

**CALIDAD SEMINAL EN TOROS: EFECTO DE LA INFECCIÓN *IN VITRO* CON
MICROORGANISMOS SAPRÓFITOS**

Trabajo Final de Grado
de la alumna



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

Pergamino, 26 de Marzo de 2024

**CALIDAD SEMINAL EN TOROS: EFECTO DE LA INFECCIÓN *IN VITRO* CON
MICROORGANISMOS SAPRÓFITOS**

Trabajo Final de Grado

de la alumna

MAIRA DAIANA FORCADELL

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador/a

(Nombre y Apellido)
Evaluador/a

(Nombre y Apellido)
Evaluador/a

Dra. Med. Vet. Jorgelina Manes
Directora

Dr. Mic. Fabrisio E. Alustiza
Co-Director

Dra. Diana B. Acosta
Tutora

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

Pergamino, 26 de Marzo de 2024

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. PRODUCCIÓN BOVINA.....	8
1.2. USO DE TECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS EN LA PRODUCCIÓN BOVINA...	9
1.3. EL ROL DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.....	9
1.4. SEMEN BOVINO.....	10
1.4.1. Morfología y fisiología de los espermatozoides.....	11
1.4.2. Extracción de semen mediante electroeyaculador.....	14
1.5. SEMEN CRIOPRESERVADO COMO HERRAMIENTA PARA MEJORAR EL AVANCE GENÉTICO.....	16
1.5.1. Uso y composición de diluyentes utilizados en criopreservación.....	17
1.5.2. Antibióticos en diluyentes y resistencia microbiana.....	18
1.6. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL.....	19
1.6.1. Motilidad Espermática Total.....	20
1.6.2. Motilidad Rectilínea Progresiva.....	20
1.6.3. Vigor.....	21
1.6.4. Integridad de la Membrana Plasmática Celular.....	21
1.6.5. Funcionalidad de la Membrana Plasmática Celular.....	22
1.6.6. Integridad acrosomal.....	23
1.7. MICROBIOLOGÍA DEL SEMEN BOVINO.....	24
1.8. MICROORGANISMOS CULTIVABLES ENCONTRADOS EN SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO DE ORIGEN COMERCIAL.....	25
1.8.1. <i>Escherichia coli</i>	26
1.8.2. <i>Streptococcus</i> spp.....	27
1.8.3. Levaduras contaminantes del semen.....	28
1.8.4. Recomendaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal.....	29
2. HIPÓTESIS.....	31
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. Objetivo General.....	32
3.2. Objetivos específicos.....	32

4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
4.1. Obtención y procesamiento de los eyaculados.....	33
4.2. Selección y dilución de los espermatozoides.....	34
4.2.1. Motilidad Espermática Total (MET).....	34
4.2.2. Motilidad Rectilínea Progresiva (MRP).....	34
4.2.3. Concentración.....	34
4.3. Lavado espermático.....	35
4.4. Características de los inóculos.....	35
4.5. Preparación de los microorganismos para la infección del semen.....	35
4.6. Infección de las muestras de semen.....	36
4.6.1. Motilidad Espermática Total.....	37
4.6.2. Motilidad Rectilínea Progresiva.....	37
4.6.3. Vigor.....	37
4.6.4. Integridad de la Membrana Plasmática Celular (IMP).....	37
4.6.5. Funcionalidad de la Membrana Plasmática Celular (FMP).....	38
4.6.6. Integridad acrosomal.....	38
4.7. Análisis estadísticos.....	39
5. RESULTADOS.....	40
5.1. Determinación de la variación del pH, bajo distintas concentraciones crecientes de <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus</i> spp. y levadura.....	40
5.2. Efecto de la co-incubación con <i>Escherichia coli</i> sobre las variables de calidad seminal.....	41
5.2.1. Evaluación cinética y movilidad espermática comparando las distintas concentraciones a través de los tiempos evaluados.....	41
5.2.2. Evaluación de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática e integridad acrosomal.....	42
5.2.3. Análisis de la evolución del efecto de la co-incubación con <i>Escherichia coli</i> sobre variables cinéticas espermáticas.....	44
5.3. Efecto de la co-incubación con <i>Streptococcus</i> spp. sobre las variables de calidad seminal.....	47
5.3.1. Evaluación cinética y movilidad espermática comparando las distintas concentraciones a través de los tiempos evaluados.....	47

5.3.2. Evaluación de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática e integridad acrosomal.....	48
5.3.3. Análisis de la evolución del efecto de la co-incubación con <i>Streptococcus</i> spp. sobre variables cinéticas espermáticas.....	49
5.4. Efecto de la co-incubación con levadura sobre las variables de calidad seminal...	51
5.4.1. Evaluación cinética y movilidad espermática comparando las distintas concentraciones a través de los tiempos evaluados.....	51
5.4.2. Evaluación de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática e integridad acrosomal.....	52
5.4.3. Análisis de la evolución del efecto de la co-incubación con levadura sobre variables cinéticas espermáticas.....	53
6. DISCUSIÓN.....	55
7. CONCLUSIÓN.....	59
8. ANEXO.....	60
9. BIBLIOGRAFÍA.....	61

RESUMEN

La calidad microbiológica del semen bovino es un aspecto importante a considerar. Sin embargo, son escasos los estudios de la consecuencia de los microorganismos saprófitos sobre la calidad seminal. El objetivo del trabajo fue determinar el efecto de la co-incubación de espermatozoides bovinos con *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp. y una levadura aislada previamente de pajuelas de semen bovino criopreservado de origen comercial. El estudio se realizó en la EEA Marcos Juárez de INTA y para ello se utilizaron 36 eyaculados provenientes de 14 toros adultos. Los eyaculados fueron colectados mediante electroeyaculador. Las muestras fueron lavadas con buffer PBS estéril (x2) y el pellet resultante fue resuspendido en PBS estéril a una concentración final espermática de 1×10^8 /mL ajustada mediante espectrofotómetro. En 5 tubos (1000µL/cada uno) se incubaron los espermatozoides con concentraciones crecientes (250, 500, 1000 y 5000 UFC/mL) de *E. coli*, *Streptococcus* spp. y una levadura, trabajados en forma individual. En cada tubo se evaluó: pH, movilidad espermática total (MET), movilidad rectilínea progresiva (MRP), vigor, integridad de la membrana plasmática (IMP, eosina-nigrosina), funcionalidad de la membrana plasmática (FMP) del compartimiento flagelar mediante el test de endósmosis (Hos-Test) e integridad acrosomal (IA, tinción Azul de Coomassie). Las evaluaciones se realizaron a 36°C en cuatro tiempos (T0: Tiempo 0; T30: 30 minutos T60: 60 minutos y T120: 120 minutos post-incubación). El análisis se realizó mediante modelos lineales mixtos y se compararon las medias a través del Test LSD de Fisher con un nivel de significancia del 0,05. Se comprobó que el pH de cada eyaculado bovino, no presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) en ninguno de los tiempos evaluados y ni en las diferentes concentraciones crecientes de cada microorganismo estudiado. Los porcentajes de MET, MRP y el vigor registraron una reducción significativa ($p < 0,05$) en presencia de *E. coli*, en las concentraciones 1000 UFC/mL y 5000 UFC/mL, en los tiempos T60 y T120. Con *Streptococcus* spp. y levadura, en los T60 Y T120 existe una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la concentración de 5000 UFC/mL, con disminución de la motilidad general de los espermatozoides. Mientras que no se observaron diferencias significativas para las variables IMP, FMP y IA en ninguno de los organismos estudiados. En conclusión, la contaminación del semen bovino con *E. coli* redujo la calidad del semen en toros de forma dosis y tiempo dependientes, generando adherencia y aglutinación en los espermatozoides. La presencia de *Streptococcus* spp. o levaduras genera efectos

negativos en los parámetros cinéticos de motilidad y vigor espermático en 5000 UFC/mL y luego de los 60min de incubación.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PRODUCCIÓN BOVINA

La producción bovina es una práctica pecuaria fundamental en la economía y la alimentación de numerosos países (Naranjo Ramírez y Ruiz Buitrago, 2020). No es sólo el conocimiento de cómo se crían los animales, sino también, entender las razones de los procesos biológicos con el fin de estudiar y promover la mejora económica ganadera. La reproducción es esencial para la perpetuación biológica de todas las especies, por lo que una alta eficiencia reproductiva, constituye un requisito primordial para el éxito financiero de la industria cárnica y lechera (Gasque Gómez, 2008). En la economía mundial, el ganado bovino ocupa un lugar importante, especialmente en América Latina, debido a que es el tercer complejo exportador más significativo teniendo, además, un impacto relevante en la generación de valor y puestos de trabajo (Ferro Moreno *et al.* 2021). En el caso de la República Argentina, la producción de carne y leche es una de las principales acciones económicas del sector ganadero, posicionándola como la actividad pecuaria más explotada en el sistema productivo nacional (Paolilli *et al.* 2019). De acuerdo al informe publicado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (2022), el complejo bovino alcanzó un stock de 54 millones de cabezas. Demostrando que la ganadería argentina es una de las cadenas más importante del país, creciendo frente a la demanda de los mercados internos y externos, creando mano de obra directa e indirecta y generando divisas a través de las exportaciones (Paolilli *et al.* 2019).

Por otra parte, Campero (2000), señala que la rentabilidad del ganado vacuno para carne y leche depende de factores como: la producción neta de terneros por año y su peso al destete, el precio por kilogramo de ternero producido y los costos anuales del mantenimiento de la vaca. Asimismo, las bajas tasas de destete pueden resultar de mermas en diferentes momentos del ciclo reproductivo, debido a la presencia de enfermedades infecciosas (Campero, 2000). Dado que, las pérdidas productivas representan un importante impacto en el sector monetario, uno de los factores primordiales a tener en cuenta, para mejorar el retorno financiero de la explotación ganadera, es la optimización de la eficiencia reproductiva.

1.2. USO DE TECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS EN LA PRODUCCIÓN BOVINA

La reproducción de los bovinos puede presentar desafíos, como la baja tasa de concepción y la dificultad para acceder a toros de aptitud genética en los sistemas de monta natural. Es aquí, donde entran en juego las biotecnologías reproductivas, revolucionando en los últimos años la producción bovina. Estas técnicas permiten la posibilidad de acelerar el progreso genético utilizando genotipos de élite, mejorar la eficiencia reproductiva de los animales y obtener una mayor cantidad de crías de alta calidad genética (Rodríguez *et al.* 2011). En la actualidad, el uso combinado de la inseminación artificial junto con la criopreservación de semen bovino, brindan al sistema ganadero un proceso rápido y eficaz para alcanzar los niveles deseados de producción animal, aumentando las tasas de preñez vacuna (Moore y Hasler, 2017). Además estos nuevos métodos, en comparación con el servicio natural, permiten utilizar padres con un alto mérito genético en sus parámetros productivos, por lo que han sido empleadas como herramientas para mejorar el avance genético y conservar los recursos zoogenéticos, principalmente mediante la manipulación y preservación del germoplasma, lo que ha logrado la implementación de programas de mejoramiento genético en las poblaciones manejadas con estas tecnologías (Vishwanath, 2003).

1.3. EL ROL DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

La inseminación artificial (IA), es la primera herramienta usada como biotecnología reproductiva, practicada por primera vez en el siglo XVIII y extendiéndose ampliamente en la actualidad, debido a su capacidad para aumentar el número de preñeces e incrementar la mejora genética del ganado, convirtiéndose en el método más utilizado en la producción bovina de todo el mundo (Foote, 2002). Además, es una técnica simple, económica y exitosa lo que permite una rápida diseminación de la superioridad genética, en los rasgos deseados, entre las poblaciones comerciales (Vishwanath, 2003). Consiste, fundamentalmente, en la extracción de semen, evaluación, dilución, envasado, criopreservación y posterior aplicación en el útero de la hembra en el momento óptimo para lograr la concepción (Moore y Hasler, 2017). Se introduce por vía vaginal un dispositivo de inseminación con una pajuela que contiene semen, hasta llegar al cuerpo uterino (Fig. 1), donde se depositan los espermatozoides directamente en el útero

(Thibier, 1990). Esta técnica tiene como ventaja, realizar programas de cruzamiento, generar un control y prevención de ciertas enfermedades de transmisión sexual, otorgar un mejoramiento genético de las poblaciones, disponer de una mayor vigilancia reproductiva y una innecesaria importación de toros (Thibier, 2005; Moore y Hasler, 2017; Villarreal *et al.* 2021).

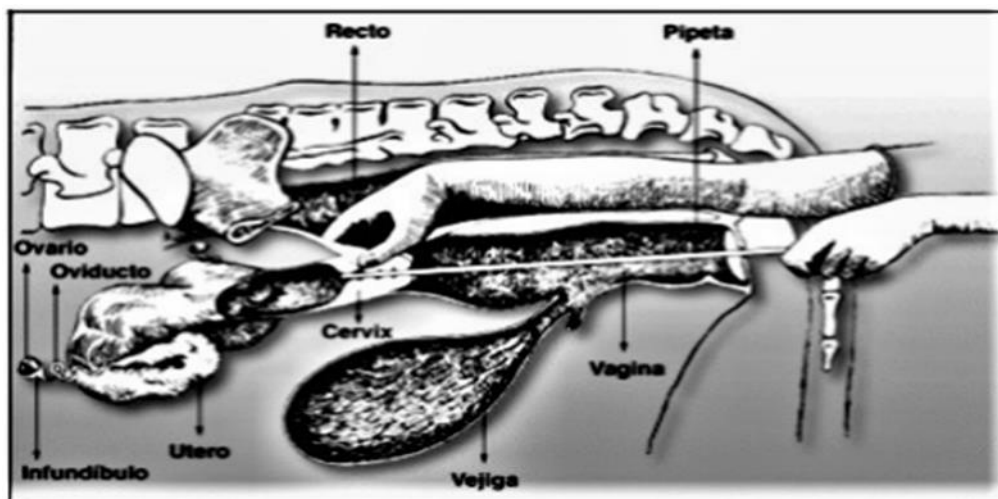


Figura 1: Esquema de inseminación artificial en bovino. Fuente: Bavera (2005).

Si bien son múltiples los beneficios de la IA, su futuro depende de la seguridad sanitaria. Por esta razón, cuando esta técnica es utilizada sin los cuidados adecuados, puede promover la propagación de ciertas enfermedades y microorganismos a través del esperma (Eaglesome y Garcia, 1997). Este problema se agravó, al introducir semen congelado, ya que facilita el intercambio del material seminal sin limitaciones geográficas y sin afectar la supervivencia de los agentes infecciosos (Siever Morales *et al.* 2013). La contaminación microbiana del semen puede tener un origen animal, procedentes de heces, fluidos prepucales, secreciones respiratorias, piel y pelo o, no animal, relacionada con la colecta y manipulación del semen durante su procesamiento como, por ejemplo, la utilización de materiales y equipos no esterilizados, malas condiciones higiénicas, y/o la contaminación humana (Thibier y Guérin, 2000).

1.4. SEMEN BOVINO

El semen bovino es una suspensión líquida celular que contiene los gametos masculinos (espermatozoides) y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino, lo que se conoce como plasma seminal, constituyendo la porción

líquida de dicha suspensión (Garner y Hafez, 2000). Este plasma actúa como vehículo para el transporte de los espermatozoides durante la eyaculación, sirve de activador a los gametos previamente inmóviles, y proporciona un medio rico en nutrientes que mantiene la supervivencia de los espermatozoides después de su depósito en el aparato genital de la hembra (Carpio Chuchuca, 2015).

1.4.1. Morfología y fisiología de los espermatozoides

Los espermatozoides son de forma alargada, cubiertas en su totalidad por la membrana plasmática (Fig. 2) (Muñoz, 2011). Estas células están compuestas por una cabeza aplanada en cuyo interior se encuentra el núcleo, y una cola o flagelo necesario para la motilidad celular. La cabeza contiene la cromatina compacta, cuyo ADN nuclear es haploide, y unido al extremo anterior del núcleo hay adherido un saco membranoso delgado de doble capa, en forma de casquete llamado acrosoma; este posee enzimas hidrolíticas incluyendo proacrosina, hialuronidasa, esterases y ácidohidrolasa, lo que le permite interactuar y penetrar el ovocito secundario en el proceso de fecundación. Finalmente, la región del flagelo está formada por el cuello y los segmentos medio, principal y caudal, los cuales mantienen un complejo sistema energético en el que se ubican las mitocondrias que producen adenosín trifosfato (ATP) para generar energía y promover ondas de movimiento a través del flagelo, generando la movilidad de la célula. Estas características morfológicas que adquieren las células durante el proceso de diferenciación responden eficientemente a las diversas funciones que deberán cumplir los espermatozoides para ser fértiles (Muñoz, 2011; Carpio Chuchuca, 2015).

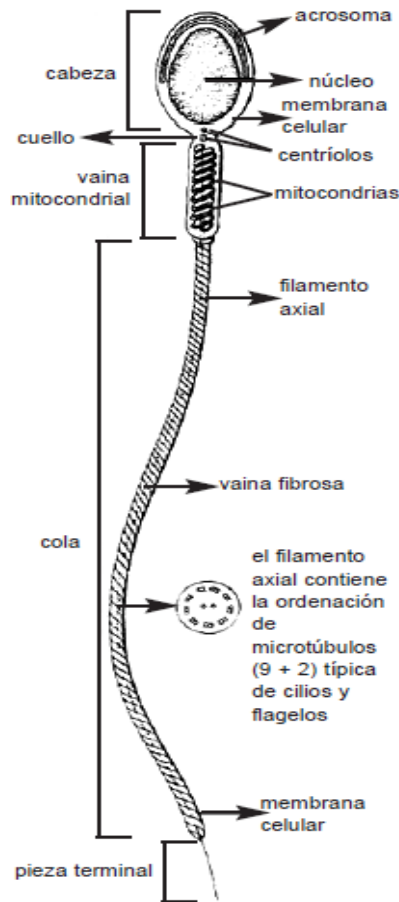


Figura 2: Morfología del espermatozoide bovino. Fuente: Muñoz (2011).

Los órganos genitales masculinos están compuestos por una serie de segmentos que generan la formación, maduración, transporte y transmisión de las células germinales masculinas (König y Liebich, 2005). Los gametos masculinos se forman dentro de los compartimentos testiculares (glándulas germinales), los cuales se caracterizan por tener dos funciones principales, llevar a cabo la formación de espermatozoides y la secreción de las hormonas sexuales, como la testosterona y pequeñas cantidades de estrógenos. Por lo tanto, es importante conocer la anatomía y función del aparato reproductor del toro (Fig. 3A) para poder manejar adecuadamente al animal y mejorar la producción ganadera (Muñoz, 2011). Los testículos son los principales órganos reproductores masculinos (Fig. 3B), tienen forma ovalada, localizados dentro de una capa fina de piel, el escroto, que cumple su función protectora. Estas bolsas escrotales se ubican en el exterior de la cavidad abdominal. Externamente, cada testículo está rodeados por una firme capa de tejido conectivo, la túnica albugínea y en su interior está formado por una red de túbulos seminíferos y células intersticiales llamadas células de Leydig, que producen testosterona,

una hormona sexual que desempeña un papel clave en el desarrollo y mantenimiento de las características sexuales del toro (Hanan, 1989).

La espermatogénesis ocurre en los túbulos seminíferos, e inicia con la pubertad del toro. Consiste en una serie de eventos que comienza con la división de las células germinales para producir espermatogonias. A nivel de la región periférica se encuentra el epitelio germinal, donde se ubican las células germinales y dos tipos diferentes de células somáticas, las peritubulares y las células de Sertoli. Estas células están localizadas en la membrana basal y se extienden hacia el lumen de los túbulos seminíferos. Las células de Sertoli sirven de sostén, y producen proteínas que dirigen la espermatogénesis, nutren las células y liberan las espermátidas maduras a la luz del túbulo. En el proceso de espermatogénesis, cada espermatogonia que se ubican en la región basal de los túbulos, se divide por mitosis y luego mediante meiosis para formar cuatro espermátidas haploides, que permanecen conectadas entre sí por puentes citoplasmáticos mientras se comunican con la célula nutricia o de Sertoli. Estas últimas, a partir de moléculas de señalización inducen el proceso denominado espermiogénesis, que transforman las espermátidas en espermatozoides maduros, mediante diferenciación y, dependiendo de la especie, adquieren características morfológicas y metabólicas particulares. En esta transformación se reconocen cuatro fases características: fase de Golgi, fase de encasquetamiento, fase acrosomal y la fase de maduración (Berndston y Desjardins, 1974; Aponte *et al.* 2005; König y Liebich, 2005; Carpio Chuchuca, 2015). Finalmente, los gametos masculinos abandonan los túbulos seminíferos y entran en el segmento inicial de la cabeza del epidídimo.

El conducto del epidídimo se divide en tres zonas: cabeza, cuerpo y cola. Los espermatozoides son transportados a través del epidídimo, donde maduran, se reabsorbe líquido testicular, se fagocitan fragmentos celulares y se secretan sustancias nutritivas para los espermatozoides, quedando almacenados en su porción terminal, la cola del epidídimo, hasta la eyaculación. Por este motivo, la maduración en el epidídimo es un proceso gradual que resulta en una serie de cambios sucesivos. Para adquirir la capacidad fecundante, los espermatozoides pasan por tres procesos fisiológicos: maduración epididimaria, capacitación y reacción acrosomal. La maduración de las células sexuales se produce a medida que transitan a través del epidídimo hacia el conducto deferente. Durante la misma, se producen modificaciones físicas y químicas de

la membrana plasmática de las células, incluyendo cambios en su composición lipídica y proteica, así como en los componentes estructurales. Los conductos deferentes son los responsables de transportar el espermatozoide desde el epidídimo hasta las vesículas seminales. Allí, los espermatozoides se mezclan con líquidos adicionales secretados por la próstata y las vesículas seminales para formar el semen. Este líquido finalmente será expulsado por el miembro masculino a través de la uretra, el conducto común urinario y seminal (König y Liebich, 2005; Muñoz, 2011; Datta *et al.* 2014).

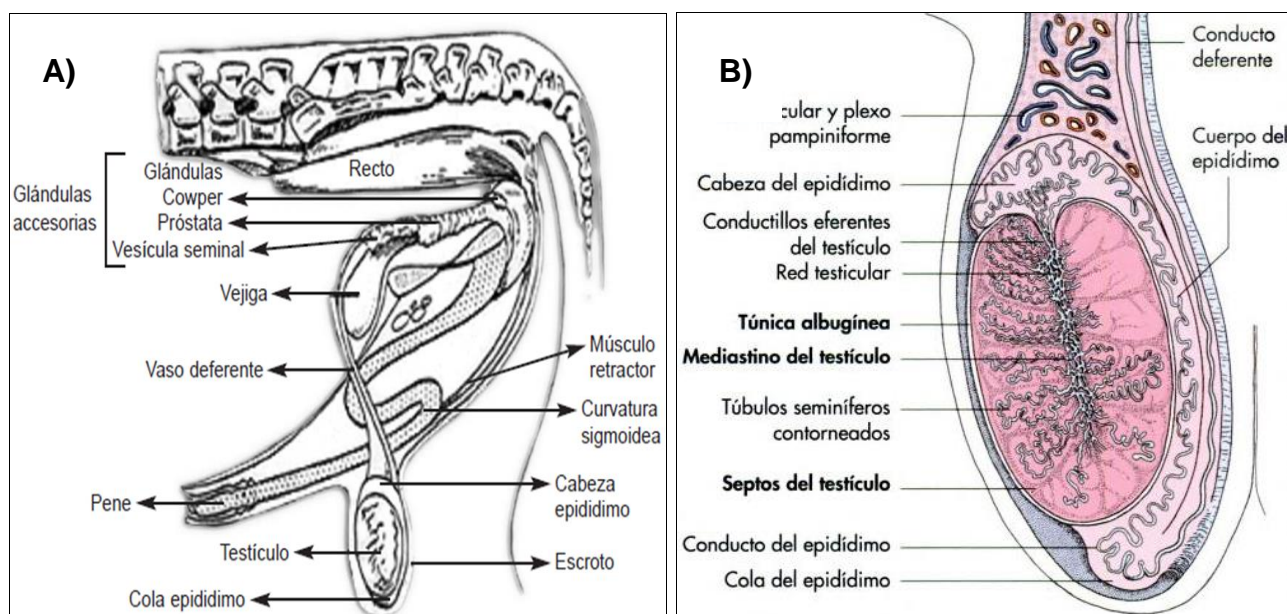


Figura 3: A. Esquema del aparato reproductor del toro. Fuente: Ordóñez *et al.* (2005).
B. Representación esquemática de testículo del toro. Fuente: König y Liebich (2005).

1.4.2. Extracción de semen mediante electroeyaculador

El electroeyaculador se inventó en la década de 1930, y su uso con toros se informó por primera vez en 1954 (Díaz Duque y López Castaño, 2018). Consiste en un equipo eléctrico que proporciona estimulación rectal, diseñado para estimular los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos con impulsos de bajo voltaje, y generar una respuesta en el toro desencadenando una erección peneana y eyaculación. Este sistema está formado por: una sonda rectal, la unidad de control, voltímetro, una batería eléctrica, transformador, el cable de energía, el cable de conexión de la sonda y una caja de transporte (Curbelo y Rodríguez, 2013; Arieta Román *et al.* 2014).

En los últimos años, ha sido un procedimiento eficaz para recolectar semen debido a

su fácil adaptación en las instalaciones de manejo de ganado, y su accesible utilización en machos que no han sido entrenados para montar animales provocadores y eyacular dentro de la vagina artificial o que poseen problemas en patas, columna, incluso falta de libido (apetito sexual), por lo que no requiere exigencia física ni animales de montaje. Este método se basa entonces, en una sonda con electrodos (Fig. 4) conectado a una batería que genera estimulaciones rítmicas y proporciona pulsos eléctricos de bajo voltaje, esta se inserta por el recto, hasta llegar a la próstata y las vesículas seminales, que intervienen en la erección del pene y una posterior respuesta eyaculatoria (Arieta Román *et al.* 2014; Díaz Duque y López Castaño, 2018). Para el empleo de esta técnica, se realiza previamente un lavado del prepucio, el veterinario procede a limpiar el recto y a estimular las glándulas accesorias por medio de masaje transrectal, destinado a excitar sexualmente al toro y causar la relajación del esfínter anal antes de la entrada de la sonda. Seguidamente, se introduce la sonda lubricada y se aplica cuidadosamente la excitación eléctrica, mientras se observa la reacción del toro que genera una ligera contracción de los músculos de las extremidades posteriores, lo que indica que el toro ha sentido el estímulo. Cada estimulación se mantiene durante 1 a 2 segundos, aumentando la intensidad del voltaje constantemente, alternando siempre con unos segundos de descanso, hasta lograr la recolección del esperma (Palmer, 2005). La utilización del electroeyaculador no siempre termina en eyaculación, depende en gran medida del nivel de estimulación que reciba el animal. Cabe resaltar que el procedimiento debe realizarse sólo por personal con entrenamiento adecuado y siempre asegurando el bienestar del animal.



Figura 4: Electroeyaculador automático equipado con una sonda con tres electrodos longitudinales (ePORVAC, modelo e325, Argentina).

1.5. SEMEN CRIOPRESERVADO COMO HERRAMIENTA PARA MEJORAR EL AVANCE GENETICO

Uno de los mayores avances que tuvo la IA, fue la consolidación con el uso de la criopreservación de semen, otorgando la capacidad de preservar la viabilidad de los espermatozoides hasta el momento de su utilización, inhibiendo la actividad metabólica del esperma enfriándolo a bajas temperaturas. La criopreservación de semen es una tecnología importante que tiene como objetivo conservar el germoplasma del macho por tiempo indeterminado (Ribeiro Peres *et al.* 2014), ya que detiene los procesos que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación manteniendo la viabilidad espermática (Stornelli *et al.* 2005). Por lo que la implementación de semen congelado ha tenido un gran impacto en los programas de mejoramiento genético, permitiendo un constante intercambio del material hereditario de animales superiores, y especialmente, la introducción y el progreso genético de las razas más apropiadas para el sistema ganadero, como así también la conservación de especies en extinción y la medicina reproductiva humana (Ávila Portillo *et al.* 2006). Según Thibier y Wagner (2002), más del 95% de las inseminaciones en bovinos, se realizan a nivel mundial, con semen congelado. En Argentina, los últimos datos publicados en 2022 por la Cámara Argentina de Biotecnología e Inseminación Artificial (CABIA), se han comercializado 8.650.613 dosis de semen, mostrando un aumento significativo en su uso y distribución, especialmente en las razas de carne (CABIA, 2022).

El éxito de esta biotecnología depende de muchos factores tales como la calidad inicial de los espermatozoides, composición del diluyente, crioprotector utilizado, protocolo de congelación, envasado, velocidad de la descongelación y la interacción entre estos componentes, así como también, características propias del macho (Layek *et al.* 2016). Así mismo, los métodos utilizados para procesar el esperma, inmediatamente después de su recolección, varían significativamente entre las organizaciones involucradas en la reproducción. Generalmente, se emulsiona con un diluyente de congelación, a una proporción 1:5 (semen – diluyente), y se procede a un enfriamiento lento hasta llegar a 5 °C. Una vez que el semen diluido alcanza la temperatura de mantenimiento, se realiza el envasado en las pajuelas de 0,25 o 0,5 ml; y finalmente se conserva y almacena a -196°C en nitrógeno líquido durante años (Vishwanath y Shannon, 2000).

1.5.1. Uso y composición de diluyentes utilizados en criopreservación

Para conservar el semen se requiere de diluyentes que permiten aumentar el volumen del eyaculado hasta alcanzar las dosis requeridas, preservando las propiedades funcionales de los espermatozoides durante el descenso térmico y congelación, y manteniendo la fertilidad suministrando los nutrientes necesarios para la viabilidad celular del esperma *in vitro*. Además, contienen sustancias con capacidad de amortiguar los cambios de pH y diferentes concentraciones de antibióticos como penicilina y estreptomina para controlar el desarrollo bacteriano (Díaz Duque y López Castaño, 2018). Por lo que, el uso y la composición del diluyente para la criopreservación del semen bovino es de suma importancia en la industria ganadera. El primer diluyente utilizado para proteger a las células espermáticas de toro del choque térmico al enfriarse, fue la yema de huevo. Luego se añadió glicerol como crioprotector intracelular, cuya función es reemplazar el líquido del interior del espermatozoide por el agente y protegerlo de la ruptura por la formación de cristales de hielo en el medio extracelular, esto dio lugar a una era exitosa de criopreservación (Vishwanath y Shannon, 2000). Actualmente, varios diluyentes utilizan diferentes tipos de extensores espermáticos de origen animal como yema de huevo y leche desnatada o de fuente vegetal como la lecitina de soja, disponibles comercialmente. Estos materiales protegen los espermatozoides, mantienen la motilidad y la fertilidad a lo largo del tiempo, previenen los efectos nocivos de los cambios de pH y la osmolaridad pero, asimismo, proporcionan diversos problemas según el tipo de extensor que se utilice (Bustani y Baiee, 2021). Por ejemplo, el uso de yema de huevo puede provocar la contaminación con *Escherichia coli*, por lo que el riesgo de contaminación microbiana puede afectar la capacidad fecundante de los espermatozoides (Bustani y Baiee, 2021). Conjuntamente, existen antecedentes de que los diluyentes de yema de huevo facilitan la transmisión de enfermedades y microorganismos como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Salmonella*, *Influenza aviar*, *Campylobacter*, *Listeria* y *Mycoplasma* (Layek et al. 2016). La lecitina de soja es una alternativa a la yema de huevo y se ha utilizado con éxito para la criopreservación de semen, ya que sus componentes evitan que el semen diluido sufra un shock por congelación (Aires et al. 2003).

1.5.2. Antibióticos en diluyentes y resistencia microbiana

Los componentes nutritivos utilizados en los diluyentes del semen favorecen el desarrollo y la supervivencia de las bacterias oportunistas, lo que conduce a la acumulación de toxinas y productos metabólicos bacterianos que provocan un efecto espermicida directo (Pineda y Santander, 2007). Por lo tanto, las mismas cualidades, que generan un ambiente favorable para la viabilidad de los espermatozoides también permiten que algunos microorganismos saprófitos puedan prosperar, principalmente cuando presentan algún grado de resistencia a los antibióticos (Layek *et al.* 2016). Los antimicrobianos son fármacos que se agregan en los diluyentes seminales y actúan controlando la contaminación microbiana que se produce principalmente durante la colecta de semen (Córdova Izquierdo *et al.* 2015). Su mecanismo de acción se basa en inhibir o detener el crecimiento de las bacterias, o bien matarlas (Calvo y Martínez, 2009). Sin embargo, no todas las bacterias son sensibles a los fármacos utilizados, pudiendo sobrevivir y en algunos casos, seguir multiplicándose, generando una población bacteriana que es resistente al antibiótico al cual se ha expuesto (Alós, 2014).

Según estudios previos, realizados en porcinos, la evaluación bacteriológica del semen fresco y diluido indicó la presencia de una amplia variedad de géneros bacterianos, en su mayoría bacterias contaminantes pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, siendo *Escherichia coli*, la bacteria más frecuentemente aislada, seguida por *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus spp.*, *β hemolítico*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Todos los microorganismos aislados fueron resistentes a los antimicrobianos utilizados en los diluyentes de semen (Thibier y Guerin, 2000; Pineda y Santander, 2007; Althouse *et al.* 2008). En muestras de semen bovino congelado/descongelado de origen comercial, existen evidencias que la prevalencia de microorganismos fue del 28%, entre los que se encontraron bacterias Gram negativas, Gram positivas, hongos filamentosos y levaduras. Además, estos aislamientos fueron resistentes al menos a uno de los antibióticos ensayados y de uso frecuente en diluyentes para criopreservación, como: gentamicina, penicilina, estreptomicina, azitromicina, tetraciclina y norfloxacin (Londra, 2021). Asimismo, en otros trabajos realizados en pajuelas de semen de toro criopreservado se pudo observar la presencia de mesófilos, coliformes y especies bacterianas, entre las que

se incluyen *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.*, levaduras y *Pasteurella sp.* Estos resultados se deben a la presencia de estas bacterias en las secreciones prepuciales que existen naturalmente en los toros (Siever Morales *et al.* 2013).

En machos sanos, los testículos y las glándulas sexuales accesorias son libres de bacterias. Sin embargo, los genitales externos transportan diferentes microorganismos, ya sea propio de la microbiota normal, como también bacterias o patógenos oportunistas que tienen el potencial de causar infecciones genitales en hembras susceptibles y disminuir la viabilidad y capacidad fecundante de las células espermáticas (Genovez *et al.* 1999; Pineda y Santander, 2007). Esto remarca la importancia de evaluar la calidad microbiológica del semen utilizado con destino comercial y el potencial de desarrollo de los microbios ante la escasa eficacia de los antibióticos empleados en los diluyentes seminales.

1.6. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL

Conocer de la fertilidad o la capacidad fecundante de cada toro es uno de los objetivos primordiales en la producción de semen bovino. Un requisito indispensable para el desarrollo de la inseminación artificial es que el espermatozoide utilizado conserve su fertilidad después de haber sido criopreservado (Ordóñez *et al.* 2005). Actualmente, el proceso de evaluación de semen es la principal herramienta en la aplicación de nuevas biotecnologías, así como en los procesos de valoración de futuros reproductores (Rodríguez *et al.* 2008).

La estimación de la calidad seminal se determina comparando los parámetros obtenidos al evaluar el semen de un toro con los valores normales relacionados con su capacidad fecundante, considerados para un animal reproductor adulto. Estos datos son esenciales en los centros de Inseminación Artificial y los laboratorios de investigación en reproducción bovina. Para garantizar el éxito y la evaluación adecuada de la calidad del semen, se requiere un personal capacitado con los conocimientos básicos de la fisiología del espermatozoide (Muñoz, 2011). La valoración potencial del poder fecundante de los espermatozoides incluye diversas pruebas. Siendo necesaria, la sumatoria de la información que cada una de ellas brinda, correctamente interpretadas, para poder efectuar una predicción y verificar todos los atributos necesarios para llevar a cabo la

fertilidad de un determinado semen (Catena y Cabodevila, 1999). Las cualidades que deben tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcionalidad de la membrana, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético (Ordóñez *et al.* 2005). Con la evaluación seminal se pueden conocer las principales características de una muestra como: el volumen, la movilidad, la concentración, la morfología y la proporción de espermatozoides vivos y muertos (Rodríguez Ávalos *et al.* 2018).

1.6.1. Motilidad Espermática Total (MET)

La motilidad de los espermatozoides es uno de los parámetros más importantes del análisis seminal, ya que proporciona una idea general de la movilidad espermática, y su importancia radica en el peso que tiene esta característica sobre la fertilidad. En general, el movimiento de la cola depende de la función mitocondrial. Cuando se activan, los espermatozoides exhiben una motilidad vigorosa y entran en un rápido consumo de energía intracelular donde el contenido de ATP es relevante para el potencial de fertilización (Bustani y Baiee, 2021). Por lo tanto, esta técnica consiste en visualizar y estimar subjetivamente el porcentaje de espermatozoides móviles en una población espermática. La exactitud y precisión están limitadas por las condiciones del sistema de medida y por la habilidad del observador. La información se presenta de forma inmediata, además de ser un método económico y fácil de implementar (Ordóñez *et al.* 2005). *In vivo*, los espermatozoides con actividad flagelar normal son capaces de cruzar la unión útero-tubárica y entrar en el oviducto, pero los espermatozoides con función flagelar anormal son incapaces de hacerlo. Por lo tanto, la motilidad es un reflejo de la actividad flagelar; sin embargo, esto no garantiza que las células sean fértiles, pues es necesario tener en cuenta otros parámetros de calidad seminal (Curbelo y Rodríguez, 2013).

1.6.2. Motilidad Rectilínea Progresiva (MRP)

Los espermatozoides deben tener una alta motilidad para garantizar el máximo potencial de fertilidad, por lo que la inmovilidad y las anomalías de la motilidad de los espermatozoides son fuertes indicadores de la infertilidad del macho. Por lo tanto, el

examen microscópico y la estimación del porcentaje de avance de los espermatozoides es la prueba estándar para determinar la fertilidad masculina (Bustani y Baiee, 2021). Para evaluarla es necesario el uso de un microscopio óptico convencional con aumentos de 100X y 400X, manteniendo el semen a evaluar y el material a utilizar a una temperatura de 36°C aproximadamente (Rodríguez Ávalos *et al.* 2018). Normalmente, los espermatozoides 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.* 2018).

1.6.3. Vigor

Los espermatozoides dependen de una motilidad vigorosa. El vigor es una variable que estima de manera subjetiva la velocidad del movimiento de los espermatozoides con la que atraviesan el campo (Curbelo y Rodríguez, 2013). Se clasifica bajo una escala, aceptando un valor mínimo de 3 y máximo de 5, tanto para semen fresco como para congelar:

- 5 = Movimiento progresivo muy rápido, células difíciles de seguir visualmente
- 4 = Movimiento progresivo rápido
- 3 = Movimiento progresivo continuo a velocidad lenta
- 2 = Lento movimiento de cola con algo de movimiento progresivo
- 1 = Leve movimiento de cola sin desplazamiento progresivo
- 0 = Sin movimiento (Curbelo y Rodríguez, 2013)

1.6.4. Integridad de la Membrana Plasmática Celular (IMP)

La falta de integridad de la membrana plasmática se asocia con la pérdida de viabilidad celular, pero una membrana plasmática intacta no siempre significa que la

célula sea viable. La criopreservación es uno de los procesos que afecta la membrana de los espermatozoides, provocando cambios en su organización, daño en la permeabilidad y composición lipídica (Ordóñez *et al.* 2005). Un requisito fundamental, es que esta membrana se encuentre intacta, ya que es esencial para la fecundación, no sólo para el metabolismo espermático sino también para una adecuada capacitación y reacción acrosómica. Por lo tanto, el análisis de la integridad de la membrana representa una información importante a la hora de evaluar la fertilidad del macho (Catena y Cabodevila, 1999). La evaluación morfológica de la integridad de la membrana plasmática se realiza mediante diferentes métodos. El procedimiento más utilizado son las técnicas de tinción vital, que permiten determinar entre espermatozoides vivos y muertos en un eyaculado. La Eosina-Nigrosina, es una práctica sencilla y económica que puede determinar la viabilidad celular mediante examen microscópico debido a la permeabilidad de la membrana plasmática a los colorantes vitales. Las células con una membrana plasmática intacta no permiten el paso del colorante y se consideran vivas, mientras que, si está alterada el tinte penetra en el interior de la célula, generando un color rosado y se considera muerta. (Gómez Coronado, 2013; Rodríguez Ávalos *et al.* 2018).

1.6.5. Funcionalidad de la Membrana Plasmática Celular (HOS-T)

El análisis de la funcionalidad de la membrana es una información importante en la evaluación de la fertilidad del macho, debido a que la membrana espermática es una estructura dinámica involucrada en el reconocimiento y transporte selectivo de moléculas. Esta función permite que los espermatozoides adapten su metabolismo al entorno, proporcionando así un sistema molecular para el reconocimiento de los ovocitos (Ordóñez *et al.* 2005). Por lo tanto, existen métodos, como los propuestos por Jeyendran y colaboradores (1984), basándose en el uso de la prueba hipoosmótica, reconocida como HOS Test (*Hypoosmotis swelling test* (HOST)) para evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática (IFMP) de los espermatozoides. Se prepara una solución acuosa con fructosa y citrato de sodio en agua destilada. Su fundamento se basa en la observación de los cambios morfológicos que sufren los flagelos de los espermatozoides cuando se exponen a un medio hipoosmótico, dando como resultado un desequilibrio osmótico entre los medios extracelular e intracelular. El agua ingresa al espermatozoide en un esfuerzo por lograr el equilibrio osmótico. Esta entrada de líquido aumenta el

volumen celular, provocando la hinchazón y enrollamiento del flagelo en diversos grados (Jeyendran *et al.* 1984; Ordóñez *et al.* 2005; Bustani y Baiee, 2021). Las lecturas se hacen en un microscopio de contraste de fases con aumentos de 400x. Se observan espermatozoides en varios campos microscópicos, donde las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentan cambios en la forma del flagelo. Se puede suponer que la capacidad de la cola del espermatozoide para hincharse en presencia de una solución hipoosmótica es una señal de que el transporte de agua a través de la membrana ocurre normalmente, es decir, es una señal de integridad de la membrana y actividad funcional normal (Jeyendran *et al.* 1984).

1.6.6. Integridad acrosomal

El acrosoma es una vesícula membranosa en forma de casquete, localizada en la región apical de la cabeza del espermatozoide. Contiene enzimas hidrolíticas y proteolíticas que son necesarias para penetrar la membrana del ovocito y llevar a cabo el proceso de fecundación (del Río *et al.* 2007). Después de la maduración en el epidídimo, los espermatozoides experimentan un proceso de exocitosis conocido como reacción acrosómica necesario para fertilizar el óvulo, por lo que se requiere un acrosoma intacto (Larson y Miller, 1999). La reacción del acrosoma se inicia cuando el espermatozoide se adhiere a la zona pelúcida del óvulo. Una vez que se produce la unión, la membrana acrosómica externa se fusiona con la membrana plasmática suprayacente del óvulo, desencadenando la liberación de enzimas acrosómicas que favorecen el paso a través de la zona pelúcida, para dar comienzo al proceso de fertilización (del Río *et al.* 2007; Bustani y Baiee, 2021). Por lo tanto, es importante realizar estudios sobre la integridad acrosómica en especies de mamíferos, ya que es una herramienta valiosa para evaluar la fertilidad del macho. Las muestras seminales con una gran proporción de acrosomas alterados o dañados suelen tener una baja fertilidad (Ordóñez *et al.* 2005; del Río *et al.* 2007; Bustani y Baiee, 2021). Con los avances en la visualización microscópica y la tecnología de tinción celular, se han desarrollado diferentes métodos para determinar la integridad acrosómica. Uno de los métodos más eficaces, sencillos, rápidos y económicos para evaluar el estado del acrosoma de los espermatozoides bovinos es el método de tinción con azul de Coomassie. Usando un microscopio óptico, se puede observar una tinción oscura cerca de la porción apical de la cabeza del espermatozoide, lo que da como

resultado un acrosoma intacto, mientras que, si no hay tinción en esta región, indica daño en el acrosoma (Larson y Miller, 1999).

1.7. MICROBIOLOGÍA DEL SEMEN BOVINO

El semen no es un fluido estéril, incluso en animales sanos, se hospeda una amplia diversidad de microorganismos que podrían desempeñar un papel fundamental en la infertilidad, como así también un factor de riesgo potencial en la transmisión y difusión de agentes con diferente grado de patogenicidad (Givens y Marley, 2008; Puerta Suárez *et al.* 2015). Numerosos estudios han demostrado el crecimiento microbiano en espermias, muchos de ellos asociados a la microbiota de la uretra, la orina, la piel, la cavidad del prepucio, las instalaciones en las que se encuentran los animales o incluso en el personal especializado en la recolección seminal. Por lo que la presencia de microorganismos en el medio ambiente puede actuar como patógenos oportunistas, aprovechando las condiciones del medio para sobrevivir y multiplicarse (Puerta Suárez *et al.* 2015; Alqawasmeh *et al.* 2022). En definitiva, la contaminación microbiana en el semen puede ocurrir en cualquier momento, inclusive durante la producción de las dosis de inseminación y su almacenamiento, sin embargo, la principal fuente de contaminación se vincula a la colecta (Thibier y Guérin, 2000).

Algunos microorganismos son fáciles de cultivar, mientras que otros son difíciles de aislar y requieren condiciones estrictas para crecer en un laboratorio. A pesar de estas limitaciones, se han encontrado varias especies bacterianas, incluidas *Escherichia* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Mycobacterium* spp. y *Ureaplasma* spp. (Alqawasmeh *et al.* 2022), detectando, aproximadamente, un 71,3% de bacterias que componen el semen (Contreras *et al.* 2023). Durante los últimos años, las nuevas tecnologías de secuenciación masiva han podido profundizar y describir especies de microorganismos cultivables y no cultivables presentes en muestras espermáticas. Análisis metagenómicos realizados en semen de mamíferos han reportado diversas comunidades microbianas, e indicaron que algunas bacterias pueden alterar la calidad espermática e influir en sus características, como el recuento de espermatozoides, la reducción de la motilidad, la morfología y la integridad del ADN, afectando así a su fisiología (Baud *et al.* 2019; Alqawasmeh *et al.* 2022; Contreras *et al.* 2023; Poole *et al.* 2023).

El fracaso reproductivo es una importante pérdida económica para la industria ganadera en todo el mundo. En consecuencia, es importante conocer que gérmenes podemos hallar en muestras de semen, para mejorar su calidad al momento de utilizarlo, evitar su empleo en situaciones riesgosas y reducir la incidencia de fallas productivas en el ganado. (Luecke *et al.* 2022). En eyaculados frescos y criopreservados del ganado bovino, los géneros bacterianos más prevalentes identificados fueron *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Campylobacter* spp., *Gemella*, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Pasteurella* spp., *Leptospira* spp., *Proteus vulgaris*, *Chlamydia* spp, *Mycoplasma*, *Mycobacterium* spp., hongos y levaduras (Catena y Cabodevila, 1999; Catena *et al.* 2014; Díaz Duque y López, Castaño, 2018; Londra, 2021; Luecke *et al.* 2022; Morales, 2022; Contreras *et al.* 2023; Poole *et al.* 2023). Curiosamente, muchas de estas bacterias pueden ser comensales o patógenas y tener el potencial de transmitir enfermedades a las hembras durante el apareamiento natural e inhibir la fecundación, reduciendo así las tasas de preñez. Sin embargo, estos agentes no son evaluados rutinariamente en los análisis convencionales que incluyen la calidad microbiológica del semen (SENASA, 2008). Esto hace que, actualmente exista poco conocimiento sobre ellos, especialmente en lo que respecta a su patogenicidad, su modo de actuar e invadir los distintos órganos de los animales, así como las posibles relaciones que podrían tener en su transmisión entre bovinos.

1.8. MICROORGANISMOS CULTIVABLES ENCONTRADOS EN SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO DE ORIGEN COMERCIAL

En muestras de semen bovino criopreservado se ha encontrado un mayor crecimiento de bacterias Gram positivas con respecto de las Gram negativas (Catena y Cabodevila, 1999; Corona y Cherchi, 2009; Londra, 2021). Asimismo, se observó que el aislamiento de hongos y levaduras es superior al de otros microorganismos encontrados (Londra, 2021). 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 provocar efectos indeseables en las dosis de semen y condicionar su fertilidad (Auroux *et al.* 1991).

1.8.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Se caracteriza por ser una bacteria entérica que no produce esporas, es anaeróbico facultativo, oxidasa negativo y móvil; presenta requerimientos nutricionales muy sencillos y es relativamente resistente a las condiciones ambientales (Alonso Espadalé y Aubert, 2001). Se encuentra en el tracto gastrointestinal de humanos y animales de sangre caliente y es responsable de un amplio espectro de enfermedades, pero además tiene la particularidad de que puede ser patógeno o no patógeno (Allocati *et al.* 2013). El desarrollo óptimo se encuentra a la temperatura corporal de los animales de sangre caliente (35-43 °C), y un pH de 7,2. También posee factores de adhesión alrededor de la bacteria, determinada por la presencia de fimbrias (pili) o filamentos de naturaleza proteica, que proporcionan a las células la capacidad de fijarse de forma específica a un receptor celular, como las glicoproteínas o los glicolípidos (Monga y Roberts, 1994; Canet, 2016). En este sentido, la unión de *E. coli* a la membrana plasmática del espermatozoide se produce a través de residuos de azúcar, especialmente manosa, receptores que también son cruciales para la unión del espermatozoide a la zona pelúcida del ovocito (Auroux *et al.* 1991; Wolff *et al.* 1993). Este resultado puede ser un factor importante en algunos casos de infertilidad masculina porque los espermatozoides aglutinados por *E. coli* son incapaces de alcanzar el óvulo (Auroux *et al.* 1991; Wolff *et al.* 1993). Estudios realizados en seres humanos, (Wolff *et al.* 1993; Monga y Roberts, 1994) reportaron que *E. coli* se adhiere a la membrana plasmática de los espermatozoides afectando la motilidad espermática tanto por adherencia como por aglutinación y estos efectos se observaron en proporciones tan bajas como 1:20, es decir una proporción de 2×10^6 *E. coli*/mL y 40×10^6 células/mL. Además, es capaz de generar alteraciones ultraestructurales, particularmente en la membrana plasmática de la pieza media y el cuello del espermatozoide, así como en la membrana del acrosoma, (Diemer *et al.* 1996, 2000) afectando su capacidad fecundante, siendo estos efectos dependientes de la concentración bacteriana y la duración de la incubación (Auroux *et al.* 1991). Asimismo, existen evidencias de que *E. coli* puede secretar toxinas y productos metabólicos nocivos para la viabilidad del semen, ya que contribuyen a la rotura de la membrana plasmática (Diemer *et al.* 2000; Bonet *et al.* 2018).

Trabajos efectuados en muestras de semen de carnero demostraron que la presencia de 10^7 UFC/mL de *E. coli* afectó negativamente los parámetros de calidad espermática como: integridad y funcionalidad de membrana e integridad acrosomal, además de aumentar el porcentaje de espermatozoides en proceso de apoptosis (Flores Olivares *et al.* 2014). Todos estos efectos son, además, dependientes del tiempo de exposición. En eyaculados de cerdos infectados con *E. coli* de 10^1 a 10^7 UFC / ml., las bacterias se adhirieron de forma inespecífica sobre la superficie del esperma; haciendo evidentes las alteraciones en la membrana plasmática a partir del día 7 de almacenamiento, afectando la región acrosómica y la pieza media. Conjuntamente, en el medio circundante se caracterizaron por la presencia de agregados moleculares, compuestos de diferentes factores solubles y toxinas liberadas por *E. coli* adheridas no específicamente a la cabeza y la cola del esperma (Bonet *et al.* 2018). Asimismo, el tamaño de la camada se reduce significativamente cuando se utiliza semen contaminado con *E. coli* espermaglutinante por encima de un valor umbral de $3,5 \times 10^3$ UFC/ml (Maroto Martin *et al.* 2010).

Por otra parte, se encontró una elevada tasa de resistencia a los agentes antimicrobianos de uso frecuente en diluyentes de semen bovino, por lo que se pudo observar que *E. coli* es resistente a diferentes clases de antibióticos recomendados por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA ex OIE), con distintos mecanismos de acción (Allocati *et al.* 2013; Londra, 2021).

1.8.2. *Streptococcus* spp.

El género *Streptococcus* es un grupo diverso de bacterias Gram positivas, pertenecientes a la familia Streptococcaceae. Todos tienen una pared celular resistente compuesta de peptidoglucanos entrecruzados. Son anaerobias facultativas, no producen esporas, algunas especies tienen cápsula, son inmóviles, poseen forma esférica o de coco, y normalmente se agrupan formando cadenas de dos (diplococos) o más bacterias. Son hospedadores de mamíferos, aves y peces, encontrándose principalmente en la boca, piel, tracto genitourinario, intestinal y respiratorio de humanos y de animales (INSST, 2018). Existen 104 especies reconocidas, ampliamente distribuidas en la naturaleza, y las interacciones con organismos huéspedes varían de comensales a patógenas. Los *Streptococcus pyogenes*, incluidos los familiares *Streptococcus* β -

hemolíticos y neumococos, causan enfermedades humanas, no forman parte de la flora normal, y pueden estar asociados con infecciones agudas o graves, en huéspedes normales, mientras que los estreptococos entéricos y orales casi siempre forman parte de la flora normal y se relacionan frecuentemente con infecciones oportunistas (Gray y Stevens, 2009). Concretamente, los *Streptococcus* son patógenos oportunistas y producen distintas toxinas que favorecen la colonización, supervivencia, multiplicación y patogénesis en el hospedador. En estudios a muestras seminales evaluadas en hombres está demostrado que existe crecimiento de *Streptococcus* del grupo *viridans* (Velásquez Rivera *et al.* 2018). Además, cultivos bacterianos de muestras de semen masculinas infértiles revelaron la presencia de *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus* α -hemolíticos. Existiendo una alta incidencia de infección por *S. faecalis* asociada con una calidad del semen comprometida en términos de concentración y morfología del esperma. Sin embargo, la presencia de estreptococos α -hemolíticos no parece tener ningún efecto perjudicial sobre la calidad del esperma (Mehta *et al.* 2002). También, se aisló de semen fresco en verracos (Maroto Martín *et al.* 2010) y en estudios realizados sobre muestras seminales provenientes de hombres sanos se demostró que existe crecimiento de *Streptococcus* del grupo *viridans*, reportando la existencia de aislados con resistencia a la penicilina (Velásquez Rivera *et al.* 2018), pero no se observó efecto sobre la calidad seminal. Cabe resaltar, que son muy escasos los reportes científicos de los efectos de *Streptococcus* spp en semen bovino.

1.8.3. Levaduras contaminantes del semen

Las levaduras son hongos unicelulares eucarióticos, pertenecientes en su gran mayoría al grupo de los Ascomicetos. Representan una diversidad conformada por 39 géneros y 350 especies reconocidas. Su forma es ovalada o esférica, son inmóviles, se reproducen por fisión binaria o gemación y en algunos casos pueden presentar pseudomicelios (Madigan *et al.* 2004). Durante la evaluación bacteriológica y micológica del esperma de verracos, se encontró que el 70 % de los eyaculados tenían contaminación por levaduras con un promedio de 4×10^6 UFC /ml; sin embargo, su presencia puede deberse a una contaminación de origen no animal (Vaid *et al.* 2012; Bello *et al.* 2013). Estudios de semen equino criopreservado han reportado el aislamiento de *Candida albicans*; pero aún no se han encontrado reportes que evalúen el efecto de estos

agentes sobre la calidad seminal. Asimismo, Morales Berrocal y colegas (2017) encontraron una asociación entre la presencia de *C. albicans* en el semen de la especie humana y una baja calidad seminal, lo que resulta en una disminución de la movilidad de los espermatozoides, relacionada con un grado significativo de aglutinaciones espermáticas inespecíficas y específicas de cabeza-cabeza con *C. albicans*. Conjuntamente, en los espermatozoides co-incubados con estas levaduras se observaron roturas de la membrana plasmática, apoptosis, vacuolización nuclear, vesículas en la membrana acrosomal externa y flagelos hinchados. Además, este hongo se describe como patógeno oportunista, que comúnmente coloniza la uretra (Morales Berrocal *et al.* 2017). Aunque hay muy poca bibliografía acerca de la contaminación por hongos y levaduras en semen criopreservado, Londra (2021) ha reportado una prevalencia del 47 % de hongos y levaduras en muestras de semen bovino criopreservado de origen comercial, lo que indica resistencia al menos a un antibiótico de los distintos grupos de antimicrobianos recomendados por la OMSA. Por lo que, los antibióticos agregados a los medios crioprotectores no son adecuados para proteger al semen congelado de la contaminación microbiana (Corona y Cherchi, 2009).

1.8.4. Recomendaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal

La OMSA trabaja para mejorar la salud y el bienestar de los animales, centrándose en difundir la información sobre las enfermedades y mejorar la sanidad animal en todo el mundo. La misma, establece un código zoonosario internacional, que proporciona directrices generales para la recolección y manipulación higiénica del semen bovino con el fin de obtener espermatozoides, prácticamente, libre de bacterias comunes potencialmente patógenas (OMSA, 2023). El objetivo principal es mantener una buena higiene en los establecimientos donde se colecta el semen y en los procedimientos de laboratorio, así como un buen control sanitario tanto de los toros como de los animales excitadores. Al mismo tiempo, implementa una serie de recomendaciones para la prevención y el control efectivo de las enfermedades animales transmisibles.

En nuestro país, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) por resolución n° 899/99 aprueba los requisitos sanitarios generales para la importación de semen bovino congelado, por lo tanto, es obligatorio que los toros donantes sean libres de enfermedades venéreas y de entidades infecciosas transmisibles

a través del semen como brucelosis, leptospirosis, campilobacteriosis, rinitis infecciosa bovina, diarrea viral bovina, tuberculosis, tricomoniasis y leucosis infecciosa bovina. Además de los agentes infecciosos transmisibles por reproducción, la OMSA destaca que hay agentes patógenos y bacterias saprofitas que pueden ser capaces de contaminar el semen de los toros, por lo que se acepta por pajuela un recuento de colonias de bacterias (UFC/ml) no mayor a 5×10^3 UFC/ml, considerando esta como apta para su aplicación en inseminación artificial (Catena y Cabodevila, 1999). Las consideraciones para determinar si una pajuela es adecuada o no, se basan en las Normas ISO 9002, que exigen que el semen esté libre de patógenos y tolere hasta 500 UFC de gérmenes oportunistas por unidad de inseminación. La OMSA clasifica al semen en calidad bacteriológica media entre 500 y 5000 UFC, y baja ≥ 5000 UFC (Catena *et al.* 2014). Sin embargo, no se han encontrado reportes que describan si la presencia de los diferentes microorganismos Gram positivos, Gram negativos, hongos y levaduras que afecten la calidad seminal en esos recuentos, en valores superiores o inferiores. Debido a esto el semen congelado bovino aumenta la necesidad de criterios estrictos para garantizar la bioseguridad.

2. HIPÓTESIS

La infección *in vitro* de muestras de semen fresco bovino con microorganismos saprófitos, aislados de semen criopreservado de origen comercial, afecta negativamente la calidad seminal, siendo este efecto dependiente de la concentración microbiana y del tiempo de incubación.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general:

Determinar el efecto de la co-incubación de espermatozoides bovinos con microorganismos saprófitos, aislados previamente de pajuelas de semen bovino criopreservado de origen comercial, sobre parámetros de la calidad seminal en muestras de semen fresco.

3.2. Objetivos específicos:

- ❖ Evaluar el efecto de la co-incubación de semen bovino fresco con 250, 500, 1000 y 5000 UFC/mL de *Escherichia coli* durante tiempos de 0, 30, 60 y 120 minutos sobre parámetros de calidad seminal.
- ❖ Evaluar el efecto de la co-incubación de semen bovino fresco con 250, 500, 1000 y 5000 UFC/mL de *Streptococcus* spp. durante tiempos de 0, 30, 60 y 120 minutos sobre parámetros de calidad seminal.
- ❖ Evaluar el efecto de la co-incubación de semen bovino fresco con 250, 500, 1000 y 5000 UFC/mL de levaduras durante tiempos de 0, 30, 60 y 120 minutos sobre parámetros de calidad seminal.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en los laboratorios del Grupo de Sanidad Animal del Área de Producción Animal, 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.

Los eyaculados fueron obtenidos de toros adultos de raza Aberdeen Angus, Charolais y Brangus, genítalmente sanos aportados por el centro de investigación EEA INTA Marcos Juárez (5 toros) y la Cabaña La Conquista de Martín Lloret de la localidad de Marcos Juárez, Córdoba (9 toros). Dichos animales fueron sometidos a un programa de extracción de semen sistemático con dos maniobras de extracción semanales durante 30 días. En todo momento, los animales fueron manejados siguiendo las reglamentaciones de la CICUAE INTA para asegurar el bienestar animal.

4.1. Obtención y procesamiento de los eyaculados

Se recolectaron un total de 36 eyaculados obtenidos a partir de 14 toros adultos sanos (de 2 a 6 años) libres de entidades infecciosas específicas transmisibles a través del semen (brucelosis, leptospirosis, campilobacteriosis, rinotraqueitis infecciosa bovina, diarrea viral bovina, tuberculosis y leucosis infecciosa bovina) siguiendo las reglamentaciones vigentes. La extracción y recolección de semen bovino fue realizada a campo mediante el uso de electroeyaculador (Eporvac, Buenos Aires, Argentina), dos veces por semana, durante cuatro meses. Se utilizó un ajuste automático, aplicando ciclos de pulsos eléctricos de 2 s con intervalos de 2 s de descanso. El voltaje fue aumentando gradualmente en 0,5 V, para preservar el bienestar del animal.

Con el fin de disminuir la contaminación bacteriana, todas las muestras de semen fresco fueron colectadas en tubos Falcon de 50 ml estériles mantenidos en baño térmico a 36°C, para conservar la temperatura de los espermatozoides. Inmediatamente después de la colecta, se llevaron al laboratorio para su evaluación y posterior procesamiento.

4.2. Selección y dilución de los espermatozoides

Una vez en el laboratorio, los eyaculados se colocaron en baño térmico a 36°C y se determinó el volumen, color, pH (utilizando tiras indicadoras de pH) y la concentración mediante un espectrofotómetro (*Accuread, IMN Technologies, L'Aigle, France*). Para determinar el pH se colocó una tira reactiva en la muestra del eyaculado, permitiendo que se impregne y vire de color, comparando la tira con el estándar incluido en el empaque de las tiras para realizar la lectura y determinar el valor del pH del eyaculado. El color y volumen de semen se registraron directamente en un tubo graduado, considerando normales entre blancos y amarillentos, mientras que los eyaculados amarillos oscuro eran descartados debido a la contaminación con orina. Posteriormente se procedió a evaluar Movilidad espermática total (MET) y Motilidad rectilínea progresiva (MRP).

4.2.1 Motilidad Espermática Total: Este método consiste en visualizar y estimar subjetivamente la proporción (%) de espermatozoides móviles mediante la observación de al menos 3 campos microscópicos, utilizando un microscopio óptico (400x). Para ello, se colocó una alícuota de 7 µL de semen sobre un portaobjetos limpio atemperado (Ledesma, 2012). Inmediatamente, se ubicó un cubreobjetos sobre la muestra y se procedió a visualizar.

4.2.2 Motilidad Rectilínea Progresiva: Esta evaluación se realizó para visualizar y estimar subjetivamente el porcentaje (%) de espermatozoides móviles con desplazamiento de avance, es decir aquellos que logren atravesar el campo de observación. Para efectuar esta determinación se descargó una alícuota de 7 µL de semen entre porta y cubreobjetos sobre una platina térmica a 36°C y se procedió a observar al menos 2 campos con microscopio óptico en aumento 400x.

Sólo los eyaculados con motilidad total >80% y motilidad progresiva >70% fueron utilizados para constituir los tratamientos.

4.2.3 Concentración: La concentración espermática fue determinada mediante espectrofotómetro (*AccuRead, Espectrofotómetro Específico de Especie, IMV Technologies*), para lo cual se realizó primeramente, un blanco con el agregado de 3.960 µL de agua destilada dentro de la cubeta para calibrar a cero el

espectrofotómetro, luego a este volumen se agregaron 40 µL de semen de la muestra para obtener la concentración de espermatozoides por mL. A esto lo multiplicamos por el volumen total del eyaculado correspondiente a la muestra y así poder obtener la concentración de espermatozoides final del eyaculado sin diluir.

4.3. Lavado espermático

Los eyaculados seleccionados fueron procesados. Se realizaron dos lavados con buffer PBS (Buffer fosfato salino) estéril, según protocolo modificado de Cabrera *et al.* (2005), para reducir al mínimo la carga bacteriana contaminante. Para ello, el semen fue diluido en una proporción de 2:10 (v:v) en la solución de PBS a 36 °C y centrifugado durante 15 min a 700 x g. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el pellet resultante se sometió nuevamente al proceso de dilución y centrifugación. Los espermatozoides obtenidos luego del segundo lavado fueron resuspendidos en PBS estéril a una concentración final de 100×10^6 /mL ajustada mediante espectrofotómetro (AccuRead) específico de especie.

4.4. Características de los inóculos

Los microorganismos seleccionados fueron cepas aisladas previamente de muestras de semen bovino criopreservado comercial (Londra, 2021). Se seleccionó una cepa Gram positiva de *Streptococcus* spp, una Gram negativa de *Escherichia coli*, y levaduras. Las cepas fueron mantenidas a -80°C (en ultrafreezer) en caldo infusión cerebro corazón (BHI) con glicerol al 30% como criopreservante hasta el momento de realizar este trabajo.

4.5. Preparación de los microorganismos para la infección del semen

Previo a la infección, las cepas fueron descongeladas y cultivadas en caldo Cerebro Corazón (BHI) estéril, a 37 °C en aerobiosis durante 24 h en estufa. Posteriormente, bajo mechero, se las introdujo en un tubo Falcon de 15 mL estéril y se las sometió al proceso de centrifugado durante 5 minutos a una velocidad de 5000 rpm. Luego se descartó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en PBS estéril (Buffer fosfato salino) para obtener las concentraciones utilizadas en los tratamientos mediante la densidad óptica (D.O.), midiendo la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro (*Perkin Elmer*®). Por

medio de este procedimiento se ajustó la concentración microbiana para constituir los diferentes tratamientos, de acuerdo a valores ajustados a las curvas de crecimiento propias de cada microorganismo, obtenidas en trabajos previos del grupo.

4.6. Infección de las muestras de semen

En tubos Falcon estériles los tratamientos, para cada microorganismo, fueron conformados de la siguiente forma:

- Tubo A: 100×10^6 mL de espermatozoides en 1000 μ L + 500 μ L de PBS estéril sin microorganismo (control negativo).
- Tubo B: 100×10^6 mL de espermatozoides en 1000 μ L + 500 μ L de PBS estéril con **250 UFC/mL** del microorganismo.
- Tubo C: 100×10^6 mL de espermatozoides en 1000 μ L + 500 μ L de PBS estéril con **500 UFC/mL** del microorganismo.
- Tubo D: 100×10^6 mL de espermatozoides en 1000 μ L + 500 μ L de PBS estéril con **1000 UFC/mL** del microorganismo.
- Tubo E: 100×10^6 mL de espermatozoides en 1000 μ L + 500 μ L de PBS estéril con **5000 UFC/mL** del microorganismo.

Todos los tratamientos se conservaron a 36°C durante 2 horas en baño termostático. Inmediatamente después de la infección (T0), a los 30 min (T30), a los 60 (T60) y 120 minutos (T120) se determinaron las evaluaciones de calidad seminal como la MET, MRP y vigor. Mientras que en los tiempos 0 y 120 min se estimó, además, la Integridad de la membrana (IMP), la funcionalidad de la membrana plasmática celular (FMP) y la Integridad acrosomal. Todas las observaciones fueron ejecutadas por el mismo operario utilizando un microscopio óptico a distintos aumentos (100X, 200X, 400X y 1000X) según los requerimientos de cada prueba. Además, se utilizó una platina térmica de mesada para mantener los porta y cubreobjetos a 36 °C y una platina térmica para el microscopio. Durante todo el proceso de evaluación, el semen permaneció a temperatura constante de 36 °C en el baño termostático. Los parámetros de calidad evaluados fueron los siguientes:

4.6.1 Motilidad Espermática Total (MET): descrita anteriormente 4.2.1.

4.6.2 Motilidad Rectilínea Progresiva (MRP): descrita anteriormente 4.2.2.

4.6.3 Vigor: Para determinarla se colocaron 7 μL de semen entre un portaobjetos atemperado a 36°C y un cubreobjetos, y con la ayuda de un microscopio óptico (400X) se procedió a observar en varios campos. Para cuantificar y analizar este parámetro se utilizó 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 (células difíciles de seguir visualmente) (Catena y Cabodevila, 1999).

* Los parámetros MET, MRP, y vigor fueron evaluados al mismo tiempo.

4.6.4 Integridad de la membrana (IMP): 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 (Del Río *et al.* 2007). Para determinar el porcentaje de espermatozoides con alteraciones en la integridad de su membrana en los distintos tiempos post infección se utilizó la técnica de tinción vital eosina nigrosina según Mortimer (1994). Para ello, se evaluaron cada una de las muestras infectadas a los tiempos 0 y 120 minutos, agregando los colorantes eosina y nigrosina, según una modificación del método descrito por Mortimer (1994). Se mezclaron 7 μL de la muestra y 10 μL de eosina-nigrosina sobre un portaobjetos, hasta ser homogeneizadas suavemente durante 10 segundos y luego se realizó un frotis que se secó sobre platina térmica de mesada a 36°C . Posteriormente, se contabilizaron 200 células en un microscopio óptico (400x). Los espermatozoides total o parcialmente coloreados (rosado-violeta) fueron considerados como células con alteraciones en la integridad de su membrana, ya que el colorante pudo ingresar en el interior de la célula, mientras que aquellos que no se tiñen (blanco) fueron considerados como células con la membrana plasmática intacta, por no permitir el

ingreso del colorante.

4.6.5 Funcionalidad de la Membrana Plasmática Celular (FMP): Esta metodología se denomina prueba Hipoosmótica (Prueba HOS; Hypoosmotic Sweeling Test). El fundamento de la misma se basa en el aumento de volumen que experimentan las células espermáticas con la membrana plasmática del compartimiento flagelar intacta cuando son sometidas a un choque osmótico al diluir la muestra en un medio hipotónico. Dicho aumento de volumen se debe a la entrada de agua a la célula, la cual provoca la expansión de las membranas en un intento de las mismas por resistir la diferencia de presión osmótica entre el medio intra y extracelular. De este modo, la disminución de la relación entre superficie y volumen provoca el enrollamiento del flagelo del espermatozoide. Para evaluar este parámetro se utilizó el método modificado descrito por Jeyendran *et al.* (1984), adaptado al estudio de semen bovino. Este procedimiento se realizó con cada una de las muestras de semen inmediatamente después de la infección (tiempo 0) y a los 120 minutos de ello. En un tubo Eppendorf se agregaron 500 μL de solución HOS (Anexo 1) y 20 μL de cada uno de los 5 tubos (A-E) que componen los tratamientos. Las mezclas se incubaron en baño María a 36°C, durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a frenar la reacción con 50 μL de solución HOS-STOP (Anexo 1). Para la observación se colocaron 7 μL de la solución incubada entre porta y cubreobjetos y, se contabilizaron 100 células en un microscopio óptico (400X), teniendo en cuenta el compartimiento flagelar, considerando células positivas (espermatozoides con flagelo enrollado = HOS +) y negativas (cuando el flagelo se encuentre recto o en forma de látigo).

4.6.6 Integridad acrosomal: para su determinación se utilizó la técnica modificada de la tinción de Azul de Coomassie descrita por Larson y Miller (1999), realizando un frotis con cada una de las muestras de semen infectado contenidas en los cinco tubos (A-E) donde se colocaron 7 μL de cada tratamiento sobre un portaobjeto, se dejó secar a temperatura ambiente y luego se fijó con metanol frío durante 1 minuto. Posteriormente, se lavó con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez secos, los portaobjetos se colocaron en una cápsula de Cooplin y fueron sumergidos en la tinción de Azul de Coomassie durante 5 minutos y se lavaron con agua destilada, dejando secar. A continuación, se observaron 100 células por

muestra en el microscopio óptico (1000X) agregando aceite de inmersión, y se determinó el porcentaje de espermatozoides con alteraciones en la membrana acrosomal: positivos (+) (espermatozoides intactos: se observa una tinción purpura uniforme que recubre toda la región acrosomal) y negativos (-) (espermatozoides con el acrosoma lesionado: presentan patrones de coloración clara o irregulares).

4.7. Análisis estadísticos

Considerando los microorganismos en forma individual y por momento de observación, todas las variables estudiadas como pH, motilidad espermática total, motilidad rectilínea progresiva, vigor, integridad y funcionalidad de la membrana plasmática e integridad acrosomal fueron analizadas mediante el uso de Modelos Lineales Mixtos, comparando las medias de las concentraciones a través del Test LSD de Fisher con un nivel de significancia del 0,05. Luego, para las variables motilidad espermática total, motilidad rectilínea progresiva y vigor, se analizaron en forma conjunta todos los momentos de evaluación, teniendo en cuenta las medidas repetidas en el tiempo, las concentraciones y su interacción. Los análisis se realizaron utilizando el software estadístico SAS OnDemand (2023).

5. RESULTADOS

5.1. Determinación de la variación del pH, bajo distintas concentraciones crecientes de *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp. y levadura

Se comprobó que el pH de cada eyaculado bovino, determinado mediante tiras reactivas indicadoras de pH de alta sensibilidad, no presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) en ninguno de los dos tiempos evaluados, es decir que la lectura de pH al momento de inicio de la infección con cada microorganismo saprófito (Tiempo 0), fue similar a lo medido en los 120 minutos luego de la incubación, asentado como tiempo final (Tiempo 120). Este procedimiento se realizó en diferentes concentraciones crecientes de cada microorganismo estudiado, dando como resultado un pH constante (Tabla 1). Por lo que se pudo evidenciar, que la presencia de *E. coli*, *Streptococcus* spp. o levadura, en las concentraciones estudiadas, no generan una modificación del pH original que pueda afectar la calidad seminal en cada animal, ya que no se observa un efecto significativo ($p < 0,05$). En el caso del ensayo con levadura, el análisis estadístico no convergió, por lo que no se pudieron estimar los valores mediante el análisis de variancia, ya que en este modelo no se observó variabilidad entre los tratamientos. Asimismo, los valores hallados en los eyaculados inoculados con *E. coli* y *Streptococcus* spp. (Tabla 1) no presentaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre el control y los 120 minutos de infección.

Tabla 1. Valores de pH hallados en eyaculados controles e inoculados con *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp.

		pH				
		Control	250 UFC/mL.	500 UFC/mL.	1000 UFC/mL.	5000 UFC/mL.
<i>Escherichia coli</i>	TIEMPO 0'	6,48 ±0,16A	6,48 ±0,16A	6,48 ±0,16A	6,48 ±0,16A	6,48 ±0,16A
	TIEMPO 120'	6,51 ±0,15A	6,46 ±0,15A	6,46 ±0,15A	6,42 ±0,15A	6,42 ±0,15A
<i>Streptococcus</i> spp	TIEMPO 0'	6,36 ±0,18A	6,36 ±0,18A	6,36 ±0,18A	6,36 ±0,18A	6,36 ±0,18A
	TIEMPO 120'	6,36 ±0,18A	6,36 ±0,18A	6,36 ±0,18A	6,36 ±0,18A	6,36 ±0,18A

Valores mostrados se corresponden a la Media ± EE. Medias con una letra común en la misma fila no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5.2. Efecto de la co-incubación con *Escherichia coli* sobre las variables de calidad seminal

5.2.1. Evaluación cinética y movilidad espermática comparando las distintas concentraciones a través de los tiempos evaluados

En las variables de calidad seminal como motilidad espermática total (MET), motilidad rectilínea progresiva (MRP) y vigor, bajo el efecto de la infección con concentraciones crecientes de *E. coli*, se encontró que las características cinéticas de los espermatozoides, evaluadas en los eyaculados co-incubados con *E. coli*, fueron similares en el momento de la infección (T0) (Tabla 2). Luego de los 30 minutos de incubación, se observó que la motilidad espermática total y progresiva, así como los parámetros cinéticos espermáticos no presentaron alteraciones debido al efecto de los tratamientos en ninguna de las variables evaluadas (Tabla 2). Sin embargo, se puede observar una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la concentración de 5000 UFC/mL, lo que conduce a una disminución de la motilidad general de los espermatozoides.

Tabla 2. Características seminales evaluadas en semen fresco bovino inmediatamente después de la co-incubación tiempo 0, a los 30 min, 60 min y a los 120 min, con concentraciones crecientes de *Escherichia coli* aislada previamente de pajuelas de semen bovino criopreservado de origen comercial.

		Control	250 UFC/mL	500 UFC/mL	1000 UFC/mL	5000 UFC/mL
TIEMPO 0'	MET	85,41 ±3,93A	88,32 ±3,93A	87,49 ±3,93A	86,66 ±3,93A	86,24 ±3,93A
	MRP	83,87 ±3,25A	85,12 ±3,25A	85,12 ±3,25A	84,29 ±3,25A	82,21 ±3,25A
	Vigor	4,61 ±0,20A	4,61 ±0,20A	4,61 ±0,20A	4,61 ±0,20A	4,61 ±0,20A
TIEMPO 30'	MET	84,25±4,99AB	85,92 ±4,99A	83,84 ±4,99AB	83,00 ±4,99AB	81,75 ±4,99B
	MRP	78,14 ±5,69A	76,89 ±5,69A	77,31 ±5,69A	74,39 ±5,69A	73,56 ±5,69A
	Vigor	4,47 ±0,20A	4,47 ±0,20A	4,47 ±0,20A	4,47 ±0,20A	4,47 ±0,20A
TIEMPO 60'	MET	82,07 ±5,12A	82,49 ±5,12A	80,40 ±5,12A	77,90 ±5,12AB	74,57 ±5,12B
	MRP	77,33 ±6,63A	77,75 ±6,63A	73,58 ±6,63AB	69,42 ±6,63B	67,33 ±6,63B
	Vigor	4,39 ±0,24A	4,39 ±0,24A	4,30 ±0,24AB	4,22 ±0,24AB	4,05 ±0,24B
TIEMPO 120'	MET	78,08 ±5,53A	73,08 ±5,53A	62,24 ±5,53B	58,91 ±5,53B	58,08 ±5,53B
	MRP	75,11 ±5,79A	62,19 ±5,79B	53,44 ±5,79BC	47,61 ±5,79C	44,28 ±5,79C
	Vigor	4,04 ±0,25A	3,96 ±0,25A	3,71 ±0,25AB	3,54 ±0,25BC	3,29 ±0,25C

Valores mostrados se corresponden a la Media ± EE. Medias con una letra común en la misma fila no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Pasado los 60 minutos (T60) de inoculación, se continuó con la evaluación de los parámetros cinéticos espermáticos, mostrando un efecto significativo ($p < 0,05$) de la presencia de *E. coli*, principalmente en las concentraciones 1000 UFC/mL y 5000 UFC/mL (Tabla 2), observando el aspecto de aglutinación entre las cabezas de algunos espermatozoides (en bajo porcentaje). Las concentraciones crecientes de *E. coli*, luego de los 120 minutos de la incubación ($p < 0,05$; Tabla 2), afectaron negativamente la MET y MRP, dando como resultado una marcada reducción de la motilidad espermática y una disminución de la velocidad de los espermatozoides. Asimismo, la observación microscópica en las concentraciones de 250 UFC/mL y 500 UFC/mL indicó un 30% de aglutinación en T120 (Fig. 5A y B). Mientras que en 1000 UFC/mL y 5000 UFC/mL el porcentaje de espermatozoides aglutinados aumento a un 50% aproximadamente (Fig. 5C). Simultáneamente, se determinó que el tiempo también afecta los parámetros cinéticos de los espermatozoides, ya que se reveló una disminución significativa ($p < 0,05$) en T 120 en todos los tratamientos infectados, respecto al control.



Figura 5. Aglutinación espermática. Se observó la unión de espermatozoides móviles pegados entre sí, formando agrupaciones. A) Menor grado de aglutinación en los diferentes campos observados (100X). B) Grado de aglutinación intermedio (100X). C) Mayor grado de aglutinación en los diferentes campos visuales (400X).

5.2.2. Evaluación de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática e integridad acrosomal

No se registraron evidencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) que muestren alteraciones de los parámetros como integridad (Fig. 6) y funcionalidad de la membrana

plasmática (Fig. 7) en ninguna de las concentraciones de *E. coli* evaluadas, ni en los tiempos en los que se realizó cada evaluación, cotejándose en el análisis dos tiempos, Tiempo 0 y Tiempo 120 (Tabla 3). Por lo que, se observó que todas las concentraciones evaluadas, no afectaron de manera significativa la integridad y funcionalidad de la membrana. Lo mismo ocurrió en relación a la integridad acrosomal (Fig. 8), no se observaron alteraciones en ninguna de las concentraciones ni tiempos evaluados (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros seminales evaluados en semen fresco bovino inmediatamente después de la infección (Tiempo 0) y a los 120 minutos (Tiempo 120) con concentraciones crecientes de *Escherichia coli* aislada previamente de pajuelas de semen bovino criopreservado de origen comercial.

		Control	250 UFC/mL.	500 UFC/mL.	1000 UFC/mL.	5000 UFC/mL.
TIEMPO 0'	IMP	65,21 ±3,38A	66,46 ±3,38A	67,69 ±3,38A	68,88 ±3,38A	71,69 ±3,38A
	FMP	51,64 ±5,53A	52,01 ±5,53A	51,66 ±5,53A	52,85 ±5,53A	52,17 ±5,53A
	IA	92,26 ±1,56A	89,92 ±1,51A	91,09 ±1,51A	89,84 ±1,51A	90,57 ±1,51A
TIEMPO 120'	IMP	63,91 ±4,12A	63,00 ±4,12A	56,47 ±4,12A	66,35 ±4,12A	64,50 ±4,12A
	FMP	48,15 ±5,33A	50,08 ±5,33A	54,50 ±5,33A	49,92 ±5,33A	52,81 ±5,33A
	IA	90,08 ±2,04A	89,80 ±2,04A	87,93 ±2,04A	88,67 ±2,04A	87,20 ±2,08A

Valores mostrados se corresponden a la Media ± EE. Medias con una letra común en la misma fila no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

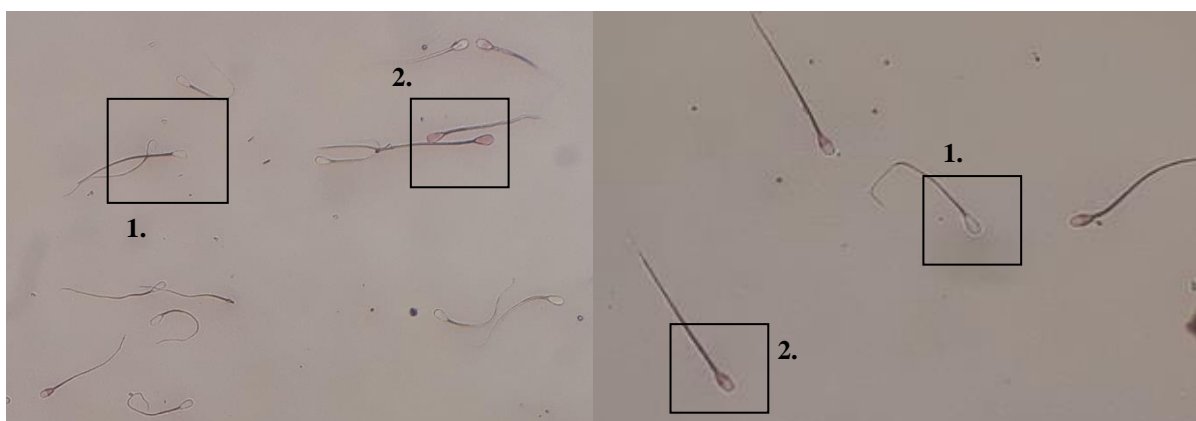


Figura 6. Microfotografía (400X) de frotis de espermatozoides bovinos sometidos a la técnica de coloración Eosina-Nigrosina. 1. Espermatozoides sin daño presentan coloración blanca. 2. Espermatozoides con daño en la membrana plasmática corresponden a los teñidos de rosa (total o parcial).

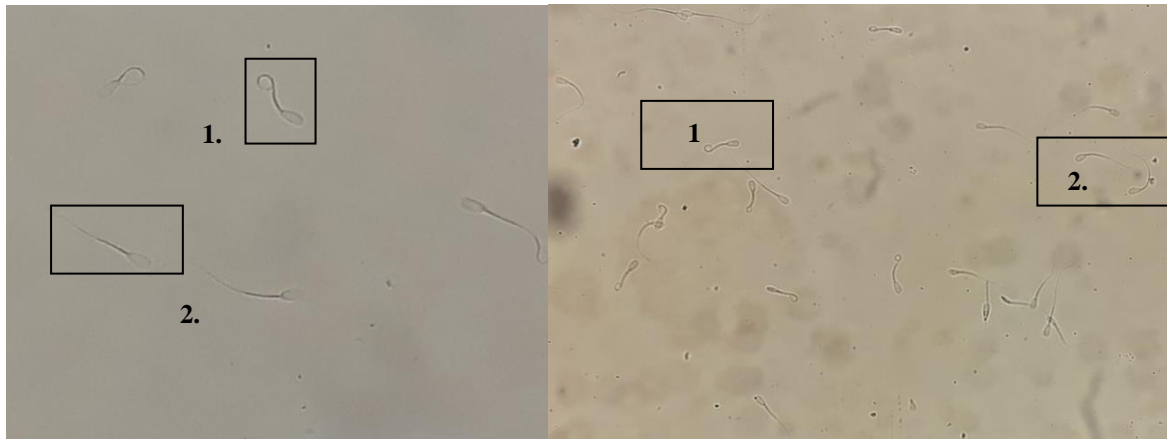


Figura 7. Microfotografía de espermatozoides bovinos sometidos a la prueba Hipoosmótica (HOS-T). 1. Los espermatozoides con flagelo enrollado (HOS (+) positivo) presentan membranas funcionales. 2. Espermatozoides con flagelo recto o en forma de látigo (HOS (-) negativo) se consideran con alteraciones funcionales, (400X).

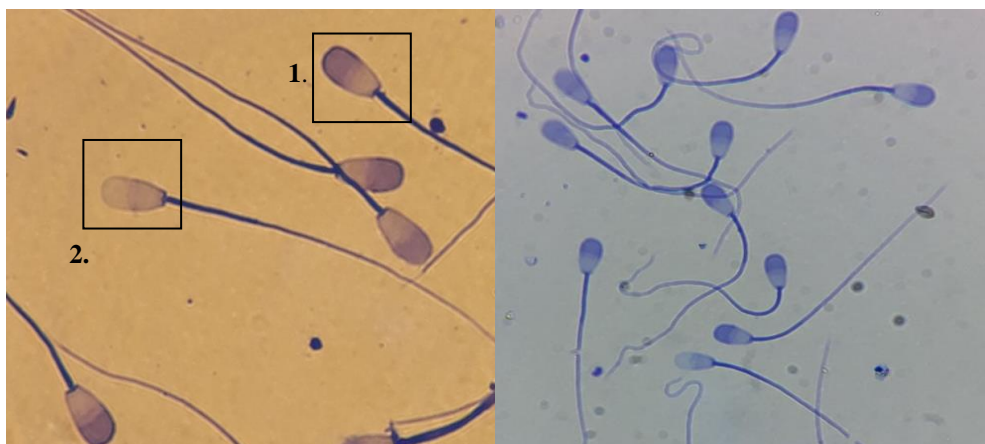


Figura 8. Microfotografía (1000X): frotis de espermatozoides bovinos sometidos a la tinción de Azul de Coomassie. 1. Espermatozoides intactos, considerados los teñidos purpuras uniformemente en la región acrosomal. 2. Espermatozoides con daño en el acrosoma, corresponden a los patrones de coloración clara o irregular (1000X).

5.2.3. Análisis de la evolución del efecto de la co-incubación con *Escherichia coli* sobre variables cinéticas espermáticas

Respecto al análisis de la evolución del efecto de las distintas concentraciones de *E. coli* en función del tiempo de incubación, se observó en la Figura 9, una variación decreciente en el porcentaje de la motilidad espermática total, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el efecto tiempo, desde el minuto 60 (T60) de

incubación, siendo mayoritariamente marcada a los 120 minutos. Asimismo, se exhibe el efecto significativo ($p < 0,05$) desde la concentración de 500 UFC/mL a 5000 UFC/mL generando una disminución de la proporción total de espermatozoides móviles (Fig. 9). En relación al porcentaje de espermatozoides con motilidad rectilínea progresiva (Fig. 10), se puede determinar que existe una disminución desde el momento de incubación de 60 minutos, generando una marcada diferencia ($p < 0,05$) en la interacción entre el tiempo de incubación y la concentración. Observándose específicamente en el tiempo 120 en las concentraciones 250 UFC/mL, 500 UFC/mL, 1000 UFC/mL y 5000 UFC/mL (Fig. 10). En cuanto a las variaciones correspondientes al vigor espermático, en la Figura 11 se distingue un efecto significativo ($p < 0,05$) a lo largo del tiempo de infección, generando una disminución desde el tiempo 60 min, lo que indica que existe una disminución de los parámetros cinéticos de los espermatozoides a medida que aumenta el tiempo de incubación con *E. coli*.

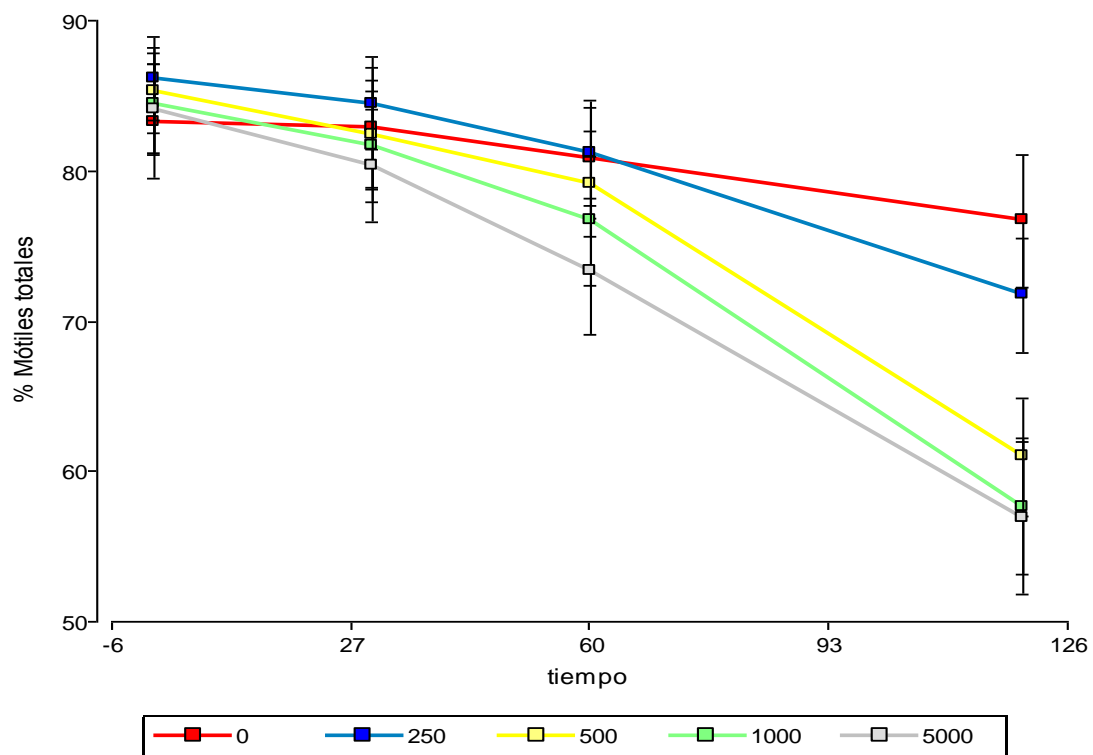


Figura 9. Variación del porcentaje de la motilidad espermática total en todas las concentraciones a lo largo del tiempo de incubación.

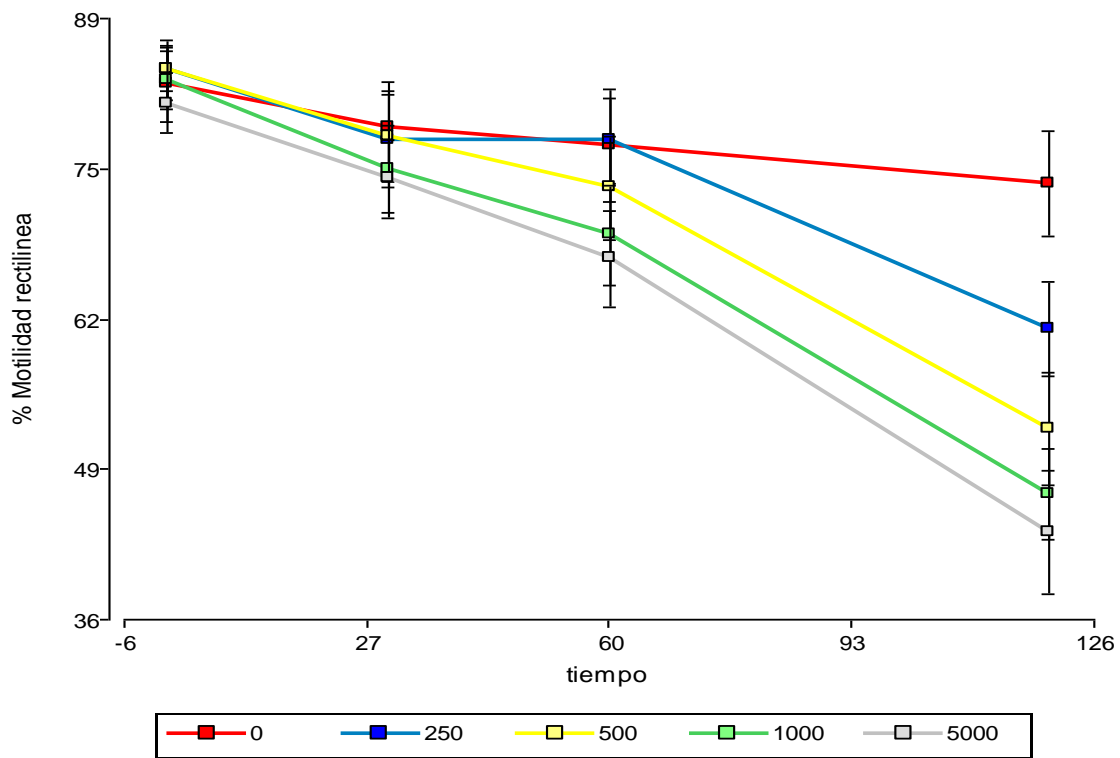


Figura 10. Variación del porcentaje de la motilidad rectilínea progresiva en todas las concentraciones a lo largo del tiempo de incubación.

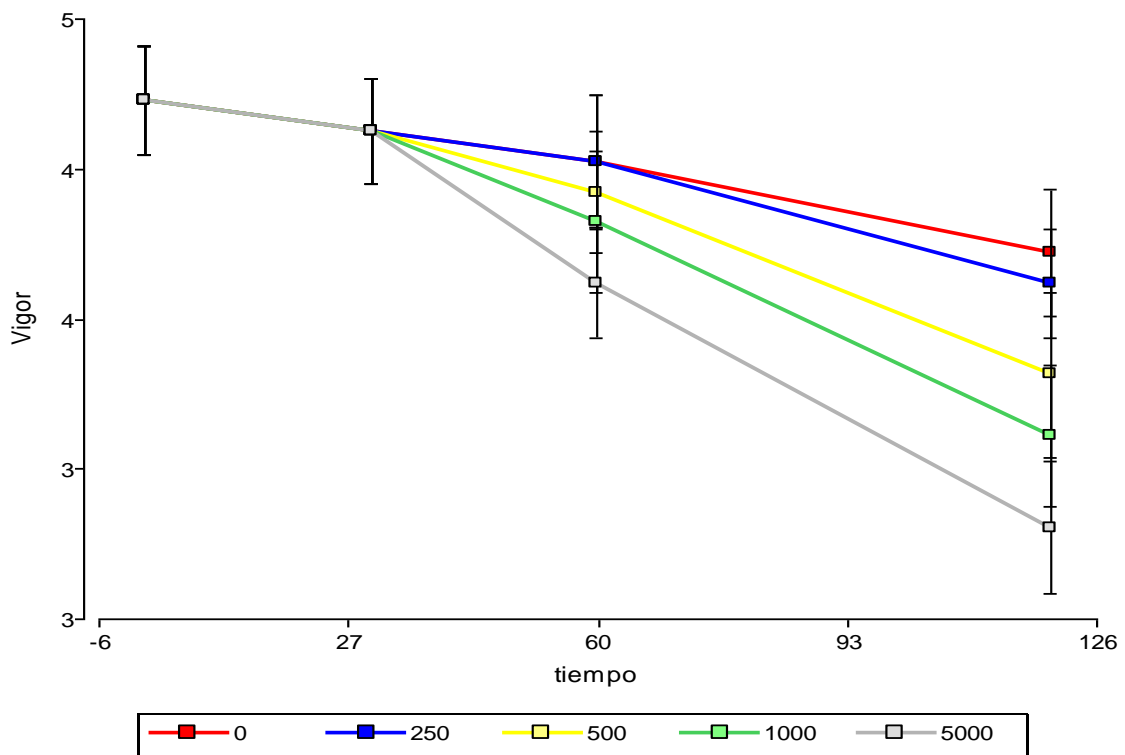


Figura 11. Variación del porcentaje del vigor en todas las concentraciones a lo largo del tiempo de incubación.

5.3. Efecto de la co-incubación con *Streptococcus* spp. sobre las variables de calidad seminal

5.3.1. Evaluación cinética y movilidad espermática comparando las distintas concentraciones a través de los tiempos evaluados

En los eyaculados co-incubados con concentraciones crecientes de *Streptococcus* spp., la evaluación de las variables de calidad seminal como motilidad espermática total (MET), motilidad rectilínea progresiva (MRP) y vigor, no mostraron un efecto significativo ($p < 0,05$) desde el momento de la infección (T0) hasta los 30 minutos de incubación (Tabla 4), en ninguna de las concentraciones estudiadas. Además, el análisis estadístico del vigor no convergió, por lo que no se pudieron estimar los valores mediante el análisis de variancia, ya que en este modelo no se observó variabilidad entre los tratamientos.

Pasado los 60 minutos (T60) de incubación, los parámetros de motilidad total y progresiva, así como los parámetros cinéticos espermáticos no presentaron alteraciones debido al efecto de los tratamientos (Tabla 4). Sin embargo, existe una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la concentración de 5000 UFC/mL, lo que conduce a una disminución de la motilidad general de los espermatozoides. Esto mismo sucede, luego del tiempo de incubación 120 minutos, donde se puede observar un efecto significativo en las concentraciones de 5000 UFC/mL de *Streptococcus* spp., afectando negativamente la MET y MRP ($p < 0,05$; Tabla 4).

Tabla 4. Características seminales evaluadas en semen fresco bovino inmediatamente después de la co-incubado tiempo 0, a los 30 min, 60 min y a los 120 min, con concentraciones crecientes de *Streptococcus* spp. aislada previamente de pajuelas de semen bovino criopreservado de origen comercial.

		Control	250 UFC/mL.	500 UFC/mL.	1000 UFC/mL.	5000 UFC/mL.
TIEMPO 0'	MET	87,41 ±4,84A	87,41 ±4,84A	86,57 ±4,84A	85,74 ±4,84A	85,32 ±4,84A
	MRP	84,62 ±7,09A	85,03 ±7,09A	83,37 ±7,09A	82,53 ±7,09A	79,20 ±7,09A
	Vigor	4,48 ±0,26A	4,48 ±0,26A	4,48 ±0,26A	4,48 ±0,26A	4,40 ±0,26A
TIEMPO 30'	MET	85,93 ±6,78A	85,93 ±6,78A	85,93 ±6,78A	85,10 ±6,78A	85,10 ±6,78A
	MRP	87,88 ±2,23A	87,88 ±2,23A	87,05 ±2,23A	82,05 ±2,23B	86,22 ±2,23A
	Vigor	no convergió	no convergió	no convergió	no convergió	no convergió
TIEMPO	MET	81,07 ±5,94A	79,82 ±5,94A	79,40 ±5,94A	77,74 ±5,94A	66,90 ±5,94B

60'	MRP	80,12 ±7,75A	79,29 ±7,75A	79,71 ±7,75A	75,12 ±7,75A	60,96 ±7,75B
	Vigor	4,37 ±0,26A	4,37 ±0,26A	4,37 ±0,26A	4,37 ±0,26A	4,12 ±0,26A
TIEMPO 120'	MET	70,73 ±4,01A	69,90 ±4,01A	67,40 ±4,01AB	69,90 ±4,01A	59,90 ±4,01B
	MRP	72,91 ±8,30A	70,41 ±8,30A	68,74 ±8,30A	66,24 ±8,30A	52,08 ±8,30A
	Vigor	3,90 ±0,17A	3,90 ±0,17A	3,82 ±0,17A	3,82 ±0,17A	3,57 ±0,17A

Valores mostrados se corresponden a la Media ± EE. Medias con una letra común en la misma fila no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5.3.2. Evaluación de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática e integridad acrosomal

Los parámetros como la integridad y funcionalidad de la membrana del espermatozoide no fueron afectados por el efecto de co-incubación con *Streptococcus* spp. (Tabla 5). Por lo que no se registraron evidencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) que muestren alteraciones de en ninguna de las concentraciones, ni en los tiempos en los que se realizó cada evaluación. Lo mismo ocurrió en relación a la integridad acrosomal, no se observaron alteraciones en ninguna de las concentraciones ni tiempos evaluados ($p < 0,05$).

Tabla 5. Parámetros seminales evaluados en semen bovino fresco inmediatamente después de la infección (Tiempo 0) y a los 120 minutos (Tiempo 120) con concentraciones crecientes de *Streptococcus* spp. aislada previamente de pajuelas de semen bovino criopreservado de origen comercial.

		Control	250 UFC/mL.	500 UFC/mL.	1000 UFC/mL.	5000 UFC/mL.
TIEMPO 0'	IMP	74,53 ±2,37A	74,18 ±2,37A	74,95 ±2,37A	72,83 ±2,37A	73,98 ±2,37A
	FMP	48,13 ±5,13A	49,54 ±5,13A	52,45 ±5,13A	52,16 ±5,13A	51,80 ±5,13A
	IA	91,52 ±1,51A	91,15 ±1,51A	91,12 ±1,51A	91,16 ±1,51A	91,59 ±1,51A
TIEMPO 120'	IMP	72,88 ±2,45A	75,15 ±2,45A	74,99 ±2,45A	72,33 ±2,53A	74,76 ±2,45A
	FMP	47,62 ±3,55A	42,26 ±3,55A	43,70 ±3,55A	42,82 ±3,55A	43,14 ±3,55A
	IA	87,22 ±1,86A	86,29 ±1,86A	88,90 ±1,86A	85,90 ±1,86A	86,33 ±1,94A

Valores mostrados se corresponden a la Media ± EE. Medias con una letra común en la misma fila no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5.3.3. Análisis de la evolución del efecto de la co-incubación con *Streptococcus* spp. sobre variables cinéticas espermáticas

El análisis de la evolución del efecto de las distintas concentraciones de *Streptococcus* spp. en función del tiempo de incubación, dio como resultado una diferencia significativa ($p < 0,05$) en el efecto tiempo, generando una variación decreciente en el porcentaje de la motilidad espermática total (Fig. 12) desde el minuto 60 (T60) de incubación, siendo mayoritariamente marcada en las concentraciones de 5000 UFC/mL. En relación al porcentaje de espermatozoides con motilidad rectilínea progresiva (Fig. 13), se puede observar que existe una disminución desde el momento de incubación T60 ($p < 0,05$), con una diferencia significativa ($p < 0,01$) en las concentraciones 1000 UFC/mL y 5000 UFC/mL (Fig. 13). En cuanto a las variaciones correspondientes al vigor espermático, en la Figura 14 se distingue un efecto significativo ($p < 0,05$) a lo largo del tiempo de incubación, generando una disminución desde el tiempo 60 min, lo que nos indica que existe un efecto negativo del tiempo de incubación sobre los parámetros cinéticos de los espermatozoides.

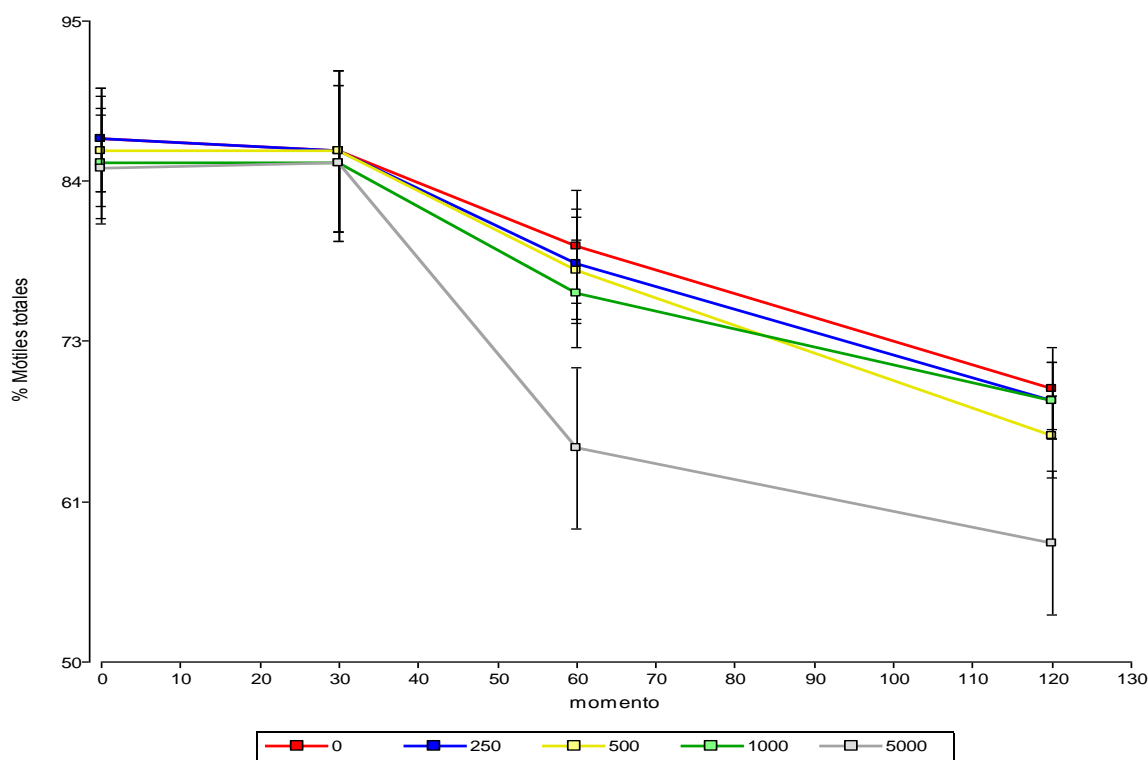


Figura 12. Variación del porcentaje de la motilidad espermática total en todas las concentraciones a lo largo del tiempo de incubación.

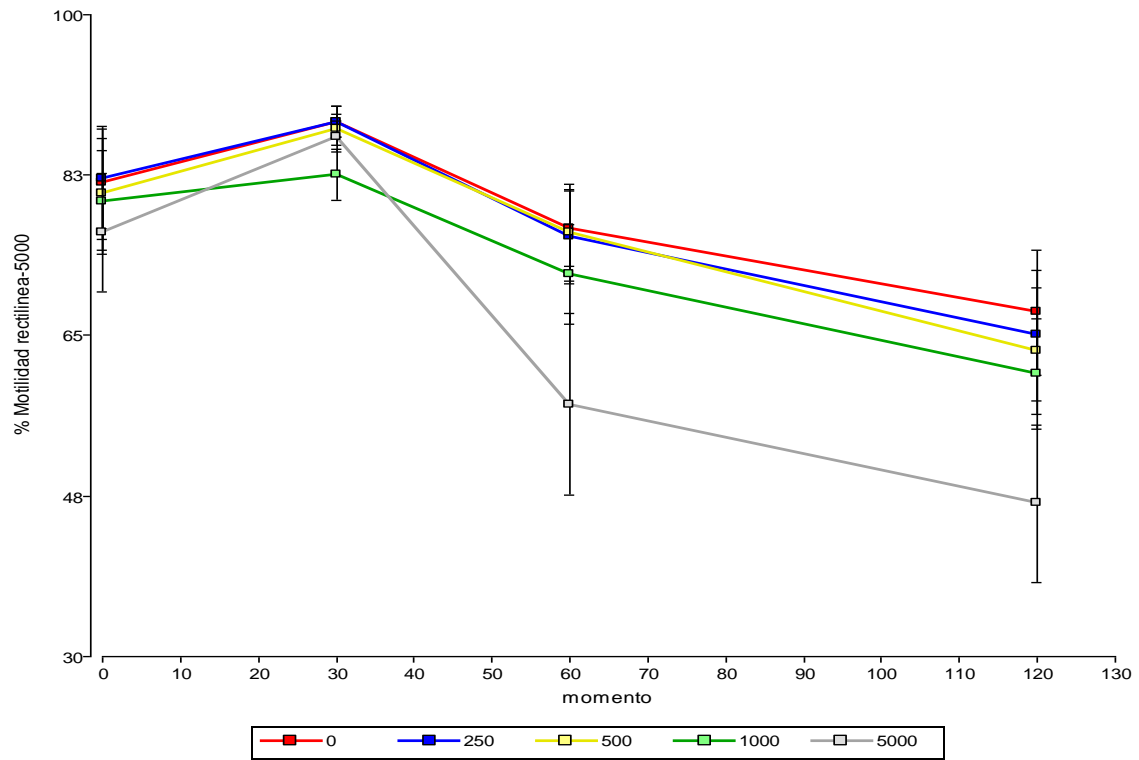


Figura 13. Variación del porcentaje de la motilidad rectilínea progresiva en todas las concentraciones a lo largo del tiempo de incubación.

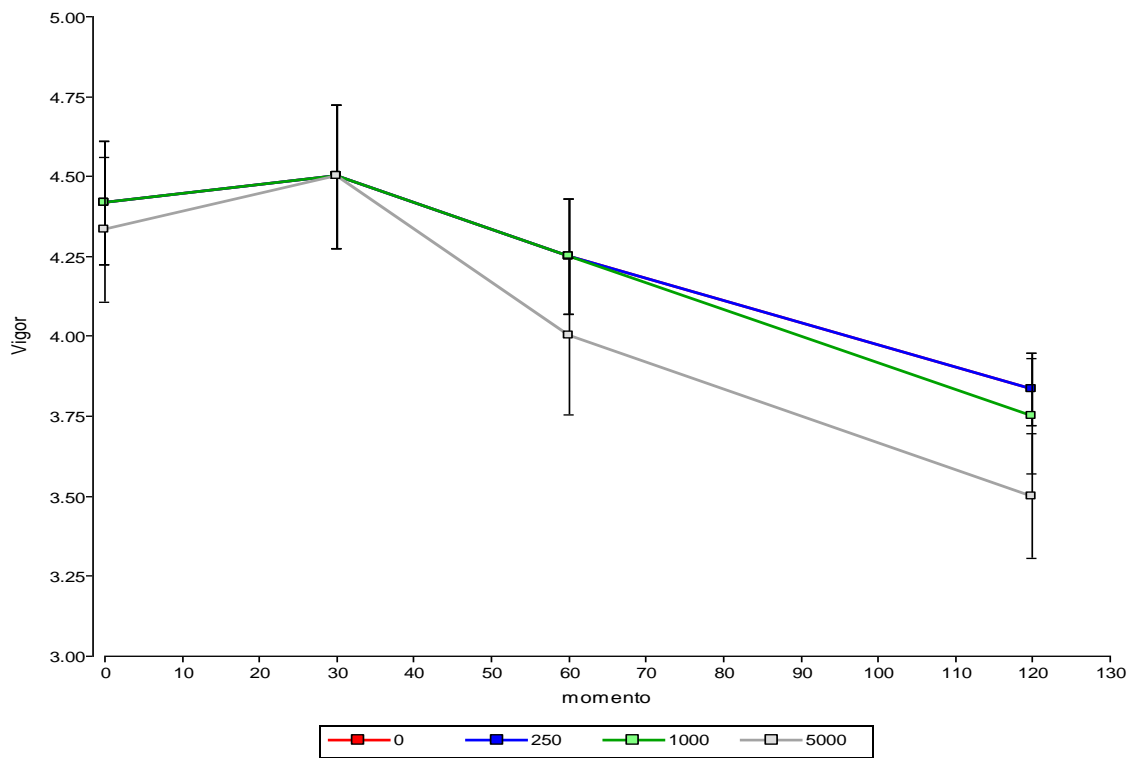


Figura 14. Variación del porcentaje del vigor en todas las concentraciones a lo largo del tiempo de incubación.

5.4. Efecto de la co-incubación con levadura sobre las variables de calidad seminal

5.4.1. Evaluación cinética y movilidad espermática comparando las distintas concentraciones a través de los tiempos evaluados

En los eyaculados co-incubados con concentraciones crecientes de levadura, las características cinéticas de los espermatozoides como motilidad espermática total (MET), motilidad rectilínea progresiva (MRP) y vigor, no mostraron un efecto significativo ($p < 0,05$) desde el momento de la infección (T0) hasta los 30 minutos de incubación (Tabla 6), en ninguna de las concentraciones estudiadas. Pasado los 60 minutos (T60) de inoculación, los parámetros de motilidad total y progresiva presentaron alteraciones debido al efecto significativo ($p < 0,05$) de los tratamientos en la concentración de 5000 UFC/mL, lo que conduce a una disminución de la motilidad general de los espermatozoides (Tabla 6). Sin embargo, el análisis estadístico del vigor no convergió, por lo que no se pudieron estimar los valores mediante el análisis de variancia, ya que en este modelo no se observó variabilidad entre los tratamientos. Luego del tiempo de incubación 120 minutos, se puede observar una diferencia significativa a partir de las concentraciones de 1000 UFC/mL y 5000 UFC/mL de levadura, afectando negativamente la MET ($p < 0,05$; Tabla 6), pero manteniendo estables los parámetros de MRP y vigor.

Tabla 6. Características seminales evaluadas en semen fresco bovino inmediatamente después de la co-incubado tiempo 0, a los 30 min, 60 min y a los 120 min, con concentraciones crecientes de levadura aislada previamente de pajuelas de semen bovino criopreservado de origen comercial.

		Control	250 UFC/mL.	500 UFC/mL.	1000 UFC/mL.	5000 UFC/mL.
TIEMPO 0'	MET	71,96 ±2,90A	71,96 ±2,90A	71,96 ±2,90A	71,12 ±2,90A	71,96 ±2,90A
	MRP	70,17 ±3,73A	72,26 ±3,73A	70,17 ±3,73A	71,01 ±3,73A	71,42 ±3,73A
	Vigor	4,43 ±0,21A	4,43 ±0,21A	4,51 ±0,21A	4,43 ±0,21A	4,43 ±0,21A
TIEMPO 30'	MET	67,60 ±3,51A	68,60 ±3,51A	64,60 ±3,51A	65,60 ±3,51A	64,60 ±3,51A
	MRP	63,48 ±3,66A	64,48 ±3,66A	64,48 ±3,66A	60,48 ±3,66A	62,48 ±3,66A
	Vigor	4,37 ±0,18A	4,37 ±0,18A	4,47 ±0,18A	4,37 ±0,18A	4,47 ±0,18A
TIEMPO 60'	MET	63,08 ±3,31A	63,91 ±3,31A	63,08 ±3,31A	61,41 ±3,31A	61,41 ±3,31A
	MRP	55,59 ±5,17A	56,43 ±5,17A	53,51 ±5,17AB	53,09 ±5,17AB	48,93 ±5,17B
	Vigor	No convergió	No convergió	No convergió	No convergió	No convergió

TIEMPO 120'	MET	59,35 ±2,38A	59,35 ±2,38A	58,51 ±2,38AB	56,01 ±2,38B	56,01 ±2,38B
	MRP	48,40 ±7,06A	48,40 ±7,06A	42,57 ±7,06A	45,07 ±7,06A	40,07 ±7,06A
	Vigor	4,10 ±0,21A	4,10 ±0,21A	4,02 ±0,21A	4,02 ±0,21A	4,10 ±0,21A

Valores mostrados se corresponden a la Media ± EE. Medias con una letra común en la misma fila no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5.4.2. Evaluación de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática e integridad acrosomal

No se registraron evidencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) que determinen alteraciones sobre los parámetros de integridad y funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides en ninguno de los tratamientos co-incubados con levadura, ni en los tiempos en los que se realizó cada evaluación, cotejándose en el análisis el Tiempo 0 y Tiempo 120 (Tabla 7). De igual manera, en relación a la integridad acrosomal, no se observó un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) que demuestre alteraciones en las concentraciones, ni en los tiempos en los que se realizó cada evaluación, con respecto al control negativo (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros seminales evaluados en semen bovino fresco inmediatamente después de la infección (Tiempo 0) y a los 120 minutos (Tiempo 120) con concentraciones crecientes de levadura aislada previamente de pajuelas de semen bovino criopreservado de origen comercial.

		Control	250 UFC/mL.	500 UFC/mL.	1000 UFC/mL.	5000 UFC/mL.
TIEMPO 0'	IMP	73,79 ±3,11A	74,82 ±3,11A	74,52 ±3,11A	73,62 ±3,15A	73,21 ±3,11A
	FMP	56,79 ±3,64A	57,71 ±3,64A	56,35 ±3,64A	60,17 ±3,64A	55,92 ±3,64A
	IA	92,45 ±1,12A	93,17 ±1,12A	92,46 ±1,12A	92,40 ±1,15A	94,11 ±1,12A
TIEMPO 120'	IMP	78,66 ±2,34A	75,79 ±2,34A	76,69 ±2,34A	75,92 ±2,34A	74,03 ±2,34A
	FMP	44,92 ±2,99A	46,49 ±2,99A	46,98 ±2,99A	49,22 ±2,99A	47,43 ±2,99A
	IA	90,19 ±1,21BC	92,41 ±1,21AB	89,59 ±1,21C	89,59 ±1,21C	92,63 ±1,21A

Valores mostrados se corresponden a la Media ± EE. Medias con una letra común en la misma fila no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5.4.3. Análisis de la evolución del efecto de la co-incubación con levadura sobre variables cinéticas espermáticas

En la Figura 15, el análisis de la evolución del efecto de las distintas concentraciones de levadura en función del tiempo de incubación, se observó una variación decreciente en el porcentaje de la motilidad espermática total, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el efecto tiempo, desde el minuto 30 (T30) de incubación, siendo mayoritariamente marcada a los 120 minutos. Asimismo, en relación al porcentaje de espermatozoides con motilidad rectilínea progresiva (Fig. 16), se puede determinar que existe una marcada diferencia significativa ($p < 0,05$) desde el momento de incubación de 60 minutos, generando una disminución en la evolución del tiempo de incubación, sin generar un efecto en las concentraciones de los distintos tratamientos. Lo mismo sucede en cuanto a las variaciones correspondientes al vigor espermático, en la Figura 17 se distingue un efecto significativo ($p < 0,05$) a lo largo del tiempo de infección, generando una disminución desde el tiempo 60 min, lo que nos puede indicar que existe una consecuencia del periodo de incubación que afecta los parámetros cinéticos de los espermatozoides.

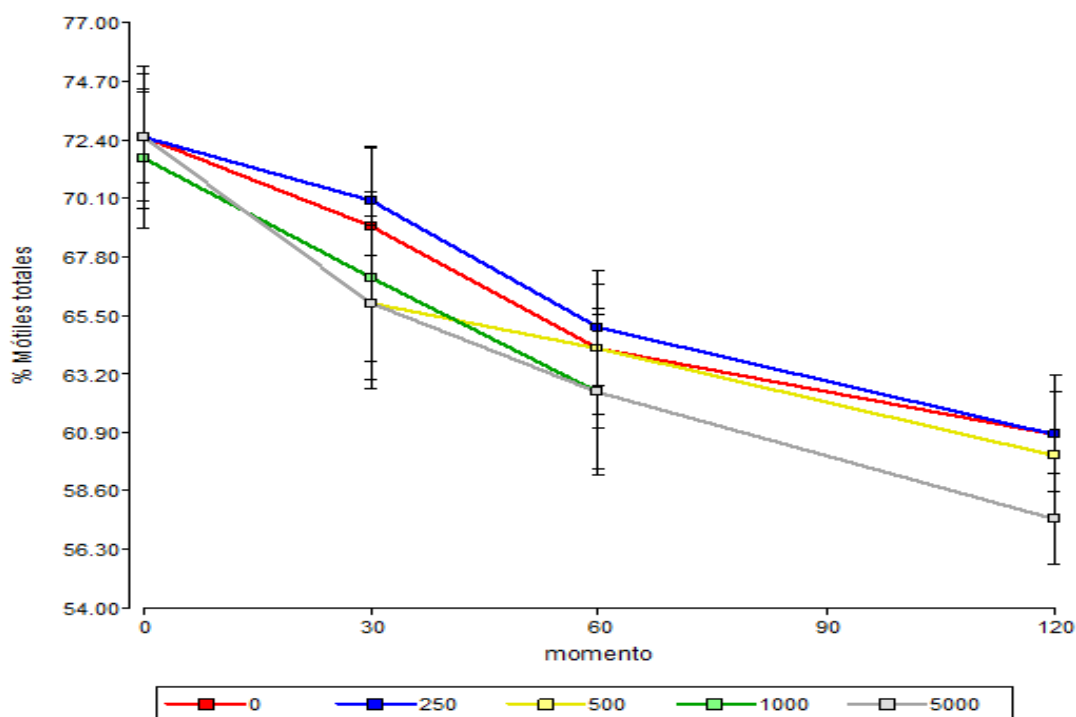


Figura 15. Variación del porcentaje de la motilidad espermática total en todas las concentraciones a lo largo del tiempo de incubación.

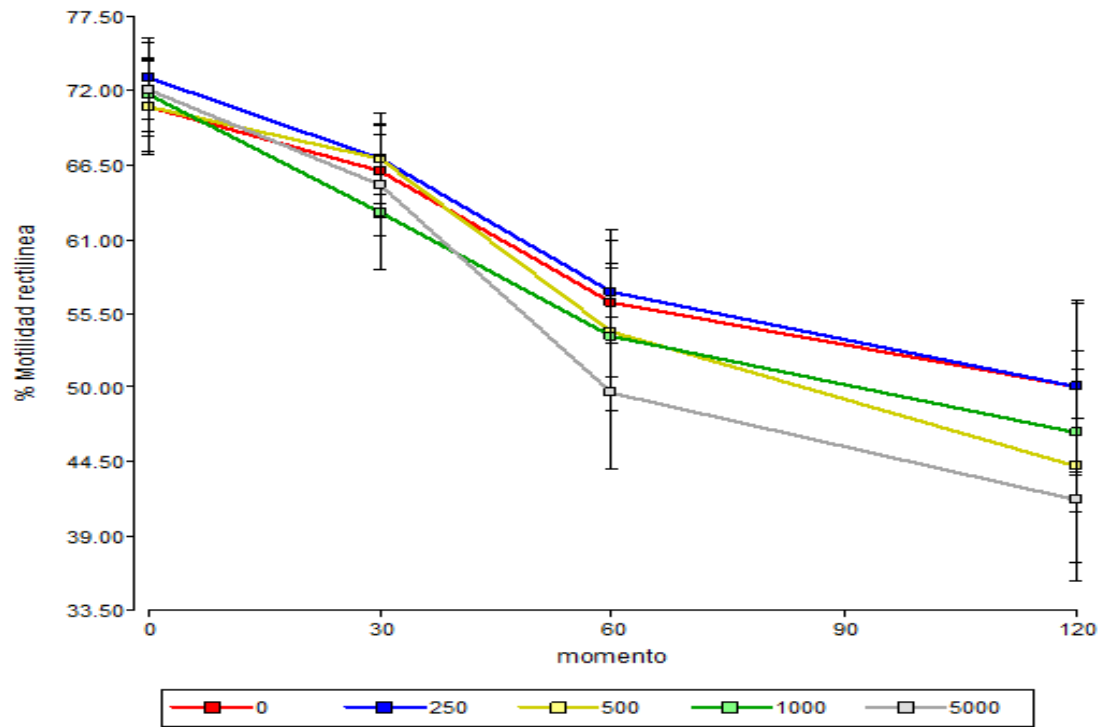


Figura 16. Variación del porcentaje de la motilidad rectilínea progresiva en todas las concentraciones a lo largo del tiempo de incubación.

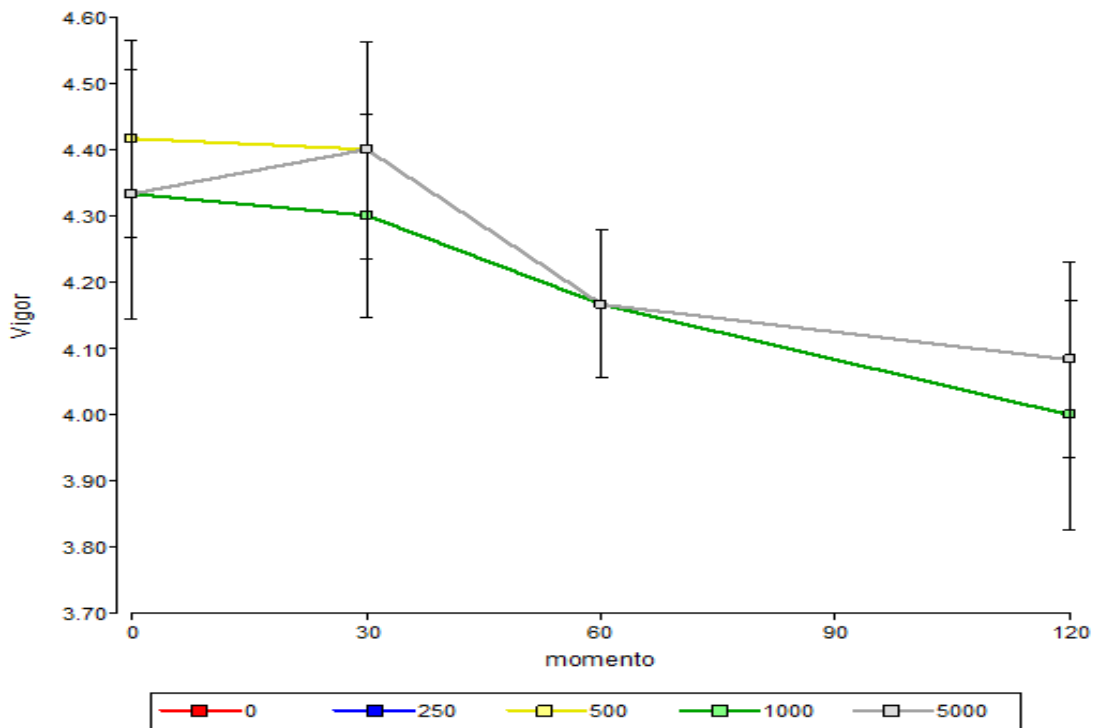


Figura 17. Variación del porcentaje del vigor en todas las concentraciones a lo largo del tiempo de incubación.

6. DISCUSIÓN

A pesar de la gran importancia que tiene la calidad microbiológica del semen, son escasos los estudios publicados que investiguen la influencia de los microorganismos saprófitos en la calidad espermática del toro. La mayor parte de los trabajos científicos se han realizado en porcinos, equinos, ovinos y humanos. Nuestros resultados buscan ser un pequeño aporte al conocimiento de la calidad microbiológica del semen bovino y al efecto que los microorganismos aislados de muestras de semen tienen sobre parámetros de calidad espermática.

En la evaluación de parámetros de calidad seminal en semen bovino fresco, encontramos que la presencia de *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp. y levaduras, en las concentraciones de 250 UFC/mL, 500 UFC/mL, 1000 UFC/mL y 5000 UFC/mL no afectan el pH original del eyaculado. Esto puede deberse al efecto tampón de los componentes del fluido seminal. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Bennemann y colaboradores (2000), quienes trabajaron en muestras de semen porcino, e indicaron que el pH no fue influenciado por la presencia de *E. coli*. Según Castellón *et al.* (2018), el plasma seminal provee un pH alcalino y por esta propiedad, permite neutralizar el medio ácido (ácido láctico) producido en la uretra por la propia microflora. Las aminas básicas, como putrescina, espermina, espermidina y cadaverina contrarrestan el ambiente ácido, y protegen el ADN espermático de la posible desnaturalización ácida. Contradictoriamente, con nuestra observación, Córdova Izquierdo *et al.* (2015) explica que la contaminación bacteriana del semen en cerdos puede provocar cambios en el pH del plasma seminal.

En relación a las variables de integridad y funcionalidad de la membrana plasmática y en la integridad acrosomal, encontramos resultados similares a lo visto en relación al pH, ya que no se observaron alteraciones en ninguna de las concentraciones evaluadas con cada microorganismo, ni en los tiempos de incubación analizados, tiempo 0 y 120 minutos. En relación a estos parámetros, nuestros hallazgos coinciden con lo reportado en la literatura en muestras de semen de porcino, ya que la integridad del acrosoma no se vio afectada por el tipo de bacteria inoculada a lo largo del tiempo (Bennemann *et al.* 2000). Es importante destacar la necesidad de dar continuidad a este tipo de evaluaciones, para aumentar la cantidad de muestras analizadas y optimizar estas estimaciones.

En los eyaculados frescos considerados en este estudio, co-incubados con *E. coli*, aislada de pajuelas de esperma bovino criopreservado de origen comercial, observamos una influencia negativa sobre los parámetros cinéticos del esperma, en las concentraciones crecientes de la bacteriana y principalmente a partir de los 60 minutos de incubación. Además, simultáneamente con la evaluación de los parámetros cinéticos se pudo determinar la aglutinación de los espermatozoides. Estos efectos, solamente encontrados en las muestras inoculadas con *E. coli*, capaces de unirse a los espermatozoides bovinos, generando un efecto de aglutinación en función de la concentración bacteriana y del tiempo de incubación, siendo capaces de afectar la motilidad general, como así también del vigor espermático. En concordancia con estos hallazgos, estudios realizados en semen humano, determinaron que la presencia de *E. coli*, afectó la motilidad de los espermatozoides, y atribuyeron esta reducción como consecuencia de la aglutinación y adherencia de esta bacteria Gram negativa a la membrana plasmática del espermatozoide, lo que provoca un deterioro sobre la morfología espermática, dependiendo de la relación semen-bacteria (Wolff *et al.* 1993; Monga y Roberts, 1994; Diemer *et al.* 1996). Complementariamente, un trabajo realizado en ovinos, informó que la presencia de 10^7 UFC/mL de *E. coli* afectó negativamente los parámetros de calidad espermática, provocando cambios en todos los tiempos de evaluación (0,5; 1,5 y 2,5 horas) (Flores Olivares *et al.* 2014). Diemer y colaboradores (1996) mencionan que la interacción *E. coli*/espermatozoides puede ser un proceso de dos pasos: adhesión y posterior destrucción de la membrana espermática, teniendo un efecto inhibitor sobre la fertilidad en los machos. En muestras infectadas con este microorganismo, la inmovilización de los espermatozoides precede a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, lo que indica diferencias en los mecanismos que influyen en la cinética del esperma y la integridad de la membrana plasmática (Bonet *et al.* 2018). Sin embargo, nuestras observaciones no respaldan este hallazgo, ya que en las concentraciones evaluadas no se generó un efecto sobre la funcionalidad e integridad de la membrana espermática, pero sí afectaron los parámetros cinéticos. Considerando, que los agregados moleculares se adhieren de forma inespecífica pero fuerte a la cabeza y cola del espermatozoide, favoreciendo así la formación de grupos con espermatozoides aglutinados cabeza-cabeza, cola-cola y cabeza-cola (Bonet *et al.* 2018).

Por otro lado, nuestros resultados expresaron que en los eyaculados co-incubados

con *Streptococcus* spp. a una concentración de 5000 UFC/mL, generó una disminución de las variables de calidad seminal como motilidad espermática total, progresiva y vigor, pasados los 60 minutos de incubación. Un estudio llevado a cabo por Martínez y colaboradores (1987) reveló que la presencia de diferentes bacterias, incluidas bacterias del género *Streptococcus* spp. provocó cambios metabólicos en los espermatozoides del semen bovino recién colectado (fresco), afectando la calidad espermática y condicionando la capacidad fecundante. Sin embargo, ningún otro estudio ha informado efectos negativos sobre la calidad seminal en presencia de *Streptococcus* spp. Nuevamente en este punto, resaltamos la importancia de realizar estudios de este tipo, para poder dar luz y conocimiento al efecto de algunos microorganismos contaminantes del semen sobre la calidad espermática.

Finalmente, los experimentos realizados con levadura, mostraron una disminución en los parámetros de motilidad total y progresiva en los tratamientos con una concentración de 5000 UFC/mL, luego de los 60 minutos de la contaminación. A diferencia de *E. coli*, en ninguno de estos microorganismos estudiados se observó adhesión ni aglutinación. Además, respecto a levaduras no se encontraron reportes sobre su efecto en el eyaculado, y para algunos autores, su presencia puede deberse a una contaminación de origen no animal (Bello *et al.* 2013).

Uno de los aspectos fundamentales del ganado vacuno de carne y leche es mantener dentro del rebaño una fuerte eficiencia reproductiva rentable y exitosa (Luecke *et al.* 2022). El uso de tecnologías reproductivas ha revolucionado la industria ganadera en los últimos años. Estas biotecnologías, como la inseminación artificial y la criopreservación de semen, han permitido mejorar la eficiencia y la calidad genética de la producción bovina, por lo que resulta fundamental que la calidad del semen utilizado sea óptima. Hoy en día, la gran mayoría de las inseminaciones a nivel internacional se realizan utilizando semen congelados-descongelados (Vishwanath, 2003). Y aunque los diluyentes para criopreservación favorecen la viabilidad espermática, también pueden permitir el desarrollo de algunos microorganismos saprófitos, especialmente si tienen cierta resistencia a los antibióticos contenidos en los diluyentes seminales (Layek *et al.* 2016). Por lo tanto, es importante considerar la diversidad de agentes involucrados en infecciones reproductivas y la importancia fundamental de los controles y la vigilancia epidemiológica permanente (Campero *et al.* 2000). Si bien el control de la contaminación

de las muestras es actualmente un punto débil y complejo en las metodologías de reproducción, el objetivo de obtener semen estéril es prácticamente inalcanzable, ya que existen múltiples fuentes de contaminación que pueden ser de origen animal y no animal (Thibier y Guérin, 2000; Bello *et al.* 2013). El esperma es un medio ideal para el establecimiento y crecimiento de muchos microorganismos, incluidas bacterias y hongos. En eyaculados analizados por varios autores, *Streptococcus* sp., Levaduras y *Escherichia coli* fueron identificados con mayor frecuencia como patógenos potenciales y contaminantes del semen (Catena y Cabodevila, 1999; Bello *et al.* 2013; Londra, 2021). En este contexto, las normas ISO 9002 y la OMSA recomiendan que debe haber menos de 500 UFC/pajuela (Catena y Cabodevila, 1999). Reseñas anteriores, sugieren que la fertilización se reduce en presencia de bacterias potencialmente patógenas en el semen y esta infección reduce todas las posibilidades de éxito de un programa de inseminación artificial (Pineda y Santander, 2007). Por lo tanto, al utilizar la IA, es importante controlar eficientemente la población de microorganismos en el semen, considerando la evaluación y el control del desarrollo microbiano en toros dadores de semen como un procedimiento de rutina, para asegurar la calidad seminal, prevenir la introducción de enfermedades en animales individuales o rodeos y minimizar los riesgos sanitarios de las hembras inseminadas (Thibier y Guérin, 2000; Maroto Martín *et al.* 2010).

Por consiguiente, con el desarrollo de este trabajo final de grado, se proporciona información sobre los efectos que la presencia de los microorganismos saprófitos, con diferentes características, concentraciones y tiempos de incubación pueden generar sobre la calidad de semen bovino. La información obtenida en este estudio será de importancia tanto para los centros de reproducción, como para los organismos encargados de establecer directrices sobre los niveles mínimos de colonias de bacterias permitidas en semen para inseminación artificial. Además, es esencial comprender la composición del microbioma del semen para determinar con precisión el tipo específico de antibiótico que se debe agregar al diluyente para eliminar y/o controlar las bacterias patógenas, sentando las bases para estudios posteriores que se puedan llevar adelante.

7. CONCLUSIONES

- ✓ La presencia de microorganismos en distintas concentraciones no afecta a variables como el pH y la integridad acrosómica de los espermatozoides.
- ✓ La presencia de microorganismos en el semen bovino fresco no genera alteraciones en la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática de manera dosis y tiempo dependientes.
- ✓ La presencia de *E. coli* genera efectos negativos en los parámetros cinéticos de motilidad y vigor espermático de forma dosis y tiempo dependientes.
- ✓ La presencia de *Streptococcus* spp. genera efectos negativos en los parámetros cinéticos de motilidad y vigor espermático de forma dosis y tiempo dependientes.
- ✓ La presencia de levaduras genera efectos negativos en los parámetros cinéticos de motilidad y vigor espermático de forma dosis y tiempo dependientes.
- ✓ Son necesarios más estudios que evalúen que sucede con la fertilidad y capacidad de criopreservación de los espermatozoides bovinos inoculados con microorganismos en diferentes dosis.

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

- Aires, VA; Hinsch, KD; Mueller Schloesser, F; Bogner, K; Mueller Schloesser, S; Hinsch, E. 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*. 60 (2):269-79.
- Allocati, N; Masulli, M; Alexeyev, M.F; Di Ilio, C. 2013. Escherichia coli in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10: 6235-6254.
- Alonso Espadalé, RM; Aubert, AC. 2001. Prevención del riesgo biológico en el laboratorio: trabajo con bacterias (en línea). Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (insst), Madrid, NTP 585. Disponible en: https://www.insst.es/documents/94886/327064/ntp_585.pdf/8b622baa-4fbe-43f4-a796-bc15d2ce0282
- Alós, JI. 2014. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Elsevier . *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 33 (10): 692-699.
- Alqawasmeh, O; Fok, E; Yim, H; Li, T; Chung, J; Chan, D. 2022. The microbiome and male infertility: Looking into the past to move forward. *Human Fertility*. 26: (3) 450-462.
- Althouse, GC; Pierdon, MS; Lu, KG. 2008. Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen. *Theriogenology*. 70 (8):1317-1323.
- Aponte, PM; De Rooij, CG; Bastidas, P. 2005. Testicular development in Brahman bulls. *Theriogenology*. 64(6):1440-1455.
- Arieta Román, RJ; Fernández Figueroa, JA; Menchaca Peña, J. 2014. Métodos de extracción de semen bovino. *Revista Electronica de Veterinaria*. 15(5): 30–37.
- Auroux, MR; 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*. 14:264-270.
- Ávila Portillo, LM; Madero, JI; López, C; León, MF; Acosta, L; Gómez, C; Delgado, LG; Gómez, C. 2006. Fundamentos de criopreservación TT - Basic points in cryopreservation. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291–300.
- Baud, D; Pattaroni, C; Vulliemoz, N; Castella, V; Marsland, BJ; Stojanov, M. 2019. Sperm

- microbiota and its impact on semen parameters. *Frontiers in Microbiology*. 10: 234.
- Bavera, GA. 2005. Inseminación artificial. Cursos de producción bovina de carne. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Bello, VJ; Barragán, GJP; Ramos, DR; Méndez, MM. 2013. Evaluación bacteriológica y micológica del semen de verracos en una posta de alta salud (Vol. 63). Tehuacán, México.
- Bennemann, PE; Pandolfo Bortolozzo, F; Wentz, I; Ribeiro de Itapema Cardoso, M. 2000. Motilidade espermática e integridade acrossomal em doses de sêmen suíno refrigeradas e inoculadas com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. *Ciência Rural*, Santa Maria. 30(2): 313-318.
- Berndston, WE; Desjardins, C. 1974. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. *Am J Anat*. 140(2):167-180.
- Bonet, S; Delgado-Bermúdez, A; Yeste, M; Pinart, E. 2018. Study of boar sperm interaction with *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* in refrigerated semen. *Animal Reproduction Science*. 197:134-144.
- Bustani, GS, Baiee, FH. 2021. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Vet World*. 14(5):1220-1233.
- CABIA (Cámara Argentina de Biotecnología de la Reproducción e Inseminación Artificial). 2022. Movimiento anual de dosis de semen bovino. Año 2022 (en línea, sitio web). Consultado: 2 octubre 2023. Disponible en: <https://cabia.misitiosimple.com/estadisticas>
- Cabrera, F; González, F; Batista, M; Calero, P; Medrano, A; Gracia, A. 2005. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*). *Reprod Domest Anim* 40,191-195.
- Calvo, J; Martínez Martínez, L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Elsevier. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 27(1):44–52.
- Campero, CM. 2000. Las enfermedades reproductivas en los bovinos: ayer y hoy. *Revista de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria de Argentina*. 53(2): 88-112.
- Canet, JJ. 2016. *Escherichia Coli*: características, patogenicidad y prevención (I) (en línea). Betelgeux- Christeyns food higiene. Disponible en: <https://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>.

- Carpio Chuchuca, SV; Garnica, P. 2015. Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen bovino: yema de huevo vs leche descremada. Médico Veterinario Zootecnista. Cuenca. Ecuador. Universidad Politécnica Salesiana. 19-20.
- Castellón, E; Cesari, A; Fornés, MW. (2018). Biología de la Gameta Masculina (1ra ed). Argentina, Mar del Plata: Eudem.
- Catena, MC; 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.
- Catena, MC; Cabodevila, J; Cagnoli, C; Echeverría, HM; Chiapparrone, ML; 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.
- Contreras, MJ; Núñez Montero, K; Bruna, P; Zárate, A; Pezo, F; García, M; Leal, K; Barrientos, L. 2023. Mammals' sperm microbiome: current knowledge, challenges, and perspectives on metagenomics of seminal samples. *Front Microbiol.* 14:1167763.
- Córdova Izquierdo, A; Pérez Gutiérrez, JF; Méndez Hernández, W; Villa Mancera, AE; 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.
- Curbelo, M; Rodríguez, Z. 2013. Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay (Vol. 1). Universidad de la República.
- Datta, U; Bandopadhyay, SK; Hembram, ML. 2014. Structural modification of the black bengal buck (*Capra hircus*) acrosome during post-testicular maturation of spermatozoa. *Int. J. Morphol.* 32(4):1502-1508.
- Del Río, M.J; Godoy, A; Toro, A; Orellana, R; Cortés, M.E; Moreno, R.D; Vigil, P. 2007. La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. *Revista Internacional de Andrología.* (Vol 5, Issue 4) 368-373. Santiago, Chile.
- Díaz Duque, NA; López Castaño, P.A. 2018. Protocolos de criopreservación de semen bovino. Repositorio academico de la Universidad Tecnológica de Pereira.
- Diemer, T; Huwe, P; Michelmann, HW; Mayer, F; Schiefer, HG; Weidner, W. 2000.

- Escherichia coli-induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis. *International journal of andrology*. 23(3):178-186.
- Diemer, T; Weidner, W; Michelmann, HW; Schiefer, HG; 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.
- Eaglesome, MD; Garcia, MM. 1997. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. *Rev Sci Tech*. 16(1):215-225.
- Ferro Moreno, S; Paturllane, J; Mariano, R; Pérez, SA. 2021. EXPORTING PERFORMANCE OF THE BOVINE MEAT IN LA PAMPA (ARGENTINA): 2003-2019. *Estudios económicos*. Vol. XXXVIII (N.S.), 77: 65-81.
- Flores Olivares, CA; Fiorentino, MA; Cano, A; Louge, E; Moreira, AR; Ramírez-Vasquez, RA; Manes, J. 2014: Effects of Escherichia coli isolated from cases of vaginitis on ram sperm quality 2° Simp. Lat. Rep. Anim. 13-14 de noviembre, Santiago, Chile.
- Foot, RH. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. Department of Animal Science, Cornell University, Ithaca, New York. 80(1): 1-10.
- Garner, DL; Hafez, ES. 2000. Espermatozoides y plasma seminal. En: Hafez, B.; Hafez, E.S. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ed. México. Interamericana-McGraw-Hill. 98-112p.
- Gasque Gómez, R. 2008. *Enciclopedia Bovina. Reproducción bovina*. Primera edición. Ciudad Universitaria, Distrito Federal, México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 391p.
- Genovez ME, Scarcelli EP, Facioli MR, Cardoso MV, Teixeira SR, 1999. Avaliação bacteriológica de sêmen in natura industrializado de touros. *Rev Bras Reprod Anim* 23: 403-405.
- Givens MD, Marley MS. 2008. Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. *Theriogenology*. 70(3):504-7.
- Gómez Coronado, CA. 2013. Evaluación de la efectividad de un electroeyaculador experimental comparado a uno de marca comercial en ovinos (Vol. 66). Universidad Central de Ecuador.
- Gray, BM; Stevens, DL. 2009. Streptococcal Infections. *Bacterial Infections of Humans*. 29:743-782.

- Hanan, G. 1989. Anatomía Aplicada del Bovino. San José, Costa Rica. Instituto interamericano de Cooperación para la agricultura (IICA). 226 p.
- Insst (Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo). 2018. Streptococcus spp. (en línea). España. Fichas de agentes biológicos. DB-B-S.spp.-18. Disponible en: <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/bacterias/streptococcus-spp>.
- Jeyendran, RS; Van der Ven, HH; Pérez Peláez, M; Crabo, BG; Zaneveld, LJD. 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*. 70:219-228
- König, HE. y Liebich, HG. 2005. Anatomía de los animales domésticos: órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso. Ed. Médica Panamericana.
- Larson, JL; Miller, DJ. 1999. Simple histochemical stain for acromosomes on sperm from several species. *Mol Reprod Dev*. 52 (4): 445-449.
- Layek, SS; Mohanty, TK; Kumaresan, A; Parks, JE. 2016. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*. 172:1–9.
- Ledesma, A. 2012. Efecto del método de colecta de semen y de plasma seminal sobre la supervivencia posdescongelación de espermatozoides ovinos. Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Londra, TA. 2021. Microbiología del semen bovino: efectos sobre la calidad seminal. Trabajo Final de Grado Licenciatura en Genética. Pergamino, Buenos Aires. Argentina. Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires. 78p.
- Luecke, SM; Webb, EM; Dahlen, CR; Reynolds, LP; Amat, S. 2022. Seminal and vagino-uterine microbiome and their individual and interactive effects on cattle fertility. *Front Microbiol*. 13:1029128.
- Madigan, MT; Martinko JM. y Parker J. 2004. Brock. Biología de los microorganismos, 10ª ed. Madrid, España. Pearson Prentice Hall.
- Maroto Martín, LO; Cruz Muñoz, E; De Cupere, F; Van Driessche, E; Echemendia Blanco, D; Machado Rodríguez, JM; Beeckmans, S. 2010. Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Ciencia de la reproducción animal*. 120 (1a4):95-104.
- Martínez, E; Peraza, N; García, P. (1987). Análisis bacteriológico del semen y fomites.

- Revista Cubana de Reproducción Animal, Vol. 13(No. 1), 81–102.
- Mehta, RH; Sridhar, H; Vijay Kumar, BR; Anand Kumar, TC. 2002. High incidence of oligozoospermia and teratozoospermia in human semen infected with the aerobic bacterium *Streptococcus faecalis*. *Reproductive BioMedicine Online*. 5(1):17-21.
- Monga, M; Roberts, JA. 1994. Spermagglutination by Bacteria: Receptor-Specific Interactions. *Journal of Andrology*, 15(2): 151–156.
- Moore, SG; Hasler, JF. 2017. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *J. Dairy Sci.* 100:10314–10331.
- Morales, LB. 2022. Determinación molecular de agente bacterianos difíciles de cultivar en semen bovino criopreservado de origen comercial. Trabajo Final de Grado Licenciatura en Genética. Pergamino, Buenos Aires. Argentina. Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires. 59p.
- Morales Berrocal, MM; Echavarría-Sánchez, MG; Villeda Gabriel, G. 2017. Microorganismos patógenos productores de alteraciones seminales relacionadas con infertilidad. *Perinatología y Reproducción Humana*, 31(3), 131–143.
- Mortimer D, 1994: *Practical Laboratory Andrology* (Hardcover). New York, Oxford. Oxford University. Press pp 159-174.
- Muñoz, OV. 2011. Fisiología de los espermatozoides bovinos. [En línea]. Consultado: 5 octubre 2023. Disponible en: http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_40.pdf.
- Naranjo Ramírez, JF; Ruiz Buitrago, JD. 2020. Sobre algunos mitos y realidades de la ganadería bovina. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 21(3): e1524.
- Ordóñez, HCO; Tamargo Miguel, C; Diez Monforte, C. 2005. Análisis del semen bovino. *Tecnología Agroalimentaria*. (2):39-43.
- Organización Mundial de la Sanidad Animal (OMSA). 2023. Código Sanitario para los Animales Terrestre: Prevención y control de las enfermedades. 90.^a Sesión General. París, Francia. Disponible en: www.woah.org
- Palmer, CW. 2005. Welfare aspects of theriogenology: Investigating alternatives to electroejaculation of bulls. Department of Large Animal Clinical Sciences, University of Saskatchewan, Canada. *Theriogenology*. 64(3): 469-479.
- Paolilli, MC; Cabrini, SM; Pagliaricci, LO; Fillat, FA; Bitar, MV. 2019. Estructura de la carne

- bovina. Argentina. Producción Argentina. 10(40):51-56.
- Pineda, Y; Santander, J. 2007. Evaluación de la flora bacteriana del semen de verracos en granjas porcinas de Venezuela. *Zootecnia Tropical*. 25(3):173-177.
- Poole, RK; Soffa, DR; McAnally, BE; Smith, MS; Hickman-Brown, KJ; Stockland, EL. 2023. Reproductive Microbiomes in Domestic Livestock: Insights Utilizing 16S rRNA Gene Amplicon Community Sequencing. *Animals*.13 (3):485.
- Puerta Suárez, J; Villegas Castaño, A; Serna Quintana, GJ; Martínez, A; Romero Palacio, J; Giraldo, M; Cadavid, A; Cardona Maya, W. 2015. Espermocultivo: crecimiento bacteriano del eyaculado y su relación con los parámetros seminales. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 80(1):33-40.
- Ribeiro Peres, A; Munita Barbosa, L; Yumi Kanazawa, M; Mello Martins, MI; Ferreira de Souza, F. 2014. Cryopreservation of bovine spermatozoa from the epididymal tail using conventional and automated methods. *Arch Med Vet* 46 (1):31-38.
- 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.
- 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, M; Vallejo, A; Batista, P; Espasandin, AC. 2011. Biotecnologías reproductivas aplicadas a la mejora genética animal. *Cangüe Digital*. 31: 44-50.
- SAS. 2023. SAS: Analítica, Inteligencia Artificial y Gestión de Datos. SAS Institute Inc. Disponible en: <https://www.sas.com> › es_ar
- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGP). 2022. Informe cierre Stock Bovino 31-12-2022 (en línea). Disponible en: https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/bovinos/informacion_interes/informes/index.php
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2008. Programa de Control y Erradicación de las Enfermedades venéreas en Bovinos de la Provincia de La Pampa (Resolución 358/2008). Disponible en <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/140000->

144999/141098/norma.htm

- Siever Morales, C; Próspero Cabrera, V; Pantoja, CA; García, DI; Solís, N. 2013. Evaluación de Carga Bacteriana en Pajillas de Semen. *Científica*. 10: 28-36.
- Stornelli, MC; Tittarelli, CM; Savignone, CA; Stornelli, MA. 2005. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta veterinaria*. 25 (2): 28-35.
- Thibier, M. 1990. New biotechnologies in cattle reproduction. 7th Congress of the Federation of Asian Veterinary Associations (FAVA). Royal Thai Veterinary Medical Association. Bangkok. Thailand. Chulalongkorn Univ. 512-524
- Thibier, M. 2005. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reprod Nutr Dev*. 45(3):235-42.
- Thibier, M; Guérin, B. 2000. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 62: 233–251.
- Thibier, M; Wagner, HG. 2002. World statistics for artificial insemination in cattle. *Livest Prod. Sci*. 74:203-212.
- Vaid, RK; Arangasamy, A; Talluri, T; Ravi, S; Bera, BC; Anand, T; Riyesh, T; Virmani, N; Malik, P; Singh, RK. 2012. Microbial quality of fresh and frozen equine semen of indian horses. *Veterinary Practitioner*, 13(2): 336–339.
- Velásquez Rivera, V; Puerta Suárez, J; Cardona Maya, WD. 2018. Seminal plasma from vasectomized men as a means of disseminating bacteria. *Rev Cubana Obstet Ginecol*. 44 (1): 1561-3062.
- Villarreal, J; Cabrera, H; Andara, Y; Vielma, J. 2021. La inseminación artificial en bovinos como estrategia de enseñanza a los estudiantes de la Etern Mesa Cerrada, Timotes, Estado Mérida. 10: 1–22.
- Vishwanath, R. 2003. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology* 59, 571–584.
- Vishwanath, R; Shannon, P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci*. 62 (1-3):23-53.
- 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.