones próximas a 200 mg/l. Éstos últimos incluyen polimixina, neomicina, tilosina, gentamicina, lincomicina y espectinomicina, y se consideran promisorios como agentes antimicrobianos en semen. (Trujillo & Rivera, 2002; Cremades *et al.*, 2005). Por otra parte, Shin *et al.* (1988) demostraron que la combinación de gentamicina, tilosina y linco-espectina fue eficaz para controlar el crecimiento de bacterias en el semen. Sin embargo, esta combinación no eliminó completamente micoplasma de semen criopreservado de toros infectados artificialmente (Shin *et al.*, 1988; Visser *et al.*, 1999).

1.7. Resistencia a los antibióticos utilizados en criopreservación del semen

Los antibióticos son fármacos que se utilizan para tratar las infecciones bacterianas, su mecanismo de acción se basa en inhibir o detener el crecimiento de las bacterias, o bien matarlas. Estos trabajan de forma diferente, por ejemplo la penicilina causa debilitamiento de la pared celular, que estalla, por lo cual la bacteria muere (JIACRA, 2020). Es importante tener en cuenta que los antibióticos ejercen una presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas, es decir, no todas las bacterias son sensibles al antibiótico utilizado y estas pueden sobrevivir y seguir multiplicándose. Esto crea una población bacteriana que es resistente al antibiótico al cual se ha expuesto a la bacteria. La presión selectiva es un proceso natural que puede ser más lento, pero que no se puede parar. La sobreutilización del antibiótico ayuda a acelerar la selección de

bacterias resistentes (Muñoz Ibarra, 2017). Pantozzi *et al.*, (2010) han reportado información sobre multirresistencia por parte de enterococos en animales domésticos.

1.8. Métodos de extracción del semen

La obtención de semen es el primer paso dentro de un programa de congelación, preservación e inseminación artificial. Esta primera fase es de vital importancia para la obtención de muestras de óptima calidad, así como para la adecuada utilización de los sementales (Vallecillo Hernández, 2011). El método ideal para la obtención de muestras espermáticas no debe implicar riesgos físicos para los animales, ni para el personal encargado de realizar la recolección del eyaculado (Rodríguez Ávalos *et al.*, 2013). Los métodos más comúnmente utilizados se explican a continuación.

1.8.1. Vagina Artificial

La obtención de semen por medio de vagina artificial es el método más empleado en la mayoría de las especies domésticas, cuya temperatura y presión adecuadas, imitan las condiciones naturales para inducir la eyaculación, por lo que provee muestras con características normales y representativas (Rodríguez Ávalos *et al.*, 2013) . Sin embargo, la obtención de semen por este método está condicionada a una fase previa de entrenamiento (Vallecillo Hernández, 2011). La aplicación de este método requiere la utilización de un animal para la monta o un maniquí simulando la monta natural (Gómez Coronado, 2013). La vagina artificial consta de un tubo rígido de plástico o metal, con una válvula metálica exterior que permite introducir agua y aire (Galina & Valencia, 2009). Por la parte interna, se introduce una funda o camisa de látex cuyos extremos se doblan y sujetan sobre un tubo rígido, formando un espacio que se llena con agua atemperada a 45°C aproximadamente para proveer el estímulo adecuado y lograr la eyaculación (Fig. 4). En uno de los extremos de la vagina artificial se coloca una copa o tubo colector graduado y cono colector que

conecta el tubo y la vagina. La eyaculación del bovino se considera monofásica y sumamente violenta (ocurre en pocos segundos), después de la eyaculación, el animal desmonta casi inmediatamente, entonces, se procede a retirar la vagina y el tubo graduado (conteniendo el eyaculado). Es importante proveer al tubo de colecta con algún cobertor para proteger debidamente de la luz solar directa y de los cambios drásticos de temperatura (choque térmico) y contaminación (Morillo *et al.*, 2012).

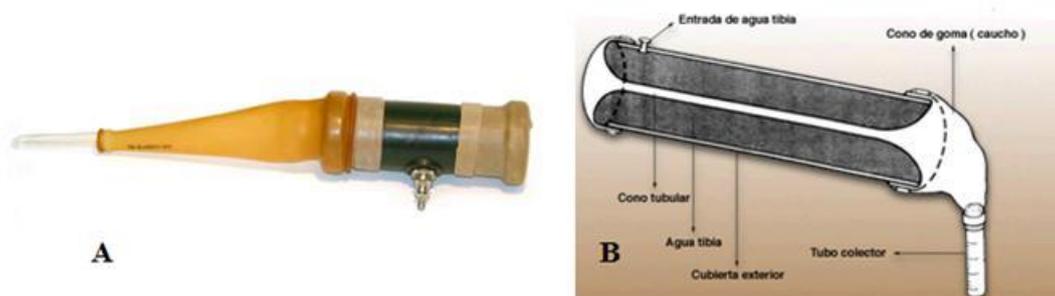


Figura 4. A. Vagina artificial comúnmente utilizada para toros. B. Diagrama esquemático de los componentes básicos de una vagina artificial. Fuente: A. Página Web Phibro Salud Animal. B. Página Web Cátedra “Fundamentos de Producción Animal”, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Ventajas y desventajas del uso de vagina artificial

La universalidad del uso de esta técnica responde al hecho de que se obtienen eyaculados muy limpios y con baja contaminación cuando se realiza correctamente (Arieta Román *et al.*, 2014). La extracción por medio de vagina artificial brinda una mayor concentración de espermatozoides en el eyaculado y una mejor calidad del mismo, debido a que es un método fisiológico y necesita la acción voluntaria del animal; por tanto, es más viable para someterlo a congelación (Gómez Coronado, 2013).

El método de la vagina artificial tiene como principal desventaja el hecho de requerir el uso de animales dóciles y entrenados (Arieta Román *et al.*, 2014). Además, se necesita un animal o maniquí para estimular al macho, lo que dificulta el trabajo a campo abierto (Villamizar Guerrero, 2014).

1.8.2. Uso de Electroeyaculador

La técnica de electroeyaculación se basa en la obtención de material seminal tras la aplicación de un estímulo eléctrico, a través de un electrodo insertado en el recto que desencadena la erección y eyaculación (Curbelo & Rodríguez, 2013; Rodríguez *et al.*, 2018). Con la utilización del electroeyaculador, como método para la recolección de semen, la eyaculación es un proceso bifásico, primero ocurre la emisión y continúa con la erección y la eyaculación propiamente dicha (Morillo *et al.*, 2012). Cuando se produce una estimulación adecuada, esta viaja por medio del nervio pudendo interno hacia los centros lumbosacros de la columna vertebral, desde allí parte la respuesta a través de los nervios simpáticos lumbares y esto hace que la musculatura lisa que recubre la próstata, glándulas vesiculares y conductos deferentes, se contraiga. Esta contracción promueve la progresión de los espermatozoides hacia la uretra pélvica (Morillo *et al.*, 2012). Por otra parte, la respuesta nerviosa viaja vía nervios parasimpáticos para provocar la contracción de la musculatura estriada del tracto uretral, lo que resulta en la erección del pene y la eyaculación propiamente dicha (Morillo *et al.*, 2012; Fig.5). El área sobre la ampolla, próstata y uretra se debe masajear con movimientos de adelante hacia atrás con dirección longitudinal. Dicha estimulación debería facilitar la colección del semen mediante el electroeyaculador (Curbelo & Rodríguez, 2013). La estimulación normalmente es continuada hasta obtener de 2 a 5 ml de semen (Barth, 2007). Hay casos en que se hace necesario realizar los estímulos eléctricos con intervalos de descanso de 1 a 2 segundos

(Villamizar Guerrero, 2014). El electroeyaculador permite extraer semen a todos los toros sin previo acostumbramiento especialmente en animales indómitos o con afecciones de los miembros posteriores (Arthur *et al.*, 1991).



Figura 5. Electroeyaculador para la recolección de semen. Fuente: Morillo *et al.* (2012).

Ventajas y desventajas en el uso del electroeyaculador

La principal ventaja del uso de electroeyaculador es la obtención de semen de forma rápida y fácil para la evaluación reproductiva de los machos en el campo sin ser necesaria la voluntad del animal (Rodríguez Ávalos *et al.*, 2013). Por ello, no es necesario el entrenamiento previo y se puede coleccionar un gran número de animales en poco tiempo. Otra de las ventajas que aporta este método es la de ser utilizado en animales imposibilitados para la monta (Morillo *et al.*, 2012).

Una de las desventajas del uso del electroeyaculador es que puede contaminar la muestra con orina si no se prepara adecuadamente al macho; la extracción por este método disminuye la concentración de espermatozoides en el eyaculado por lo que es aconsejable su uso en fresco para inseminación directa (Gómez Coronado, 2013).

1.9. Evaluación del semen

En la actualidad, el proceso de evaluación de semen es una herramienta primordial en la aplicación de nuevas biotecnologías, así como en los procesos de valoración de futuros reproductores (Rodríguez *et al.*, 2008).. Un requisito indispensable para el desarrollo de la inseminación artificial es que el semen utilizado mantenga su capacidad fecundante después de haber sido criopreservado (Hidalgo *et al.*, 2009). Existe una baja correlación entre la fertilidad del semen y sus parámetros cuantificables, más aún no se ha encontrado una evaluación que pueda predecir la capacidad fecundante del eyaculado (Gillan *et al.*, 2008). Varios métodos han sido utilizados para tal fin, la mayoría de estos estudios se han realizado utilizando un microscopio óptico y un operador para hacer las evaluaciones seminales, evaluando variables cualitativas y cuantitativas, la mayor parte utilizando pruebas con determinaciones subjetivas, es decir, que depende del grado de experticia del operador (Quintero Moreno *et al.*, 2017).

1.9.1. Motilidad Masal

La motilidad espermática total, es definida como el movimiento en remolinos o en ondas del total de espermatozoides de la muestra (Rodríguez Ávalos *et al.*, 2013). Esta es una determinación que se realiza sobre una muestra de semen fresco sin diluir y que permite hacer una primera determinación de la calidad de la muestra. El movimiento en masa depende de tres factores: concentración, porcentaje de células con movimiento progresivo y velocidad de movimiento de los espermatozoides (Araujo Moron & Moron, Moron, 2015). Es la característica que permite evaluar la capacidad de desplazamiento de los espermatozoides de toros, siendo un parámetro tradicionalmente analizado mediante microscopía óptica, clasificando el movimiento de cada célula. A pesar de la subjetividad que genera este método, es la forma más accesible y económica de determinar la calidad de

movimiento espermático; sin embargo esta evaluación de rutina no es capaz de estimar el potencial reproductivo de un toro (Morado *et al.*, 2015).

1.9.2 Motilidad Total

La evaluación posdescongelado de la pajuela tiene por finalidad conocer si ese semen fue capaz de superar el proceso congelación-descongelación (Gómez & Migliorisi, 2015). Esta determinación consiste en visualizar y estimar subjetivamente la proporción (%) de espermatozoides móviles, mediante la observación de al menos dos campos microscópicos, utilizando para este análisis un microscopio óptico (400X) (Ledesma, 2012).

1.9.3. Motilidad Rectilínea Progresiva

La determinación de este parámetro es una de las pruebas más utilizadas para obtener una aproximación a la calidad del semen. Para evaluarla es necesario el uso de un microscopio compuesto u óptico común con objetivos de 100X y 400X, siendo importante mantener el semen a evaluar y el material a utilizar a una temperatura de entre 30 a 35 °C (Rodríguez Ávalos *et al.*, 2013). Los espermatozoides normalmente deben moverse de modo rápido y recto a través del campo. La movilidad puede clasificarse como:

- Muy buena: 80-100% de los espermatozoides presentan movilidad progresiva.
- Buena: 60-79% de los espermatozoides presentan movilidad progresiva.
- Regular: 40-59% de los espermatozoides presentan movilidad progresiva.
- Pobre: menos del 40% de los espermatozoides presentan movilidad progresiva (Rodríguez Ávalos *et al.*, 2013).

1.9.4. Vigor

La velocidad de movimiento de los espermatozoides, denominado vigor, es la velocidad con que éstos atraviesan el campo (Curbelo & Rodríguez, 2013), o la tasa de progresión de los mismos (Catena & Cabodevila, 1999). Esta puede ser evaluada al mismo tiempo que se evalúa la movilidad progresiva y puede ser cuantificada utilizando la siguiente escala:

- 0= sin movimiento.
- 1= ligera ondulación o vibración de cola, sin progresión.
- 2= progresión lenta, incluyendo detención y comienzo de movimiento.
- 3= movimiento progresivo continuo y moderada velocidad.
- 4= movimiento progresivo, rápido.
- 5= movimiento progresivo muy rápido, en el cual las células son difíciles de seguir visualmente (Catena & Cabodevila, 1999).

El semen de buena calidad, que ha sido recientemente descongelado, normalmente tiene 40-50% de espermatozoides con movilidad progresiva y un vigor de 3-4. Después de 2 horas de incubación, estos valores generalmente disminuyen un 10-15% y 1 punto, respectivamente (Catena & Cabodevila, 1999).

1.9.5. Funcionalidad de la Membrana Plasmática Celular

La membrana plasmática del espermatozoide es una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas (Hidalgo *et al.*, 2009). Estas funciones permiten que el espermatozoide adapte su metabolismo al medio circundante, proporcionando así un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito (Hidalgo *et al.*, 2009). La prueba hipoosmótica, reconocida como HOS Test (Hipoosmotis swelling test) es una prueba seminal simple y de bajo costo, que permite evaluar la integridad

funcional de la membrana plasmática del espermatozoide (Jeyendran *et al.*, 1984). Este se realiza mediante la observación de las alteraciones morfológicas que sufren las células espermáticas al ser expuestas a condiciones hipotónicas tales como, dilatación y enrollamiento de la cola (Jeyendran *et al.*, 1984; Sanchez *et al.*, 2002). Se ha observado que la suspensión de espermatozoides en un medio hipotónico ocasiona un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular y como consecuencia, la célula con membrana funcional aumenta de tamaño (Bredderman & Foote, 1969). En condiciones fisiológicas, la fecundación no ocurre si la membrana plasmática del espermatozoide es bioquímicamente inactiva, aun cuando permanezca estructuralmente intacta, por lo tanto la prueba hipoosmótica es un excelente indicador de la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides (Tamuli & Watson, 1992).

1.9.6. Integridad de la Membrana Plasmática Celular

La membrana plasmática del espermatozoide es esencial para la fecundación. Por ello, es un requisito fundamental que se encuentre intacta y funcional para que el espermatozoide pueda sufrir los eventos de capacitación y reacción acrosomal (Jeyendran *et al.*, 1984). Debido a su composición rica en ácidos grasos insaturados y a la interacción con múltiples estímulos externos, la membrana plasmática de los espermatozoides es el principal sitio donde ocurren las alteraciones cuando el semen es sometido al proceso de criopreservación (Hammerstedt *et al.*, 1990). Los daños que pueden producirse en ésta pueden ser modificaciones en su organización, permeabilidad y composición lipídica (Hidalgo *et al.*, 2009). El procedimiento más utilizado para la valoración de la vitalidad son las técnicas de tinción vital que permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos debido a la permeabilidad de la membrana

plasmática a los colorantes vitales; por lo tanto, aquellas células que presentan una membrana plasmática intacta no permiten el paso del colorante, mientras que si está alterada el colorante penetra en el interior de la célula (Rodríguez Ávalos *et al.*, 2013).

1.9.7. Concentración

Se define como concentración espermática a la cantidad de espermatozoides que se encuentran en una unidad de volumen y está se establece por el recuento de los mismos en una muestra de semen diluido bajo condiciones estandarizadas (Palma & Gottfried, 1997). La presencia de un mayor número de espermatozoides, siempre y cuando sus características sean normales, incrementa la posibilidad de fecundación (Hidalgo *et al.*, 2009). La cantidad 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 reproductor (Amann, 1981). Este aspecto es crucial en el caso de los toros con baja concentración espermática, o en los casos en que se utiliza semen descongelado, que ha sido sometido a estrés durante el proceso de congelación-descongelación, provocando un daño irreversible en un porcentaje elevado de espermatozoides (Hidalgo *et al.*, 2009). El número de espermatozoides presentes en un eyaculado puede presentar ligeras modificaciones según la raza, la edad, el tipo de eyaculación, es decir si ésta es monofásica, bifásica o trifásica, y el método utilizado para recoger el esperma (Palma & Gottfried, 1997).

La concentración espermática puede calcularse por varios métodos a partir de la muestra de semen. Entre estos métodos, se destacan la espectrofotometría, colorimetría, citometría de flujo y el uso de cámaras desarrolladas para el recuento hemocitométrico, como las de Bürker, Neubauer o Thoma (Ibañez *et al.*, 2016).

1.10. Bacterias saprófitas contaminantes del semen

A pesar de las medidas higiénicas que se toman en los centros de inseminación artificial para la manipulación y preparación del semen, existen evidencias sobre la presencia de microorganismos patógenos y saprófitos de varios géneros y especies provenientes del tracto reproductor de toros clínicamente sanos y adquiridos durante la recolección y procesamiento del semen e incluso durante el almacenaje (Silveira Prado & Machado Pérez, 2005). Estudios previos en cerdos indican que la mayoría de los contaminantes presentes en el semen diluido son bacterias Gram negativas, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* (Althouse & Kuster, 2000; Althouse & Lu, 2005). En porcinos, en humanos y en equinos, el crecimiento excesivo de distintas especies bacterianas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* entre otras, produjeron alteraciones en la motilidad espermática y en la integridad de la membrana plasmática celular (Sone *et al.*, 1989; Eaglesome & Garcia, 1997; Althouse & Kuster, 2000; Aurich & Spersger, 2007; Akhter *et al.*, 2008). En seres humanos, se encontró que *E. coli* puede afectar la motilidad espermática tanto por la adherencia como por aglutinación (Wolff *et al.*, 1993; Manoj *et al.*, 1994), o mediante la inducción de cambios estructurales en la pieza intermedia del espermatozoide, la membrana y el acrosoma (Diemer *et al.*, 1996). Otros trabajos realizados en porcinos y humanos, han reportado que, dependiendo del tipo de bacterias, una proporción de espermatozoides–bacterias (unidades formadoras de colonias [UFC]) de aproximadamente 1:1 hasta 100:1 en una muestra, es suficiente para generar efectos no deseados en las dosis de semen y condicionar su fertilidad (Tamuli *et al.*, 1984; Auroux *et al.*, 1991; Althouse & Kuster, 2000). Por lo tanto, los diluyentes que proporcionan la capacidad de extender la vida de almacenamiento de los espermatozoides también proporcionan la oportunidad de que ciertas bacterias contaminantes puedan alcanzar su umbral necesario para provocar un

efecto negativo sobre el potencial de fertilidad (Althouse *et al.*, 2008). Aunque existen controversias sobre la interferencia de las bacterias saprófitas en la calidad del semen y su capacidad fecundante, algunos autores han reportado que la contaminación bacteriana puede competir con los espermatozoides por el uso de nutrientes del semen e incluso infectar a las hembras, resultando en bajas tasas de concepción y altas tasas de mortalidad embrionaria o abortos (Genovez *et al.*, 1999). En este sentido, se ha observado que la presencia de bacterias, puede afectar a la fecundación directamente (Morrell, 2006), o por la inducción de la reacción acrosómica, lo que generará una reducción en viabilidad espermática (El mulla *et al.*, 1996).

Bajo las exigencias sanitarias vigentes, los toros donantes de semen deben estar libres de entidades infecciosas transmisibles a través del semen como lo son la brucelosis, leptospirosis, campilobacteriosis, rinotraqueitis bovina infecciosa, diarrea viral bovina, tuberculosis y leucosis bovina infecciosa. Sin embargo, otros microorganismos no específicos procedentes del prepucio, piel o del ambiente pueden entrar en contacto con el semen y contaminarlo en el momento de la recolección o durante el proceso de congelación (Trujillo & Rivera, 2002). Además de estos agentes transmisibles, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 1996) destaca que hay otros agentes patógenos y bacterias saprofitas que pueden ser capaces de contaminar el semen de los toros. Existen dos fuentes principales de contaminación seminal: las de origen animal y las de origen no animal. La primera fuente incluye, entre otras, las contaminaciones procedentes de las heces, fluidos prepuciales, secreciones respiratorias, piel y pelo (Coehlo, 1976; Flatscher & Holzmann, 1984); Muchos patógenos y bacterias de la microbiota de la cavidad prepucial sobreviven a los procesos de industrialización, con el riesgo para los animales y, a veces para la salud pública, ya que algunos agentes son

zoonóticos (Palit *et al.*, 1986; Eaglesome & Garcia, 1997; Genovez *et al.*, 1999; Ronald & Prabhakar, 2001). La segunda fuente de contaminación del semen está relacionada con la utilización de materiales no esterilizados, equipos, malas condiciones higiénicas, y/o la contaminación humana (Althouse & Kuster, 2000; Althouse & Lu, 2005).

1.11. Hongos y levaduras contaminantes del semen

Si bien la bibliografía existente acerca de la contaminación por hongos en semen criopreservado es muy escasa, Morrell & Wallgren (2011) han reportado, en la especie equina, que los antifúngicos podrían tener un efecto perjudicial sobre los espermatozoides, lo cual dificulta su empleo para la refrigeración y congelación del semen. Por otro lado, se ha reportado entre los mohos, la presencia de *Aspergillus spp* y entre las levaduras *Candida albicans* en semen equino criopreservado en presencia de antibióticos (Vaid *et al.*, 2012). Además, otra investigación llevada a cabo en la misma especie advierte la presencia de las especies fúngicas *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus*, y levaduras *Candida inconspicua*, *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus humicola* y *Cryptococcus laurentii* (Corona & Cherchi, 2009). Complementariamente, Morales Berrocal *et al.* (2017) han encontrado una relación entre la presencia de *Candida albicans* en semen de la especie humana y una disminución en la calidad seminal, resultando en una disminución de la movilidad espermática, apoptosis, vacuolización nuclear, vesículas en membrana acrosomal externa y flagelos hinchados al coincubar con los espermatozoides. Los antibióticos añadidos al medio crioprotector no son adecuados para proteger al semen congelado de la contaminación microbiana fúngica (Corona & Cherchi, 2009).

1.12. Efectos deletéreos de la contaminación por microorganismos

Un estudio llevado a cabo en cerdos demostró que para esta especie la contaminación bacteriana genera alteraciones en el semen como disminución de la motilidad, aglutinación espermática, alteraciones del acrosoma y reducción del pH hasta niveles ácidos (Izquierdo *et al.*, 2015). Complementariamente, en la especie humana Pardo *et al.* (2015) han obtenido resultados que sugieren que la incubación de espermatozoides con los factores solubles, producto del metabolismo, de tres especies bacterianas del género *Staphylococcus* puede afectar la calidad espermática y por ende la función reproductiva masculina. Asimismo se ha demostrado que la incubación de espermatozoides humanos con bacterias del género *Escherichia* o sus factores solubles, alteran la movilidad espermática (Cano Cháves *et al.*, 2017). Por otra parte, un estudio llevado a cabo en cerdos determinó que la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en semen fresco, afecta negativamente la movilidad espermática, no obstante en este estudio no se encontró diferencia significativa entre la presencia o ausencia de *Escherichia coli* y la aglutinación espermática (Rodríguez, 2017). Adicionalmente, Baud *et al.* (2019) analizaron la microbiota seminal de hombres con parámetros de espermogramas normales y anormales, y encontraron que la abundancia de géneros específicos como, *Prebotella*, *Staphylococcus* y *Lactobacillus* afecta negativamente la movilidad espermática así como también se encuentran relacionadas a espermatozoides con morfología anormal. Otro estudio llevado a cabo en ovinos determinó anomalías en la morfología espermática de semen criopreservado contaminado con *Campylobacter fetus* (López de Armentia, 2017). Los hallazgos antes descritos son evidencia significativa del efecto negativo que causan las bacterias contaminantes en semen de distintas especies.

La información sobre el impacto de las bacterias saprófitas en la calidad del semen de toros es muy limitada y la mayor parte de los trabajos científicos han sido realizados en porcinos y equinos, debido a que en estas especies el semen se mantiene por varios días refrigerado (5°C). A pesar de la gran importancia que se concede a la calidad bacteriológica del semen criopreservado de toros, sobre todo en el comercio mundial, son escasos los estudios realizados para determinar la presencia de las bacterias contaminantes del semen y el efecto de éstas sobre la calidad seminal. Del mismo modo, se desconoce la existencia de trabajos en bovinos en los que se investiguen la prevalencia de microorganismos contaminantes y la resistencia de los mismos a los antibióticos comúnmente utilizados en los diluyentes para criopreservación. Con el presente proyecto se espera evaluar diferentes técnicas y estrategias de cultivo bacterianos con mayor grado de eficiencia en el aislamiento de microorganismos que normalmente no pueden ser aislados; determinar la prevalencia de diferentes agentes microbianos en muestras de semen criopreservadas de origen comercial y establecer interacciones entre los hallazgos microbiológicos y los parámetros de calidad espermática; agregando valor e innovando en la evaluación de parámetros desatendidos actualmente en una evaluación seminal convencional.

1.13. Recomendaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal

La Organización Mundial de la Sanidad Animal (2001) establece a través de su código zoonosanitario internacional una serie de recomendaciones generales para la toma y manipulación higiénicas de semen de bovinos con el fin de obtener semen prácticamente exento de bacterias comunes potencialmente patógenas. Dichas recomendaciones apuntan a mantener una buena higiene en las instalaciones en las que se toma el semen, en los laboratorios de tratamiento del mismo, así como también las

condiciones de control sanitario que deben aplicarse tanto a toros como a animales excitadores. El respeto de estas recomendaciones puede evitar la contaminación del semen según la OIE (2001). Los recuentos de las colonias de bacterias (UFC/ml) presentes en el semen tratado son indicadores importantes de las normas de higiene observadas en el laboratorio de tratamiento del semen. El resultado del recuento no debe superar el valor de 5×10^3 UFC/ml (OIE, 2001). Las consideraciones para determinar si una pajuela es apta o no apta para inseminación artificial se basan en las normas ISO 9002 que exigen que el semen esté libre de patógenos y toleran hasta 500 UFC de gérmenes oportunistas por unidad de inseminación. La OIE clasifica el semen en calidad bacteriológica media entre 500 y 5000 UFC, y baja ≥ 5000 UFC (Catena *et al.*, 2014).

2. HIPÓTESIS

Las pajuelas de semen bovino de origen comercial presentan microorganismos saprófitos contaminantes que sobreviven a los procesos de industrialización del semen y que afectan negativamente los parámetros de calidad seminal y que son resistentes a los antibióticos de uso habitual en los diluyentes para criopreservación.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Caracterizar las bacterias saprófitas presentes en muestras de semen bovino congelado-descongelado, y determinar la resistencia de los aislamientos a los antibióticos más utilizados para minimizar los posibles daños ocasionados por la presencia de las mismas y mejorar la eficiencia reproductiva de los programas de inseminación artificial.

3.2. Objetivos específicos

1. Determinar diferencias respecto al aislamiento microbiológico en dos tiempos distintos de incubación (2 hs vs 24 hs).
2. Caracterizar microbiológicamente muestras de semen bovino criopreservado de origen comercial.
3. Evaluar la relación que existe entre los hallazgos microbiológicos y los parámetros de calidad espermática en las muestras de semen criopreservadas de origen comercial.
4. Establecer los perfiles de resistencia de los agentes aislados en el objetivo 2 a los antibióticos de uso frecuente en los diluyentes.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en los laboratorios de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Marcos Juárez del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), ubicada en la Ruta Provincial 12 km 3, Marcos Juárez Provincia de Córdoba, Argentina.

El trabajo experimental de dicho estudio se dividió en dos experimentos complementarios. El objetivo del primer ensayo fue determinar si existen diferencias respecto al crecimiento de microorganismos en las muestras de semen dependiendo del tiempo de incubación en un medio de enriquecimiento, y de esta forma establecer una metodología que permita recuperar y aislar microorganismos que requieran mayor tiempo para desarrollar en la muestra de semen sembrada.

4.1. Experimento 1

Con la finalidad de estandarizar el manejo de las muestras y poner a punto las estrategias de cultivo microbiano, se realizó una primera evaluación en la que se utilizaron 12 muestras de semen criopreservado comercial de distintos orígenes. Como las muestras estudiadas aquí son de origen comercial, se encuentran inmersas en diluyentes formulados con antibióticos. Es por esta razón que se decidió la realización de un enriquecimiento previo a la siembra y evaluar dos tiempos de incubación distintos (2 hs y 24 hs). A partir de los hallazgos de este primer ensayo se estandarizaron los procedimientos de cultivo microbiano que se siguieron a lo largo del desarrollo experimental de todo el trabajo.

Las muestras fueron descongeladas en un baño termostático a una temperatura constante de 37°C, durante 1 minuto. Luego se sembraron alícuotas de 100 µl de semen, bajo mechero y manteniendo la esterilidad, en 900 µl de caldo o infusión Cerebro

Corazón (BHI). Este enriquecimiento se incubó en estufa a 37°C y en aerobiosis durante 2 horas (tiempo 1) y 24 horas (tiempo 2). Transcurridos dichos tiempos, se procedió a la realización de las diluciones y siembra de los enriquecimientos. Se realizaron diluciones seriadas en base 10, se tomaron 100 µl del caldo preenriquecido (procediendo de la misma manera en cada tiempo evaluado, 1 y 2) y se agregaron a 900 µl de caldo fresco hasta una dilución final de 10⁵. Para realizar los recuentos microbianos, de cada dilución se sembraron 100 µl en superficie en placas de TSA (Britania, CABA, Argentina) y Mac Conkey (Britania, CABA, Argentina) incubadas en estufa a 37°C por 24 - 48 horas en aerobiosis, y también se sembró en placas de Hongos y Levaduras (Britania, CABA, Argentina) se incubaron en estufa a 28°C durante 72 horas en aerobiosis (Terzolo *et al.*, 1991) (Fig. 6). También se tomó una ansada del caldo de preenriquecimiento al tiempo 2 de incubación y se sembró en una placa de Agar Sangre Columbia (ASC) (Oxoid Ltd, Wad Road, Basingstoke, UK), incubadas en estufa a 37°C por 24 - 48 horas en microarofilia, para la identificación y tipificación microbiana (Terzolo *et al.*, 1991) (Fig. 7).

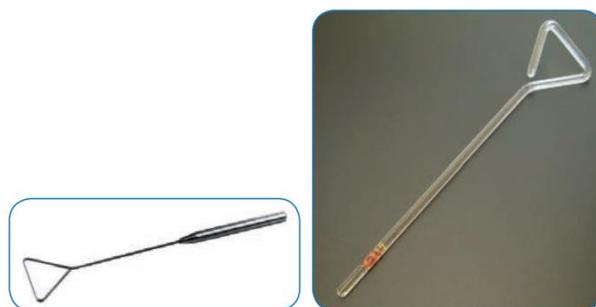


Figura 6. Asa de Digralsky, utilizada para sembrar placas en superficie. Fuente: Página web Cienytech.



Figura 7. Asa de siembra punta redonda, utilizada para sembrar placas con el método de estrías por agotamiento. Fuente: Página Web Ivoo Industries.



Figura 8. Jarra utilizada para el cultivo de microorganismos en microaerofilia. Fuente: Página Web Grupo Milligram.

4.2. Experimento 2

4.2.1. Determinación de la calidad seminal

Se evaluaron 100 pajuelas de semen bovino criopreservado de origen comercial procedente de diferentes centros de reproducción bovina. Los toros donantes de semen estaban libres de entidades infecciosas específicas transmisibles a través del semen como lo son: brucelosis, leptospirosis, campilobacteriosis, rinotraqueitis bovina infecciosa, diarrea viral bovina, tuberculosis y leucosis bovina infecciosa. Las muestras se almacenaron en un termo con nitrógeno líquido hasta el momento de su evaluación.

Las pajuelas de semen bovino criopreservado fueron retiradas del termo de nitrógeno líquido y rápidamente sumergidas en un baño termostático a 37°C durante 1 minuto para su descongelación. Transcurrido ese tiempo, se procedió a secar y cortar la pajuela por ambos extremos y colocar el semen en tubos Falcon estériles para su evaluación. Las

evaluaciones de todos los parámetros de calidad fueron realizadas por duplicado, es decir en dos tiempos, tiempo 0: al momento del descongelado de la pajueta de semen y tiempo 2: transcurridas 2 horas de la descongelación. Todas las observaciones fueron realizadas por el mismo operario y para las mismas se utilizó un microscopio óptico a distintos aumentos según los requerimientos de cada prueba realizada. Además, se utilizó una platina térmica para mantener los preparados a temperatura correcta. Durante todo el proceso de evaluación, el semen permaneció a temperatura constante de 37°C en el baño térmico. Los parámetros de calidad analizados fueron los siguientes:

4.2.1.1. Motilidad Total (MT)

Para evaluar dicho parámetro se colocó una alícuota de 7 µl de semen sobre un portaobjetos limpio atemperado a 37 °C sobre una platina térmica. A continuación, se colocó un cubreobjetos sobre el portaobjetos y se procedió a visualizar y estimar subjetivamente la proporción (%) de espermatozoides móviles, mediante la observación de al menos 3 campos microscópicos, en un microscopio óptico (400X).

4.2.1.2. Motilidad Rectilínea Progresiva (MRP)

Para la determinación de la motilidad rectilínea progresiva se colocaron 7 µl de semen sobre un portaobjetos atemperado a 37°C. Se colocó un cubreobjetos sobre la muestra y se observaron en microscopio óptico (400X) diferentes campos para determinar el porcentaje (%) de espermatozoides móviles con desplazamiento de avance, es decir aquellos espermatozoides que logren atravesar el campo de observación.

4.2.1.3. Vigor

Para determinar el vigor se colocaron 7 µl de semen entre un portaobjetos atemperado a 37°C y un cubreobjetos sobre la muestra y se procedió a observar varios campos con un

microscopio óptico (400X). Para el análisis de este parámetro, se utilizó una escala de 0 a 5 según Catena (1999), determinando como 0 a los espermatozoides sin movimiento y 5 a aquellos cuyo movimiento progresivo fue muy rápido, es decir, aquellas células que fueron difíciles de seguir visualmente.

4.2.1.4. Funcionalidad de la Membrana Plasmática Celular (FMP)

Esta evaluación se realizó a través de un método basado en el descrito por Jeyendran *et al.* (1984) para la especie humana, adaptado al estudio del semen bovino. Para ello, se tomó una alícuota de 20 μ l de semen, la cual fue incubada en Baño María a 37°C, durante 30 minutos en 500 μ l de solución HOS (medio hiposmótico ajustado a 100 mOsm/l, ver anexo). Transcurrido el tiempo necesario de incubación se procedió a frenar la reacción con 50 μ l de solución HOS-STOP (ver anexo). Posteriormente, una gota de 7 μ l fue colocada entre porta y cubreobjetos, y microscópicamente (400X) se contabilizaron 200 células. Se consideraron células positivas (espermatozoides con flagelo enrollado = HOS +) y negativas (casos en que el flagelo se encontró recto o en forma de látigo) (Fig.9).

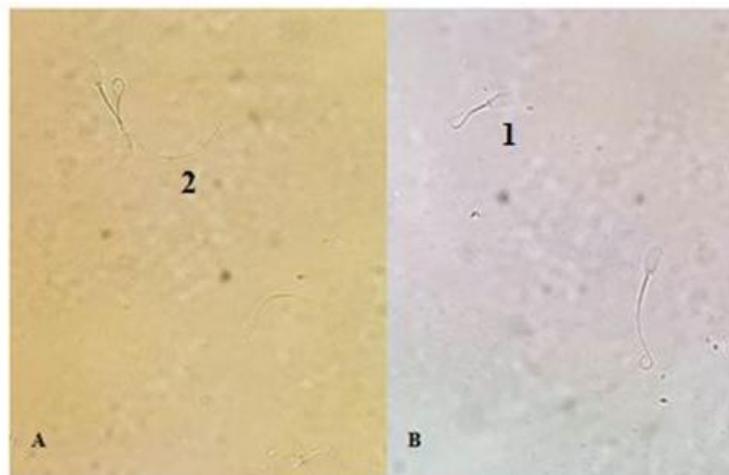


Figura 9. A.B. Microfotografía de espermatozoides bovinos congelados-descongelados sometidos a test de endosmosis (HOS-T). **1:** flagelo enrollado (HOS (+) positivo: membrana plasmática funcional). **2:** flagelo recto (HOS (-) negativo: membrana plasmática no funcional).

4.2.1.5. Integridad de la Membrana Plasmática Celular (IMP)

Para determinar el porcentaje de espermatozoides con alteraciones en la integridad de su membrana se utilizó la técnica de tinción vital eosina-nigrosina, según una modificación del método descrito por Mortimer (1994). Para ello, se colocó una alícuota de 7 μ l de la muestra sobre un portaobjetos y al lado de ésta, una alícuota (10 μ l) de la solución de eosina-nigrosina. Ambas gotas fueron mezcladas y debidamente homogeneizadas durante 10 segundos. Una vez unificadas ambas gotas, se realizó un frotis el cual fue secado sobre platina térmica a 37°C. Posteriormente se contabilizaron 200 células en un microscopio óptico (400X) para determinar el porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra. Los espermatozoides total o parcialmente coloreados (rosado-violeta) fueron considerados como células con alteraciones en la integridad de la membrana, mientras que aquellos que no se tiñeron (blancos) se consideraron como células con la membrana plasmática intacta (Fig. 10).

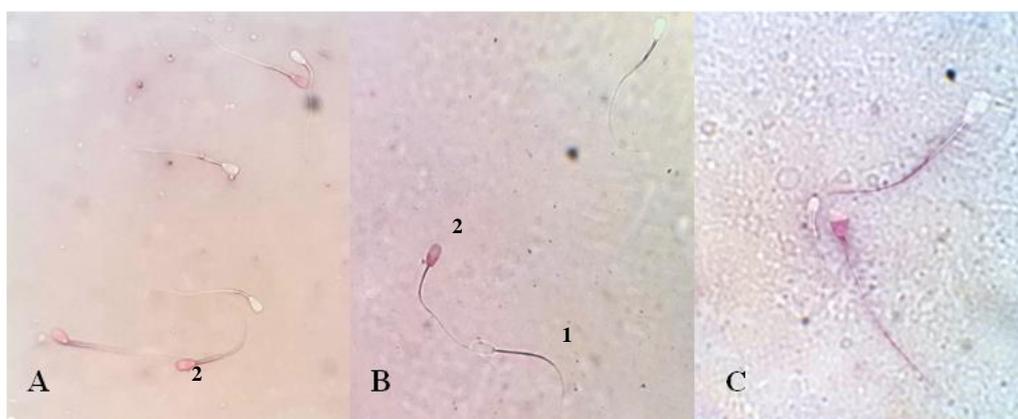


Figura 10. A. B. Microfotografía (400X) de espermatozoides bovinos congelados-descongelados sometidos a la tinción vital eosina-nigrosina. C. Microfotografía (1000X) de espermatozoides bovinos congelados- descongelados sometidos a tinción vital eosina-nigrosina. **1:** membrana plasmática intacta. **2:** membrana plasmática alterada.

4.2.1.6. Concentración

La concentración espermática fue contabilizada a través de la cámara de Neubauer, para lo cual se realizó una dilución de 1:200 (50 μ l de semen en 10 ml de agua destilada). Para preparar la cámara, se debió humedecer los bordes de ésta antes de colocar el cubrecámara y luego se presionó ejerciendo una leve fricción para que el cubrecámara quede fijo. Una vez cargada por capilaridad, se realizó el conteo de los espermatozoides ubicados dentro de los 4 cuadrantes primarios que se encuentran en los extremos del cuadrulado de la cámara (Fig.11). El cálculo que se utilizó para determinar la concentración espermática es el siguiente:

- El número total de espermatozoides fue dividido por 4, debido a que son cuatro los cuadrantes en los que se realizó el conteo, para obtener el N° promedio de espermatozoides por mm^2 .
- El número obtenido a partir del promedio de los 4 cuadrantes se multiplicó por 10 debido a que la altura de la cámara es de 0,1 mm y los cálculos se remiten a mm.
- Luego se multiplicó por 1000 para unificar la unidad de medida (ml).
- Luego se multiplicó por 200 que es el factor de dilución de la muestra de semen.
- Por último, el valor obtenido se dividió por 2 ya que cada pajuela contiene un volumen de 500 μ l y el cálculo final está determinado para un volumen de 1000 μ l.

$\text{N}^\circ \text{ espermatozoides/ml} = \bar{E} \text{ contados} \times \text{Área total de recuento} \times \text{Factor de volumen}$ $\times \text{Factor de dilución}$
--

La concentración espermática obtenida a partir del cálculo anterior es de millones de espermatozoides en 1 ml. Cabe aclarar que el volumen de las pajuelas analizadas es de 500 μ l.

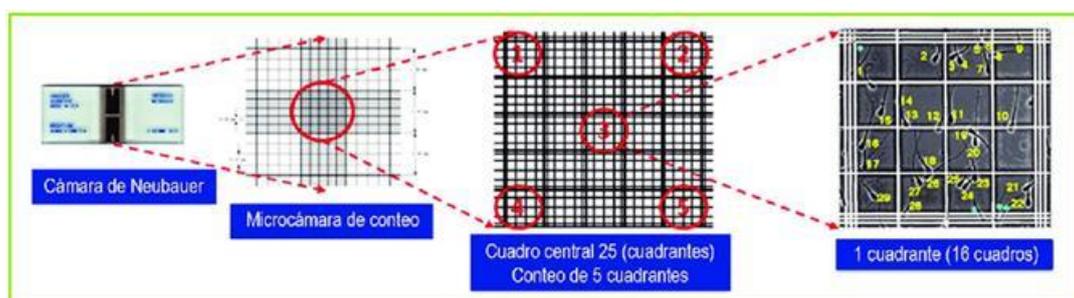


Figura 11. Esquema de la cámara de Neubauer utilizada para el recuento de espermatozoides.

4.2.2. Caracterización microbiológica de las muestras de semen bovino congeladas/descongeladas

Sobre las mismas pajuelas donde se realizaron las evaluaciones antes descritas se procedió a realizar las siguientes determinaciones microbiológicas:

4.2.2.1. Prevalencia microbiológica

Para determinar el número de unidad formadoras de colonias (UFC), las muestras de semen fueron diluidas 1:10 en caldo BHI estéril (100 μ l de semen en 900 μ l de caldo) y luego 100 μ l sembrados en placas para recuento de mesófilos totales, coliformes, hongos y levaduras por duplicado. El conteo de las colonias fue realizado luego de la incubación a 37°C durante 24 h en el caso de bacterias, mientras que el recuento de hongos y levaduras se realizó luego de 72 h de incubación a 28°C.

4.2.2.2 Identificación de la población bacteriana

Los géneros bacterianos fueron identificados sobre la base de características de las colonias, tinción de Gram, morfología microscópica y reacciones bioquímicas, según Bargey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt, 1994). Las pruebas bioquímicas de identificación preliminar de lectura inmediata que se utilizaron son Catalasa y Oxidasa, por otro lado, se utilizaron pruebas bioquímicas de lectura lenta: prueba de Fenilalanina Desaminasa, prueba de Urea, prueba de Citrato, prueba de Sulfuro Indol Movilidad (SIM), prueba de Agar Triple Azúcar Hierro (TSI), prueba de Agar Lisina Hierro (LIA). La siembra de los medios sólidos de las pruebas de lectura lenta antes mencionadas se realizó mediante dos métodos: método de picadura y estría en pico de flauta.

4.2.2.3. Tinción Gram

Es definida como una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: Gram negativas y Gram positivas. Los principios de esta técnica están basados en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo (Esaú López-Jácome *et al.*, 2014). En primer lugar, se colocó como colorante primario cristal violeta durante 1 minuto, éste tiene afinidad con el peptidoglicano de la pared bacteriana. Posteriormente, se lavó con agua corriente y se colocó lugol durante 1 minuto y medio, el cual sirve como mordiente e impide la salida del cristal violeta por la formación de un complejo cristal violeta-yodo que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana. Enseguida, se empleó sobre el preparado una mezcla de alcohol-acetona durante 15 segundos, como decolorante (Bou *et al.*, 2011). Por último, se colocó safranina durante 1 minuto, la cual funciona como un colorante secundario o de

contratinción y sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo (Fig. 12). La tinción sobre los frotis fue visualizada con ayuda de un microscopio óptico 1000X, para lo cual fue necesario adicionar una gota de aceite de inmersión sobre el preparado.

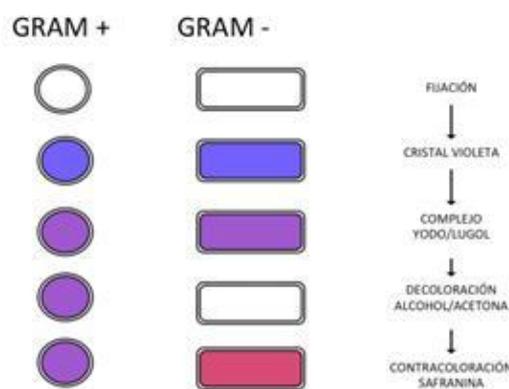


Figura 12. Pasos que se llevaron a cabo en la realización de la tinción de Gram. Fuente: Bonilla Salinas *et al.* (2016).

4.2.2.4. Perfil de resistencia a antibióticos de uso común en la criopreservación

La resistencia antimicrobiana de las cepas aisladas, se determinó utilizando el método de difusión en disco, según las directrices del Clinical and Laboratory Standards Institute (2014). Para ello, se procedió a descongelar cepas que se encontraban hasta el momento a -80°C en crioviales con medio BHI y glicerol. Posteriormente, se continuó con la siembra en esterilidad del inóculo puro en placas, que contenían previamente medio de cultivo Mueller Hinton (MH). Es preciso aclarar que, en el caso de las cepas de *Streptococcus spp.*, a dicho medio se le adicionó 6% de sangre equina ya que es requerimiento de dicho género bacteriano para desarrollarse. Para llevar a cabo el proceso siembra, se tomaron con el asa de siembra, previamente esterilizada, 2 o 3 colonias y se distribuyeron homogéneamente

(en varios sentidos) en la superficie de la placa. Luego, se procedió a colocar rápidamente los discos de antibióticos con una pinza sobre la superficie del agar a una distancia de más de 2 cm entre ellos. Esta maniobra requiere de una ligera presión para asegurar el contacto con el agar. Se ensayaron los antimicrobianos recomendados por la Organización Mundial de la Sanidad Animal (1996) para su uso en los diluyentes de semen: gentamicina, penicilina y estreptomycin. Adicionalmente se determinó la resistencia a los antibióticos: azitromicina, tetraciclina y norfloxacin (Oxoid®). Estos últimos son también utilizados comúnmente en diluyentes para la elaboración de dosis seminales. Después de 24 horas de incubación a 37°C en estufa de cultivo se midieron los halos de inhibición (expresados en mm) y se caracterizaron los aislamientos como Sensible, Intermedio o Resistente, de acuerdo a los puntos de corte recomendados por CLSI (2014) (Fig. 13).

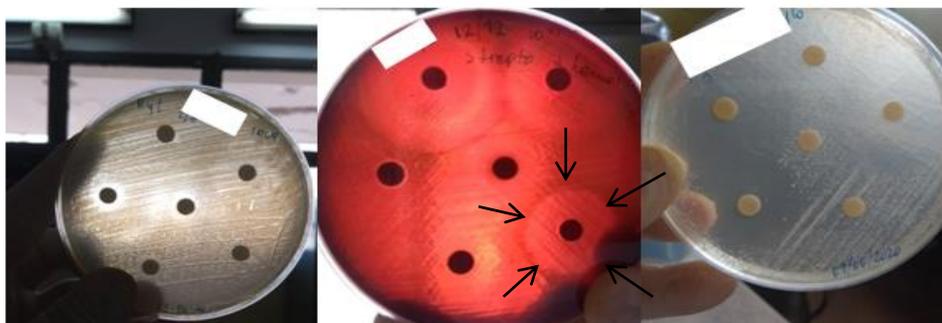


Figura 13. Placas con diferentes medios de cultivo en las cuales se visualiza los halos de inhibición de los antibióticos y el crecimiento de las cepas aisladas. Las flechas negras indican el diámetro de uno de los halos de inhibición.

4.3. Análisis estadístico

En el experimento 1 se determinó la frecuencia absoluta de microorganismos para las 12 muestras de semen analizadas luego de la incubación a distintos momentos (2 hs y

24 hs) en BHI. Para establecer las diferencias entre los momentos de incubación y el desarrollo de microorganismos se utilizaron tablas de contingencias y el test exacto de Fisher.

Las variables de calidad seminal del experimento 2 se expresaron como promedio \pm D.E de cada uno de los parámetros analizados. Se utilizaron test de diferencias de medias para establecer el efecto de la presencia de los diferentes agentes microbianos sobre las variables de calidad seminal. Esta determinación se realizó en los dos tiempos de incubación. El nivel de significación utilizado fue del 0,05.

5. RESULTADOS

5.1. Experimento 1

En la tabla 1 se presentan los resultados del experimento de tiempos de incubación expresados en las frecuencias absolutas de aislamientos para hongos y levaduras, enterobacterias y mesófilos totales.

No se observó diferencias estadísticas significativas en el desarrollo de hongos y levaduras, enterobacterias y mesófilos luego de 2 h ($p=0.8515$) y 24 h ($p=0,0724$) de incubación. Sin embargo, la incubación durante 24 horas en BHI favoreció el desarrollo de mesófilos totales (Tabla 1). Independientemente del medio de cultivo utilizado, el desarrollo de microorganismos fue significativamente mayor luego de la incubación durante 24 horas en BHI (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencias absolutas del desarrollo de microorganismos aislados de muestras de semen bovino criopreservado luego de su incubación en medio BHI en dos tiempos.

Microorganismos	2 HS	24 HS	p valor
Hongos y levadura	2/12	2/12	0,303
Enterobacterias	3/12	3/12	0,637
Mesófilos totales	2/12	7/12	0,091
Total	58% (7/12)	100% (12/12)	0,044

5.2. Experimento 2

5.2.1. Determinación de calidad seminal

Los resultados de las determinaciones de calidad seminal realizadas inmediatamente después de la descongelación (hora 0) y luego de dos horas de incubación se presentan en la tabla 2. Todos los parámetros de calidad seminal evaluados al momento de la descongelación, mostraron un mayor valor respecto de la evaluación realizada luego de dos horas de incubación.

Tabla 2. Parámetros de calidad seminal evaluados en semen bovino congelado/descongelado de origen comercial en diferentes tiempos de incubación.

Variable	T1 (0 horas)	T2 (2 horas)	P-valor
MT (%)	51,5 ± 0,1	26,81 ± 0,08	< 0,001
MRP (%)	41,4 ± 0,1	15,85 ± 0,07	< 0,001
Vigor	2,86 ± 0,55	1,35 ± 0,48	< 0,001
FMP (%)	38,34 ± 0,14	26,94 ± 0,11	< 0,001
IMP (%)	32,64 ± 0,10	27,05 ± 0,09	< 0,001
Concentración	28 millones ± 7 millones		

M. T.: Motilidad Total; MRP: Motilidad Rectilínea Progresiva; FMP: Funcionalidad de la Membrana Plasmática; IMP: Integridad de la Membrana Plasmática.

5.2.2. Prevalencia microbiológica

A continuación, en la tabla 3 se muestran las frecuencias absolutas, de microorganismos aislados en las muestras de semen bovino criopreservado. Se observó un mayor desarrollo de bacterias Gram positivas respecto de las Gram negativas en las muestras de semen bovino criopreservado (Fig. 14). Asimismo, se observó que el aislamiento de hongos y levaduras fue superior al resto de los microorganismos encontrados (Tabla 3).

Tabla 3. Prevalencia de microorganismos aislados en muestras de semen bovino criopreservado de origen comercial.

Microorganismos	Frecuencia Absoluta de aislamientos
Bacterias Gram -	
<i>Erwinia spp.</i>	1/100 (6%)
<i>Hafnia alvei</i>	1/100 (6%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1/100 (6%)
Bacterias Gram +	
<i>Streptococcus spp.</i>	5/100 (30%)
Levaduras y Hongos	8/100 (47%)
Sin identificación	1/100 (6%)

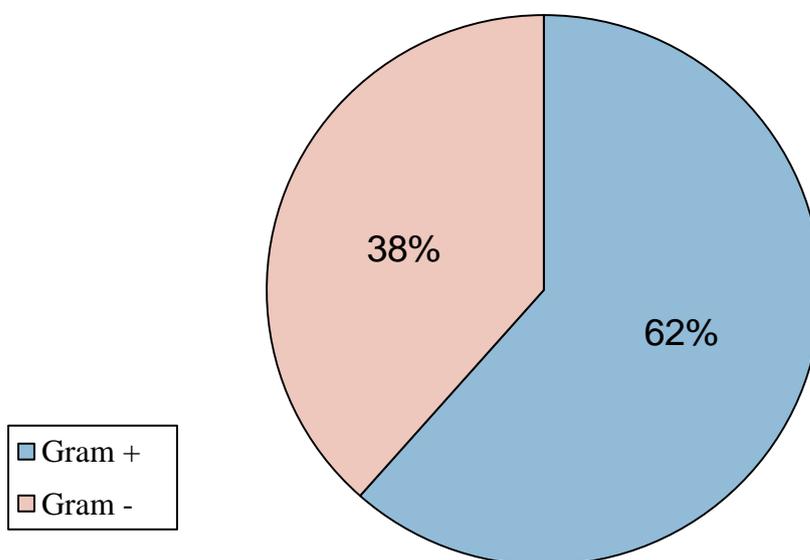


Figura 14. Prevalencia de microorganismos Gram positivos y Gram negativos aislados en muestras de semen bovino criopreservado.

5.2.3. Efecto de la presencia de microorganismos sobre las variables de calidad del semen

En la tabla 4 se describen los promedios de las variables de calidad seminal encontrados ante la presencia y ausencia de aislamientos microbianos en las muestras de semen bovino criopreservado. La presencia de microorganismos en las muestras de semen bovino congelado/descongelado no afectó las variables evaluadas en los dos tiempos de incubación analizados.

Tabla 4. Promedios de las variables de calidad de semen bovino criopreservado con presencia/ausencia de aislamientos microbianos en las muestras en dos tiempos de incubación.

Variable	T1: 0 HS			T2: 2 HS		
	Ausencia	Presencia	P-valor	Ausencia	Presencia	P-valor
MT	0,51	0,54	0,235	0,27	0,26	0,707
MRP	0,41	0,43	0,404	0,16	0,16	0,706
Vigor	2,89	2,79	0,403	1,35	1,36	0,926
FMP	0,32	0,35	0,228	0,26	0,30	0,100
IMP	0,38	0,40	0,647	0,28	0,26	0,618

MT: Motilidad Total; MRP: Motilidad Rectilínea Progresiva; FMP: Funcionalidad de la Membrana

Plasmática; IMP: Integridad de la Membrana Plasmática.

5.2.4. Perfil de resistencia a antibióticos de uso común en la criopreservación

Los resultados que se muestran en la tabla 5 corresponden al perfil de resistencia o susceptibilidad de los distintos géneros microbianos aislados en el presente estudio. Los mismos demuestran que los microorganismos hallados en las muestras de semen bovino congelado-descongelado fueron en su mayoría resistentes a los antibióticos que se adicionan en los diluyentes para criopreservación de semen.

Tabla 5. Perfil de resistencia a los antibióticos de uso habitual en la criopreservación de semen bovino.

Antibióticos ensayados	Hongos/ levaduras								<i>Streptococcus spp</i>					<i>Hafnia alvei</i>	<i>Erwinia spp</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5			
Estreptomicina	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R
Gentamicina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
Penicilina	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R
Azitromicina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
Tetraciclina	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	R	R
Norfloxacina	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S

R: resistente. S: susceptible. I: intermedio

6. DISCUSIÓN

La incubación del semen bovino durante 24 horas en caldo BHI favoreció el desarrollo de mesófilos totales, esto se condice con la recuperación metabólica bacteriana. Esto podría deberse a que durante el procesamiento del semen y el descenso térmico provocado por la criopreservación, los microorganismos reducen su metabolismo, razón por la cual tras la descongelación de la muestra de semen, dichos microorganismos requieren un tiempo de estabilización para poder crecer y desarrollarse en el medio de cultivo. Un estudio llevado a cabo por Sánchez Leal & Corrales Ramírez (2005) determinó que es significativa la reducción en la velocidad metabólica en microorganismos que son sometidos al proceso de congelación. Dicha incubación en caldo BHI por 24 hs también permite que el desarrollo en placa de las colonias de los microorganismos adquiera las características morfológicas propias de cada especie. Es posible que los microorganismos hallados en las muestras de semen criopreservadas presenten daños metabólicos reversibles; en este sentido, la incubación posibilitaría la recuperación metabólica de las distintas especies microbianas existentes en las mismas.

En este trabajo se determinó que la prevalencia de microorganismos en las muestras de semen bovino congelado/descongelado fue del 28%. Entre las mismas, se detectó mayor desarrollo de bacterias Gram positivas respecto de las Gram negativas. Contrariamente, un trabajo desarrollado por Aguayo Cerna, (2017) determinó mayor presencia de microorganismos Gram negativos con respecto a los Gram positivos en muestras de semen fresco de humanos.

A pesar de encontrarse una importante prevalencia microbiana en las muestras, no se pudo demostrar que los mismos afecten los parámetros de calidad seminal. Esto podría deberse al escaso tiempo en el cual los espermatozoides estuvieron expuestos a los

microorganismos (1 minuto a 37°C). Contrariamente a nuestros hallazgos, estudios realizados en semen humano, determinaron que la presencia de *E. coli*, bacilo Gram negativo, afectó la motilidad de los espermatozoides tanto por adherencia como por aglutinación y provocó un deterioro sobre la morfología espermática, dependiendo de la relación semen-bacteria (Wolff *et al.*, 1993; Sanocka *et al.*, 2004; Viscarra *et al.*, 2013). Coincidentemente, un estudio también realizado en humanos, determinó que la pérdida de motilidad de los espermatozoides estuvo asociada a la presencia de endotoxinas bacterianas tales como lipopolisacáridos de *E. coli* (Galdiero *et al.*, 1994). Complementariamente, otro trabajo realizado en ovinos, ha demostrado que la presencia de 10^7 UFC/ml de *E. coli* afectó negativamente los parámetros de calidad espermática como integridad y funcionalidad de la membrana plasmática y también aumentó el porcentaje de espermatozoides en proceso de apoptosis (Flores Olivares, 2014). En dicho estudio se observó que la coincubación de *E. coli* con espermatozoides causó alteraciones en todos los tiempos de evaluación (0,5; 1,5 y 2,5 horas). Asimismo, la ausencia de efectos sobre la motilidad del semen observada en nuestro trabajo, podría ser consecuencia del menor desarrollo de microorganismos Gram negativos, que son, según lo reportado en la bibliografía, los responsables de provocar alteraciones en estas variables (Flores Olivares, 2014).

Por otra parte, un estudio llevado a cabo por Martínez *et al.* (1987) reveló que la presencia de distintas bacterias, entre ellas bacterias del género *Streptococcus spp* provocó cambios metabólicos en los espermatozoides del semen bovino recién colectado (fresco), afectando la calidad espermática, condicionando la capacidad fecundante. Si bien en nuestro trabajo el género bacteriano *Streptococcus spp* fue hallado en un alto porcentaje de las muestras, no encontramos un efecto deletéreo sobre la calidad seminal.

En este estudio, se pudieron identificar y conservar 17 aislamientos de distintas muestras, el 47 % correspondió a levaduras, el 30 % a bacterias del género *Streptococcus spp*, 18 % de enterobacterias y el 6 % restante no pudo ser identificado a través de los métodos microbiológicos convencionales. Si bien en este trabajo no se realizó una identificación de los aislamientos fúngicos obtenidos, es importante destacar que fueron los microorganismos hallados con mayor frecuencia. La bibliografía sobre hongos o levaduras presentes en semen criopreservado es muy escasa, no obstante, se han reportado resultados de distintos trabajos en los cuales se aislaron levaduras de semen fresco, tanto en cerdos como en humanos. Neri-vidaurri *et al.* (2018) reportaron la presencia, aunque en bajo porcentaje, de *Candida albicans* en espermocultivos de semen fresco realizados a hombres. Por su parte, Bello *et al.* (2013) encontraron hongos del género *Fusarium spp* y levaduras en semen fresco y diluido en un alto porcentaje de muestras de porcinos, aunque no pudieron determinar alteraciones sobre los parámetros de calidad seminal ocasionadas por la presencia de dichos microorganismos. Además, en el mismo estudio, hallaron la presencia de *Streptococcus spp*, siendo este género bacteriano junto con las levaduras los microorganismos prevalentes tanto en el semen fresco como en el diluido. En coincidencia con el estudio antes citado, en nuestro trabajo los microorganismos con mayor presencia fueron levaduras y bacterias del género *Streptococcus spp*.

En relación a los perfiles de resistencia a los agentes antimicrobianos de uso frecuente en diluyentes de semen bovino, hallamos una elevada tasa de resistencia. Más aun, todos los aislamientos presentaron resistencia al menos a un antibiótico. En este punto es importante resaltar que se han evaluado drogas pertenecientes a distintos grupos de antimicrobianos recomendados por la OIE como: β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, macrólidos y naftacenocarboxamida policíclica (tetracilinas). Lo que remarca

la escasa eficacia de los mismos para ser empleados en los diluyentes seminales. En contraposición a nuestros resultados, Trujillo & Rivera (2002) determinaron en semen bovino la acción bactericida de un conjunto de antibióticos de uso habitual.

La importancia del presente trabajo final de grado radica en que debido a que la criopreservación de semen bovino es una valiosa biotecnología reproductiva utilizada en la mejora genética de los rodeos nuestro país, resulta fundamental que la calidad del semen utilizado sea óptima. Destacando en este concepto la importancia de evaluar y controlar el desarrollo microbiano para asegurar la calidad seminal y para minimizar los riesgos sanitarios de las hembras inseminadas. Además, para preservar la salud pública, según el lema de la OMS “una salud” (“*one health*”), buscando reducir las resistencias a antimicrobianos. Otro punto a tener en cuenta es la necesidad de extremar medidas en torno a la higiene de los animales al momento de la recolección del semen, de igual forma la necesidad de adoptar medidas exhaustivas durante la manipulación del eyaculado, desde el momento de recolección hasta la congelación del mismo, ya que el presente estudio puso en evidencia la existencia de microorganismos contaminantes. Este trabajo ha sido el puntapié para futuros estudios, los cuales deberían evaluar el efecto de los microorganismos aislados sobre el tracto reproductivo de la hembra y la potencial capacidad fecundante del semen. Sumado a esto, la elevada resistencia bacteriana a los antibióticos, resalta la necesidad de buscar nuevas herramientas que reemplacen a los mismos y minimicen el desarrollo microbiano.

7. CONCLUSIÓN

- La incubación de las muestras de semen bovino criopreservado en caldo BHI durante 24 hs, mejoró la tasa de aislamientos microbianos.
- La prevalencia de microorganismos contaminantes en muestras de semen bovino criopreservadas fue del 28%, encontrándose 5 tipos de microorganismos diferentes, entre bacterias y hongos.
- La presencia de microorganismos no afectó los parámetros de calidad seminal analizados en los tiempos evaluados.
- Los microorganismos aislados en este estudio presentaron resistencia al menos a uno de los antibióticos ensayados y de uso frecuente en diluyentes seminales.

8. ANEXO

TINCIÓN VITAL EOSINA NIGROSINA

Citrato de sodio dihidratado	2,45 g
Nigrosina	2 g
Eosina	1 g
Agua bidestilada estéril	100 ml

SOLUCIÓN HOS

(Según Paulenz, 1992)

Citrato de Sodio	0,49 g
Sodium citrate® MALLINCKRODT 0754	
Fructosa	0,90 g
D-(+)-Fructose® SIGMA F3510	
Agua pura c.s.p	100 ml

Bamstead/Ultraline®, modelo D 11931 (USA)

Nota: Ajustar la osmolaridad a 100 mOsm/l pH a 7,5-7,8 (ajustar adicionando hidróxido de sodio (Sodium hydroxide® SIGMA S5881). Alicuotar en botellas con tapa a razón de 50 ml c/u y conservar en heladera a 5 °C hasta su uso.

SOLUCIÓN HOS FORMOL (STOP)

Solución HOS	1 ml
--------------	------

Solución formol al 38 %	3 µl
-------------------------	------

Formaldehyde solution® SIGMA F8775

Nota: Conservar a 5 °C hasta su uso.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aguayo Cerna, M. A. (2017). Identificación de las bacterias aisladas de muestras seminales en pacientes con problemas de fertilidad utilizando el sistema automatizado VITEK® 2 muestras seminales durante el 2016. Universidad Ricardo Palma.
- Akhter, S., Ansari, M. S., Andrabi, S. M. H., Ullah, N., & Qayyum, M. (2008). Effect of antibiotics in extender on bacterial and spermatozoal quality of cooled buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(3), 272–278.
- Althouse, G. C; Kuster, C. E; Clark, S. G; Weisiger, R. M. (2000). Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. Elsevier Science Inc, (00), 1–29.
- Althouse, G. C., & Lu, K. G. (2005). Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*, 63(2 SPEC. ISS.), 573–584.
- Althouse, G. C., Pierdon, M. S., & Lu, K. G. (2008). Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen. *Theriogenology*, 70(8), 1317–1323.
- Amann, R. P; Schanbacher, B. D. (1983). Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science*, 57 Suppl 2, 380–403.
- Amann, R. P. (1981). A Critical Review of Methods for Evaluation of Spermatogenesis from Seminal Characteristics. *American Society of Andrology*, pp. 1–22.
- Araujo Moron, D. A; Moron, Moron, L. M. (2015). Evaluación de la calidad seminal en toros reproductores en invierno y verano en el Departamento del Cesar. Universidad Nacional de Córdoba.
- Arieta Román, R. J., & Fernández Figueroa, J. A; Menchaca Peña, J. (2014). Métodos de extracción de semen bovino. *Revista Electronica de Veterinaria*, 15(5), 30–37.
- Arthur, G. H; Noakes, D. E; Pearson, H. (1991). Reproducción y obstetricia en veterinaria: teriogenología (6ta ed.). New York, Estados Unidos: McGraw-Hill., Interamericana.

- Aurich, C; Spargser, J. (2007). Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 67(5), 912–918.
- Auroux, M. R; Jacques, L; Mathieu, D; Auer, J. (1991). Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: an in vitro study in man with *Escherichia coli*. *International Journal of Andrology*, 14(4), 264–270.
- Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., ... Gómez, C. (2006). Fundamentos de criopreservación TT - Basic points in cryopreservation. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291–300.
- Aviles, K. (2011). Estudio de la funcionalidad espermática, interacción de gametos y análisis proteico en espermatozoides Epididimarios y Eyaculados en la especie porcina. Universidad de Murcia.
- Banks, S., King, S. A., Irvine, D. S., & Saunders, P. T. K. (2005). Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction (Cambridge, England)*, 129(4), 505–514.
- Barbas, J. P; Mascarenhas, R. D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking*, 10(1), 49–62.
- Barrios, D. R. (2012). Fisiología y reproducción. *Revista Científica*, 22(0), 1–14.
- Barros, C; Berrios, M. (1977). Is the activated spermatozoon really capacitated? *Journal of Experimental Zoology*, 201(1), 65–71.
- Barth, A. (2007). Evaluation of Potential Breeding Soundness of the Bull. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, 228–240.
- Baud, D; Pattaroni, C; Vulliemoz, N; Castella, V; Marsland, B., & Stojanov, M. (2019). Sperm microbiota and its impact on semen parameters. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–9.
- Bedford, J. M. (1975). Maturation, transport, and fate of spermatozoa in the epididymis. *Handbook of Physiology*, 303–317.
- Bello, V. J; Barragán, G. J. P; Ramos, D. R; Méndez, M. M. (2013). Evaluación bacteriológica y micológica del semen de verracos en una posta de alta salud (Vol.

63). Tehuacán, México.

Bonilla Salinas, M; Pajares Moreno, S; Viguera Ramírez, J. G; Sigala Alanís, J. C; Le Borgne, S. (2016). Manual De Practicas De Microbiología Básica (Universidad Autónoma Metropolitana, Ed.). Cuajimalpa, México: Casa abierta al tiempo.

Bou, G; Fernández Olmos, A; García, C; Sáez Nieto, J. A; Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In R. Cercenado, E; Cantón (Ed.), Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Vol. 29). Madrid, España: Seimc.

Bredderman, P. J; Foote, R. H. (1969). Volume of stressed bull spermatozoa and protoplasmic droplets, and the relationship of cell size to motility and fertility. Ithaca, New York.

Bustos, E; Torres, L. (2012). Reproducción estacional en el macho. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1266–1279.

Cano-Cháves, A; Galarzo Pardo, S; Puerta-Suárez, J; Giraldo, M; Cadavid, P; Cardona-Maya, W. D. (2017). Efecto de las bacterias uropatógenas y de los factores solubles de su metabolismo sobre la calidad espermática: *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*. *Clinica e Investigación En Ginecología y Obstetricia*, 44(3), 106–112.

Carballo, D. M; Canseco, R; García, R; Montiel, F. (2009). Comparación de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo. In *Avances en la Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal y Acuícola en el Trópico Mexicano 2009*. Mexico, D.F., México.

Castellón, E; Cesari, A; Fornés, M. (2018). *Biología de la Gameta Masculina* (1ra ed). Mar del Plata: Eudem.

Catena, M; Cabodevila, J; Cagnoli, C; Echeverría, H. M; Chiapparrone, M. L; Cacciato, C; Cantón, J; Soto, P. (2014). Resultados del control microbiológico de semen bovino congelado. Congreso; XX Reunión Científico Técnica de La AAVLD, 1–1. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

Catena, M; Cabodevila, J. (1999). Evaluación de semen bovino congelado. In UNCPBA (Ed.), *Simposio Internacional de Reproducción Bovina* (Vol. 1, pp. 1–9). Tandil,

Buenos Aires: Sitio Argentino de Producción Animal.

- Cavestany, D., & Méndez, J. (1993). *Manual de Inseminación Artificial en bovinos* (Montevideo; INIA, Ed.). Montevideo. Uruguay: Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur.
- CLSI. (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology Newsletter*, 23(6), 49.
- Coehlo, N. M. (1976). *Flora bacteriana do prepúcio e sêmen de reprodutores Bos taurus*. Dissertação (Mestrado Em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Consejo de las Comunidades Europeas. (1988). *Diario Oficial de las Comunidades Europeas: directiva del consejo*.
- Cooper, T. G. (1998). Interactions Between Epididymal Secretions and Spermatozoa. In *Journal of Reproduction and Fertility* (Vol. 53). Münster, Germany.
- Córdova Izquierdo, A; Pérez Gutiérrez, J. F; Méndez Hernández, W; Villa Mancera, A. E; Huerta Crispín, R. (2015). Obtención , evaluación y manipulación del semen de verraco en una unidad de producción mexicana. 26(1), 69–74.
- Corona, A; Cherchi, R. (2009). Microbial quality of equine frozen semen. *Animal Reproduction Science*, 115(1–4), 103–109.
- Cremades, T; Roca, J; Rodriguez Martinez, H; Abaigar, T; Vazquez, J. M; Martinez, E. A. (2005). Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. *Journal of Andrology*, 26(5), 610–618.
- Critser, J. K., Arneson, B. W., Aaker, D. V, Huse-Benda, A. R., & Ball, G. D. (1987). Cryopreservation of human spermatozoa. II. Postthaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertility and Sterility*, 47(6), 980–984.
- Cunningham, J., & Klein, B. (2009). *Fisiología Veterinaria*. In Elsevier Saunders.
- Curbelo, M; Rodríguez, Z. (2013). Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay (Vol. 1). Universidad de la República.

- De vos, A; Van De Velde, H; Juris, H; Verheyen, G; Drevroey, P; Van Steirteghem, A. (2003). Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 79(1), 1–7.
- Derivaux, J. (1982). *Reproducción de los animales domésticos* (2da ed; Derouaux, Ed.). Zaragoza, España: Acribia, Editorial.
- Diemer, T; Weidner, W; Michelmann, H. W; Schiefer, H. G; Rován, E; Mayer, F. (1996). Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa in vitro. *International Journal of Andrology*, 19(5), 271–277.
- Dostál, J; Veselský, L; Marounek, M; Železná, B; Jonáková, V. (1997). Inhibition of bacterial and boar epididymal sperm immunogenicity by boar seminal immunosuppressive component in mice. *Journal of Reproduction and Fertility*, 111(1), 135–141.
- Durán Cash, M. A; Castagna Du Pré, S; Texeira Silva, D. A. (2015). Evaluación de diferentes diluyentes para semen ovino, fresco y refrigerado. Universidad de la República (Uruguay).
- Eaglesome, M. D; Garcia, M. M. (1997). Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. *Revue Scientifique et Technique*, pp. 215–225.
- Ekstedt, E; Söderquist, L; Plöen, L. (1986). Fine structure of spermatogenesis and Sertoli cells (*Epitheliocytus sustentans*) in the bull. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 15(1), 23–48.
- El-mulla, K. F; Kohn, F. M; Dandal, M; El Beheiry, A. H; Schiefer, H. G; Weidner, W; Schill, W. B. (1996). In vitro effect of *Escherichia coli* on human sperm acrosome reaction. *Archives of Andrology*, 15(6), 448.
- Esaú López-Jácome, L; Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. 3(1), 1–9.
- Fernandez, A; Gonzalvo, M. C; Clavero, A; Ruiz de Assín, R; Zamora, S; Roldan, M; Rabelo, B; Ramirez, J. P., & Yoldi, A; Castilla, J. A. (2009). *Fundamentos de*

- criobiología espermática para bancos de semen. *Asebir*, 14, 19–27.
- Flatscher, J; Holzmann, A. (1984). Genital diseases in bulls: Importance for artificial insemination control measures. In 11. Conference de La Commission Regionale de l'OIE Pour l'Europe. *Maladie d'Aujeszky, Maladies Genitales Des Bovins*. Vienne (Austria).
- Flores Olivares, C. A. F. (2014). “ Efectos de *Escherichia coli* aislada de casos de vaginitis sobre calidad espermática en ovinos ” Carlos Andrés Felipe Flores Olivares “ Efectos de *Escherichia coli* aislada de casos de vaginitis sobre calidad espermática en ovinos ” NO. Universidad Mayor.
- Frandsen, R; Spurgeon, T. L. (1992). *Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos*. In Nueva Editorial Interamericana, S.a. De C.C. (5ta ed).
- Galarzo Pardo, S; Cano Cháves, M. A; Puerta Suarez, J; Giraldo, M; Mayorga, J. M; Cadavid, A. P; Cardona Maya, W. (2015). Efecto de los factores solubles de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus capitis* y *Staphylococcus epidermidis* sobre la funcionalidad espermática. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 80(4), 316–323.
- Galdiero, F., Sommesse, L., Gorga, F., Galdiero, E., Rizzo, A., & Ajello, M. (1994). Toxic effect on human spermatozoa by *Chlamydia trachomatis* purified lipopolysaccharide. *FEMS Microbiology Letters*, 115(2–3), 197–200. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06637.x>
- Galina, C; Valencia, J. (2009). *Reproducción de los Animales Domésticos* (3ra ed; Grupo Noriega, Ed.). Mexico, D.F., México: Limusa.
- Gao, D. Y; Ashworth, E; Watson, P. F; Kleinhans, F. W; Mazur, P., & Critser, J. K. (1993). Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biology of Reproduction*, 49(1), 112–123.
- Gardner, D; Weissman, A; Howles, C; Shoham, Z. (2017). *Textbook of Assisted Reproductive Techniques* (5ta ed.). Boca Ratón, Florida. Estados Unidos: Taylor & Francis Group, LLC.

- Genovez, M. E; Scarcelli, E., & Carvalho, A. F. (1999). Avaliação bacteriológica de sêmen in natura industrializado de touros. San Pablo.
- Gilbert, S. F. (2005). *Biología del Desarrollo* (7ma ed). Sunderlands Massachusetts: Panamericana, Editorial Médica.
- Gillan, L., Kroetsch, T., Chis Maxwell, W. M., & Evans, G. (2008). Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science*, 103(3–4), 201–214.
- Gómez Coronado, C. A. (2013). Evaluación de la efectividad de un electroeyaculador experimental comparado a uno de marca comercial en ovinos (Vol. 66). Universidad Central de Ecuador.
- Gómez, V., & Migliorisi, L. (2015). Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. *Unlp*, Vol. 1, pp. 4–9. Retrieved from http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_toros/49-ProtocoloEvalSemen.pdf
- Gómez Velásquez, C. A. (2019). Características que debe tener un diluyente de semen bovino.
- Hafez, E. S. E; Hafez, B. (2002). Reproducción e inseminación artificial en animales. In *Reproducción e inseminación artificial* (7ma ed). Kiawah Island, South Carolina, USA: McGraw-Hill, Interamericana.
- Hammerstedt, Roy H; Graham, James K; Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *Journal of Andrology*, 11(1), 73–88.
- Hernández Cerón, J; Ortega León, A. (2009). *Manual de Inseminación Artificial en bovinos*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hernandez, R. I. (2014). Anatomía del aparato reproductor masculino bovino. *Revista Veterinaria Argentina*, 1–7.
- Hidalgo, O. C; Tamargo, C; Diez, C. (2009). Análisis del semen bovino. *Boletín Informativo Del Sérída*, 2, 39–43.
- Hinton, B. T; Dott, H. M; Setchell, B. P. (1979). Measurement of the motility of rat

- spermatozoa collected by micropuncture from the testis and from different regions along the epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 55(1), 167–172.
- Holt, J. (1994). *Manual of Determinative Bacteriology* (9na ed; W. R. Hensyl, Ed.). Baltimore, Estados Unidos: Williams & Wilkins.
- Ibañez, F; Lisarrague, C., & Callejas, S; Cabodevilla, J. (2016). Facultad de Ciencias Veterinarias Inseminación Artificial a Tiempo Fijo : ¿Conviene utilizar semen fresco en lugar de congelado? 1–30.
- Jeyendran, R.S; Van der Ven, H. H; Perez-Pelaez, M; Crabo, B. G; Zaneveld, L. J. D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70(1), 219–228.
- JIACRA. (2020). Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Labtestonline*.
- Johnson, L A, Weitze, K. F., Fiser, P., & Maxwell, W. M. (2000). Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 143–172.
- Johnson, Lawrence A. (1995). Sex preselection by flow cytometric separation of x and y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: A review. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 893–903.
- Keating, J; Grundy, P. S; Fivey, P. S; Elliott, M; Robinson, J. (1997). Investigation of the association between the presence of cytoplasmic. *Journal of Reproduction and Fertility*, 110, 71–77.
- Ledesma, A. . (2012). Efecto del método de colecta de semen y de plasma seminal sobre la supervivencianposdescongelación de espermatozoides ovinos. Universidad Nacional de Mar del Plata.
- López de Armentia, F. (2017). Hallazgo de *Campylobacter fetus* en semen ovino congelado. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.
- Lue, Y. H; Hikim, A. P; Swerdloff, R. S; Im, P; Taing, K. S; Bui, T., & Leung, A; Wang, C. (1999). Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology*, 140(4), 1709–

1717.

- Mann, T., Lutwak-Mann, C., Mann, T., & Lutwak-Mann, C. (1981). Male Reproductive Function and the Composition of Semen: General Considerations. In *Male Reproductive Function and Semen*. Berlin.
- Manoj, Monga; James A., R. (1994). Spermagglutination by Bacteria: Receptor-Specific Interactions. *Journal of Andrology*, 15(2), 41–62.
- Martínez, E; Peraza, N; García, P. (1987). Análisis bacteriológico del semen y fomites. *Revista Cubana de Reproducción Animal*, Vol. 13(No. 1), 81–102.
- Morado, S., Pereyra, V., Breininger, E., Sara, R., & Cetica, P. (2015). Study of Sperm Evaluation Parameters to Estimate Cryopreserved Bovine Semen Fertility. *Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*, 2(2), 1–10.
- Morales Berrocal, M. M; Echavarría-Sánchez, M. G., & Villeda Gabriel, G. (2017). Microorganismos patógenos productores de alteraciones seminales relacionadas con infertilidad. *Perinatología y Reproducción Humana*, 31(3), 131–143.
- Morillo, M; Salazar, S; Castillo, E. (2012). Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino (E. A. P. S., Ed.). Maracay, Venezuela.
- 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*, 123(1–2), 64–69.
- Morrell, J. (2006). Update on Semen Technologies for Animal Breeding. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(s2), 63–71.
- Mortimer, D. (1994). *Practical Laboratory Andrology* (O. U. P. (1836), Ed.). Nueva York, Estados Unidos.
- Muñoz, R; Fernández, M; Arean, H; Viana, J.L; López, M; Fernández, A; Peña, A. I. (2005). Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de IA. *Asociación Internacional Para El Desarrollo Agrario*, 101(3), 175–191.
- Muñoz Ibarra, E. (2017). Análisis del comportamiento de los principales géneros bacterianos frente a los antimicrobianos obtenidos a partir de muestras clínicas de

- origen animal remitidas a un laboratorio veterinario de la ciudad de Cali, Colombia durante los años 2013-2014. Universidad Nacional de La Plata, 01, 1–7.
- Neri-vidaurri, P; Fragoso-cuiruz, F; Rojas-hernández, E. M; Vielma-valdez, A. (2018). Efecto del espermocultivo positivo en los parámetros seminales en los varones de un programa de reproducción asistida. *Asociación Mexicana de Medicina de La Reproducción*, 9(4), 129–137.
- Organización Mundial de la Sanidad Animal. (1996). *Manual of Standards for Diagnostic Testes and Vaccines* (3ra ed).
- Organización Mundial de la Sanidad Animal. (2001). *Código Zoosanitario Internacional: guía para la utilización del código* (10ma ed). París, Francia.
- Ortuño, A. D. (2019). *Manual De Inseminación Artificial De Ganado*. Sitio Argentino de Producción Animal, pp. 1–53. Ciudad Victoria, México.
- Palit, A; Haylock, L. M; Cox, J. C. (1986). Storage of pathogenic leptospire in liquid nitrogen. *Journal of Applied Bacteriology*, 61(5), 407–411.
- Palma, G.A; Gottfried, B. (1997). Biotecnología de la reproducción: ciencia, tecnología y sociedad. In *Biotecnología de la Reproducción* (pp. 1–19).
- Pantozzi, F. L; Moredo, F. A; Vigo, G. B; Giacoboni, G. I. (2010). Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(1), 49–52.
- Pendás Rodríguez, B. V; Toledo Sanchez, C. A; Gómez Alzugaray, M; Santana Pérez, F; Dominguez Alonso, E. (2013). Alteraciones morfológicas de espermatozoides humanos por microscopía electrónica de barrido Morphological alterations of human spermatozoa detected by scanning electron microscopy. *Revista Cubana de Endocrinología*, 24(2), 153–160.
- Quintero Moreno, A; Mayorga-Torres, J. M; Cardona Maya, W. (2017). Semen Analysis As a Tool To Predict the Reproductive Potential in Bulls. *Journal of Veterinary Andrology*, 2(1), 30–37.
- Revista Veterinaria Argentina*. (2015, April). Inseminación artificial a tiempo fijo en

bovinos. 6, 1–11.

- Ribeiro-Peres, A; Munita-Barbosa, L; Yumi-Kanazawa, M; Mello-Martins, M. I; Ferreira de Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(1), 31–38.
- Rivera Gaona, M. G. (2018, January 19). *Revista de genética bovina colombiana. Congelación de Semen Bovino*, pp. 1–1.
- Rockett, J. C; Mapp, F. L; Garges, J. B; Luft, J. C; Mori, C., & Dix, D. J. (2001). Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biology of Reproduction*, 65(1), 229–239.
- Rodríguez, P; Franco, E; Jiménez, C. (2008). Estandarización de la prueba para en la medición de concentración de semen bovino, equino, porcino, ovino y canino. *Rev. Med. Vet. Zoot.*, 55, 22–28.
- Rodríguez, A. (2017). Evaluación de la calidad espermática de sementales porcinos utilizados en la monta natural. *Revista Electronica de Veterinaria*, 18(10).
- Rodríguez Ávalos, A; González Santos, J. A; Vargas Ibarra, A. K; Herrera Barragán, J. A. (2018). Recolección y manipulación seminal in vitro. In *Universidad Autónoma Metropolitana (Ed.), Journal of Chemical Information and Modeling (1ra ed, Vol. 53)*. Ciudad de México, México: Casa abierta al tiempo.
- Rojas, A. (2014). Optimización del protocolo de crioconservación de semen caprino de la raza autóctona en peligro de extinción blanca de rasquera. *Universidad Autónoma de Barcelona*.
- Roldan, E. R. S; Yanagimachi, R. (1989). Cross fertilization between Syrian and Chinese hamsters. *Journal of Experimental Zoology*, 250(3), 321–328.
- Ronald, B. S. M; Prabhakar, T. G. (2001). Bacterial analysis of semen and their antibiogram. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 71(9), 829–831.
- Salamon, S; Maxwell, W. M. C. (1995). Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal*

- Reproduction Science, 38(1–2), 1–36.
- Sanchez, A; Rubilar, J; Gatica, R. (2002). Evaluation of fresh and frozen canine semen by the hypoosmotic swelling test. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 34(1), 123–130.
- Sánchez Leal, L C; Corrales Ramírez, L. C. (2005). Congelación Bacteriana: Factores Que Intervienen en el Proceso. *Nova*, 3(3), 109.
- Sanocka, D., Frączek, M., Jędrzejczak, P., Szumala-Kąkol, A., & Kurpisz, M. (2004). Male genital tract infection: An influence of leukocytes and bacteria on semen. *Journal of Reproductive Immunology*, 62(1–2), 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2003.10.005>
- Shin, S. J; Lein, D. H; Patten, V H; Ruhnke, H. L. (1988). A new antibiotic combination for frozen bovine semen. 1. Control of mycoplasmas, ureaplasmas, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and *Haemophilus somnus*. *Theriogenology*, 29(3), 577–591.
- Silveira Prado, E. A; Machado Pérez, R. (2005). Flora bacteriana del semen de toro antes y después de la congelación. *Redvet*, 6(7), 1–9.
- Sone, M; Kawarasaki, T; Ogasa, A; Nakahara, T. (1989). Effects of bacteria-contaminated boar semen on the reproductive performance. *The Japanese Journal of Animal Reproduction*, 35(3), 159–164.
- Stornelli, A; Luzbel, R. (2016). *Manual de reproducción de animales de producción y compañía* (Editorial de la Universidad de La Plata, Ed.). La Plata, Buenos Aires: Universidad Nacional de La Plata.
- Stornelli, M. C; Tittarelli, C. M; Savignone, C. A; Stornelli, M. A. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria*, 25(2), 28–35.
- Strzezek, J. (2002). Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Reproductive Biology*, Vol. 2. N°(May).
- Sumba L, J. P. (2012). Inseminación artificial con celo natural en vacas productoras de leche con semen sin el proceso de descongelado en el cantón Paute. Universidad Politécnica Salesiana.

- Tamara Viscarra, A., Priscilla Brebi, M., Alejandra Andana, V., & Raúl Sánchez, G. (2013). Infecciones de transmisión sexual en semen. El hombre como vector de transmisión. *International Journal of Morphology*, 31(1), 254–263. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022013000100041>
- Tamuli, M. K; Sharma, D. K; Rajkonwar, C. K. (1984). Studies on microbial flora or boar semen. *Indian Veterinary Journal*, 61.
- Tamuli, M. K; Watson, P. F. (1992). Effect of temperature of incubation on the development of resistance to cold stress and hypoosmotic stress in boar spermatozoa incubated for up to 24 hours. *12th. Int. Cong. Anim. Reprod.*, 1484–1486.
- Terzolo, H. L; Paolicchi, F. A; Moreira, A. R; Homse, A. (1991). Skirrow agar for simultaneous isolation of *Brucella* and *Campylobacter* species. *The Veterinary Records*, 129, 531–533.
- Tovío Luna, N.I; Bernal Quintero, L. . (2020). Proteínas del plasma seminal y su relación con la fertilidad espermática. *Revista Genética Bovina Colombiana*.
- Trujillo, L. E; Rivera, M. (2002). Estudio Comparativo De Dos Tratamientos Bacteriológica Y Espermática Del Semen Bovino. *Revista Nacional Facultad de Agronomía Medellín*, 55(1), 1457–1472.
- Vaid, R. K; Arangasamy, A; Talluri, T; Ravi, S; Bera, B. C; Anand, T; Riyesh, T; Virmani, N; Malik, P; Singh, R. K. (2012). Microbial quality of fresh and frozen equine semen of indian horses. *Veterinary Practitioner*, 13(2), 336–339.
- Vallecillo Hernández, A. F. (2011). Caracterización reproductiva de toros de la raza marismeña como base a su conservación. Córdoba, España.
- Vasconcelos-Filho, W. (2010). Eficiência da congelação automatizada na viabilidade de sêmen bovino. *Universidad Federal Rural de Río de Janeiro*.
- Villamizar Guerrero, G. D. (2014). Manual de procedimientos para la colecta y criopreservación de semen bovino para la empresa Santa Clara Genética. *Universidad Cooperativa de Colombia, Bucaramanga, Colombia*.
- Villarreal, J; Cabrera, H; Andara, Y; Vielma, J. (2020). La inseminación artificial en

- bovinos como estrategia de enseñanza de la Etern Mesa Cerrada, Timotes, Estado Mérida. Etern Mesa Cerrada, 1–3.
- Visser, L. R; ter Laak, E. A; Jansen, H. B. (1999). Failure of antibiotics Gentamycin, Tylosin, Lincomycin and Spectinomycin to eliminate *Mycoplasma bovis* in artificially infected frozen bovine semen. *Theriogenology*, 51(4), 689–697.
- Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility, and Development*, 7(4), 871–891.
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 481–492.
- Wolff, H; Panhans, A; Stolz, W; Meurer, M. (1993). Adherence of *Escherichia coli* to sperm: A mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and *E. coli*. *Fertility and Sterility*, 60(1), 154–158.
- Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: Its development and relativity. *Zygote*, 2(4), 371–372.
- Yániz, J. L; Marco-Aguado, M. A., & Mateos, J. A; Santolaria, P. (2010). Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. *Animal Reproduction Science*, 122(1–2), 142–149.
- Zini, A; Lamirande, E; Gagnon, C. (1993). Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase like activities in seminal plasma and spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 16(3), 183–188.