FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA ANIMAL

CACERES, 2017/ 2018

ESTUDIO DE NUEVOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN SEMINAL EN EL VERRACO

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Mª TERESA GÓMEZ- CORONADO CASTILLO

TUTOR ACADÉMICO: DR. LUIS J. GARCÍA MARÍN

COTUTOR: DR. ÁNGEL T. ROBINA BLANCO-MORALES

AGRADECIMIENTOS:

Último trabajo con el cual cierro mi etapa universitaria. Etapa que con ilusión y muchas dudas comencé en el año 2013 y que por una parte con alegría y por otra con pena, ahora doy por terminada.

En el presente trabajo, no podía faltar un apartado en el que agradecer a todas aquellas personas que me han acompañado en este camino, por su esfuerzo y paciencia. A todas ellas darles las gracias. Si es cierto que hay personas a las que no puedo dejar de nombrar.

En primer lugar agradecer a mis tutores. Luis, agradecerte el haberme dado la oportunidad de trabajar juntos, por tener paciencia y a pesar de mi falta de conocimiento en muchos aspectos, haber sabido guiarme y orientarme. A Ángel, uno de los primeros profesores que conocí en la universidad, y que ha estado acompañándome en todo el trayecto. Gracias por la confianza depositada en mí, por introducirme en Tecnogenext S.L., empresa de la cual me llevo una grata experiencia. Gracias al grupo SINTREP por permitirme trabajar su laboratorio.

En segundo lugar he de nombrar a mi familia, padres y hermanos. Gracias a ellos, a sus valores y enseñanzas, he conseguido finalizar mi etapa universitaria con existo. Gracias a vosotros por confiar en mí en momentos en el que ni yo misma lo hacía y por darme miles de oportunidades y vuestro apoyo incondicional siempre, sin el cual nada sería posible. Gracias por enseñarme lo bonito y difícil que es la vida y por llevarme siempre por un camino de realidad. Dedicar una mención especial a mi tío, Miguel, porque por tu amor hacia una de las aficiones más bonitas que hay, descubrí el mundo de los animales y elegí esta carrera que compartimos hoy.

A mis amigos, con vosotros he vivido momento de risas, llantos y agobios, y siempre habéis sabido cómo seguirme en todos ellos. Unos en distancia y otras cercas, siempre habéis sabido escuchar y darme fuerza para seguir. Entre estas personas debo mencionar a Pilar, Pili para mí, gracias porque sin ti esta increíble carrera que hemos elegido no hubiera sido lo mismo. Nunca olvidare tu respuesta cuando te enteraste que íbamos a estudiar juntas, gracias por darme esa dosis de realidad que a veces hace falta. Gracias también a Fran, una de las personas, mejor ha sabido entenderme y apoyarme en este camino, gracias por recogerme cada vez que me caía y por compartir también mis alegrías.

Por último quiero dedicar este trabajo a mis abuelos, que siempre nos han acompañado y consentido. Pero en especial a mi abuelo Pedro, a tu manera creíste en que podría llegar a ser una buena veterinaria y sé que desde donde estés, llegarás a verme vacunando a nuestras ovejas, como siempre me decías.

ÍNDICE:

1. RESUMEN 1

2. SUMMARY 2

3. INTRODUCCIÓN 3

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 4

4.1. ESTRUCTURA FUNCIONAL DEL ESPERMATOZOIDE: 4

4.1.1. La cabeza del espermatozoide 4

4.1.2. Pieza intermedia o cuello 5

4.1.3. Flagelo 5

4.2. ESTUDIOS DE LOS PARÁMETROS INDICATIVOS DE CALIDAD SEMINAL EN PORCINO 6

4.2.1. Volumen 6

4.2.2. pH 6

4.2.3. Motilidad espermática 7

4.2.4. Concentración espermática 7

4.2.5. Morfología 7

4.3. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN PORCINO. 10

4.3.1. Historia de la inseminación artificial 10

4.3.2. Situación actual de la inseminación artificial 11

4.3.3. Ventajas e inconvenientes de la inseminación artificial 12

4.3.4. Técnica de inseminación artificial en porcino 13

4.3.5. Conservación seminal en porcino 15

4.3.6. Características de los tipos de diluyentes usados en la realización de dosis seminales 17

4.3.7. Uso de los antibióticos en los diluyentes. 19

4.3.8. Otros antimicrobianos como alternativa al uso de antibióticos 20

4.3.9. Otras aproximaciones como alternativa al uso de antibióticos 22

5. OBJETIVOS:.....23

6. MATERIAL Y MÉTODOS 24

6.1. SOLUCIONES UTILIZADAS 24

6.2. RECOLECCIÓN DE LOS EYACULADOS.....24

6.3. ELABORACIÓN DE LAS DOSIS SEMINALES. 26

6.4. PROTOCOLO DE TRABAJO.....27

6.5. VALORACIÓN DE LA MOTILIDAD 28

6.6. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO 32

6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 36

6.8. CULTIVO BACTERIANO 38

7. RESULTADOS: 39

7.1. EFECTO DEL TIEMPO DE CONSERVACIÓN EN LA MOTILIDAD OBJETIVA DE DOSIS SEMINALES DE VERRACO 39

7.2. EFECTO COMPARATIVO DE LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN Y DE LA AUSENCIA DE ANTIBIÓTICOS EN LA MOTILIDAD OBJETIVA DE DOSIS SEMINALES DEL VERRACO 42

7.2.1. Efecto de la temperatura de conservación y de la ausencia de antibióticos en la motilidad y progresividad de los espermatozoides en dosis seminales de verraco 42

7.2.2. Efecto de la temperatura de conservación y de la ausencia de antibióticos en la velocidad de los espermatozoides en dosis seminales de verraco.....44

7.2.3. Efecto de la temperatura de conservación y de la ausencia de antibióticos en diferentes índices de motilidad de los espermatozoides en dosis seminales de verraco 45

7.3. EFECTO DEL TIEMPO DE CONSERVACIÓN EN LA FUNCIONABILIDAD DE DOSIS SEMINALES DE VERRACO: 48

7.4. EFECTO COMPARATIVO DE LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN Y DE LA AUSENCIA DE ANTIBIOTICOS EN LA FUNCIONALIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES DE DOSIS SEMINALES DE VERRACO 49

7.5. EFECTO DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE ANTIBIÓTICOS EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO EN DOSIS SEMINALES DE VERRACO REFRIGERADAS .. 51

8. DISCUSIÓN Y NUEVAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN: 53

9. CONCLUSIONES: 56

10. BIBLIOGRAFÍA: 57

11. OTROS ÍNDICES 61

1. RESUMEN

La inseminación artificial es una técnica utilizada desde 1930 en la producción porcina; sin embargo, no es hasta 1980 cuando presenta un desarrollo importante. En un protocolo de IA óptimo, con unos altos índices de fertilidad y prolificidad, uno de los factores fundamentales a tener en cuenta es la calidad de las dosis seminales utilizadas. En el caso del ganado porcino se han obtenido resultados excelentes en la IA utilizando dosis seminales refrigeradas a 17ºC y diluidas en diluyentes con diferentes componentes que mejoran su eficacia, incluida la adición de antibióticos para evitar la contaminación bacteriana. Sin embargo, el excesivo uso de antibióticos ha potenciado el desarrollo de cepas de bacterias resistentes ligadas a la IA. Teniendo en cuenta el efecto negativo que puede tener la adición de antibióticos, nuestra hipótesis de trabajo propone que la conservación de las dosis seminales de verraco a 5ºC puede permitir la eliminación de los antibióticos, lo que evitaría la aparición de bacterias multi-resistentes en las explotaciones porcinas donde se realiza de forma rutinaria la IA. En concreto, hemos planteado dos objetivos: 1) Estudiar si la conservación de las dosis seminales de verraco a 5ºC en un diluyente sin antibióticos inhibe el crecimiento bacteriano y 2) Estudiar los efectos de la conservación de las dosis seminales de verraco a 5ºC en la motilidad y en la función de los espermatozoides de esta especie. Para la consecución de estos objetivos se establecieron tres grupos experimentales: 1) dosis seminales de verraco refrigeradas a 17ºC, 2) dosis seminales de verraco refrigeradas a 5ºC en presencia de antibióticos y 3) dosis seminales de verraco refrigeradas a 5ºC en ausencia de antibióticos. El estado funcional de los espermatozoides se determinó a diferentes tiempos de conservación (48h y 96h) por medio del estudio de la motilidad, con un sistema ISASvl®, de la estabilidad de las membranas plasmática y acrosomal, por citometría de flujo.

Nuestros resultados muestran que la conservación de las dosis seminales de verraco, refrigeradas a 5ºC inhibe el crecimiento bacteriano a los diferentes tiempos analizados. Por otra parte la refrigeración a 5ºC produjo una disminución estadísticamente significativa en la mayoría de los parámetros de motilidad analizados, con una reducción significativa de más del 60% en el porcentaje de espermatozoides motiles. Esta reducción en la motilidad estuvo ligada a una disminución significativa en la viabilidad, aproximadamente de un 50%, y un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de espermatozoides con la membrana acrosomal dañada. Nuestros resultados muestran la eficacia en la inhibición del crecimiento bacteriano de la refrigeración a 5ºC de dosis seminales de verraco; sin embargo, el método utilizado tiene un claro efecto inhibidor, tanto en la motilidad como en la función de los espermatozoides de verraco refrigerados y conservados a 5ºC. Los resultados indican la prioridad de trabajar en la optimización del proceso de enfriado de las dosis seminales a 5ºC para evitar el efecto negativo observado.

Palabras claves: inseminación artificial; espermatozoide; verraco; antibióticos; refrigeración, 5ºC.

2. SUMMARY

Artificial insemination is a technique since 1930 in swine production; however, it is not until 1980 that it presents an important development. In an optimal AI protocol, with high rates of fertility and prolificacy, one of the fundamental factors to be taken into account is the quality of the seminal doses used. In the case of pigs, excellent results were obtained in AI using seminal doses refrigerated at 17ºC and diluted in diluents with components that improve their efficacy, including the sale of antibiotics to avoid bacterial contamination. However, the excessive use of antibiotics has enhanced the development of strains of resistant bacteria linked to AI. Taking into account the negative effect that the addition of antibiotics can have, our working hypothesis offers the conservation of seminal doses of boar at 5ºC can allow the elimination of antibiotics, which avoids the appearance of multi-resistant bacteria on farms swine where AI is routinely performed. Specifically, we have proposed two objectives: 1) Study whether the preservation of seminal doses of boar at 5ºC in a diluent without antibiotics inhibit bacterial growth and 2) Study the effects of conservation of boar semen doses at 5ºC in the motility and in the function of the sperm of this species. To achieve these objectives three experimental groups were established: 1) boar severe doses refrigerated at 17ºC, 2) seminal boar doses refrigerated at 5ºC in the presence of antibiotics and 3) seminal boar doses refrigerated at 5ºC in the absence of antibiotics. The functional status of the spermatozoa was determined through storage times (48h and 96h) by means of the study of the motility, with an ISASvl® system, of the measurement of the plasma and acrosome membranes, by flow cytometry.

Our results show that the conservation of seminal boar doses, refrigerated at 5ºC, inhibits bacterial growth at the different times analyzed. On the other hand, refrigeration at 5ºC produced a statistically significant decrease in most of the motility parameters analyzed, with a significant reduction of more than 60% in the percentage of motile sperm. This reduction in motility was linked to a significant decrease in viability, approximately 50%, and a statistically significant increase in the percentage of sperm with the damaged acrosomal membrane. They also show the efficacy in the inhibition of the bacterial growth of the refrigeration at 5ºC of seminal doses of boar; however, the method used shows a clear inhibitory effect, both on motility and on the function of boar sperm refrigerated and conserved at 5ºC. The results indicate the priority of working in the optimization of the cooling process of the seminal doses at 5ºC to avoid the observed negative effect.

Keywords: artificial insemination; spermatozoon; boar; antibiotics; refrigeration, 5ºC.

3. INTRODUCCIÓN

La producción porcina posee una gran importancia dentro de la alimentación humana ya que representa el 40 % del consumo mundial de carne. En la actualidad, España es uno de los principales productores y exportadores de porcino a nivel mundial. Cada vez el sector porcino se encuentra más industrializado, pasando de pequeñas granjas a grandes naves de producción (Iguácel Soteras y Espada Domingo, 2012). La introducción de la inseminación artificial (AI) en el campo de la producción animal ha resultado ser un punto clave en el desarrollo del sector porcino.

En la actualidad, el 99% de las inseminaciones en porcino se realizan con dosis seminales refrigeradas, conservadas a temperaturas de entre 15 y 17ºC (Condoy, 2017). Hay diferentes factores que intervienen en que el espermatozoide del verraco sea funcional cuando se mantiene en refrigeración, como es el tiempo de conservación transcurrido hasta la inseminación de la hembra, los diluyentes utilizados, la temperatura de conservación y la calidad del propio semen (Watson, 1996). Los diluyentes, en concreto, son formulados con una serie de componentes que otorgan a los espermatozoides un medio que permite su conservación, cubriendo sus necesidades metabólicas durante un periodo de tiempo variable en función de si se tratan de diluyentes de corto o largo plazo (Condoy, 2017).

Un componente presente en todos los diluyentes disponibles en el mercado son los antibióticos, generalmente de amplio espectro, que reducen la carga microbiana presente en las dosis seminales, a consecuencia de la contaminación del propio eyaculado, evitan la proliferación bacteriana y aumentan la vida útil de las dosis seminales porcinas que, no olvidemos, se conservan a 17ºC, temperatura que permite la proliferación bacteriana. El uso de antibióticos de forma generalizada ha provocado la aparición de resistencia bacteriana en las hembras que son inseminadas repetidas veces, dificultando la lucha contra patógenos bacterianos en caso de sufrir algún proceso infeccioso (Schulze y col., 2015).

En la actualidad existen diferentes líneas de trabajo con el objetivo común de eliminar la presencia de antibióticos en las dosis seminales de verraco, con el fin de evitar la aparición de patógenos multiresistentes. De esta forma, la hipótesis de trabajo de nuestro TFG ha sido que, la conservación de las dosis seminales de verraco a una temperatura de 5ºC, podría evitar la proliferación bacteriana sin la necesidad del uso de antibióticos en los diluyentes. Debemos tener en cuenta que los espermatozoides de verraco son sensible al shock térmico (Watson, 1996) por lo que un primer paso es determinar el efecto que tiene el enfriamiento a 5ºC en la calidad y funcionalidad de los espermatozoides de verraco.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. ESTRUCTURA FUNCIONAL DEL ESPERMATOZOIDE:

La funcionabilidad del espermatozoide porcino (Figura 4.1), se ve influida por su morfología. El espermatozoide puede ser dividido en tres partes fundamentales, cabeza, parte media y cola.

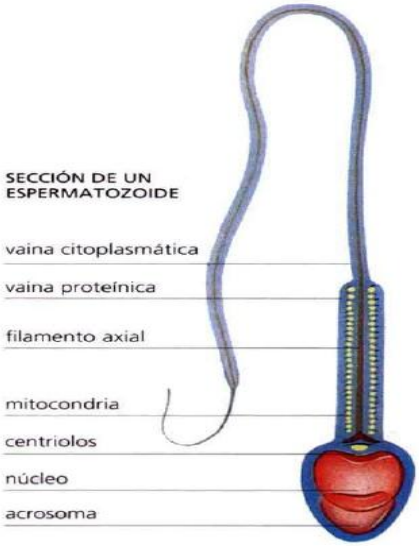


Figura 4.1. Representación de la anatomía del espermatozoide. Fuente: *(*https://es.slideshare.net/Jnatalia92/gentica-y-medio-ambiente-espermatognesis-y-el-espermatozoide*).*

4.1.1. La cabeza del espermatozoide

La cabeza de los espermatozoides presenta formas, diferentes en función de la especie animal. En el caso del porcino, posee una forma oval. En ella se encuentra el núcleo oval, donde podemos encontrar la cromatina condensada, compacta, con el ADN haploide que será trasmitido a la descendencia y una serie de proteínas específicas, llamadas protaminas (Gonzalez Villalobos, 2008).

El núcleo espermático, está cubierto prácticamente en su totalidad por el acrosoma. El acrosoma es una vesícula intracelular membranosa y aplanada que recubre la parte anterior del núcleo, variando considerablemente su tamaño y forma entre diferentes especies. Es producido por el aparato de Golgi durante la espermatogénesis. Posee encimas hidrolíticas, como la acrosina, que participan activamente en el proceso de la fecundación. La membrana acrosómica externa, se encuentra por debajo de la membrana plasmática, mientras que la membrana acrosómica interna, se encuentra por encima de una membrana nuclear (Ramírez C, 2010). La reactividad de la membrana acrosómica, representa un requisito absoluto para la fertilidad, por un lado la liberación de enzimas acrosómicas es necesario para digerir y atravesar la zona pelúcida y, por otro lado, el segmento ecuatorial es de vital importancia ya que es en este lugar, junto con el segmento anterior de la región postacrosómica, donde se produce la fusión con la

membrana del ovocito (Gonzalez Villalobos, 2008). Solo aquellos espermatozoides que hayan generado una correcta reacción acrosómica en el momento adecuado, podrán pasar la membrana pelúcida y fusionarse con el ovocito formando el embrión (Januskauskas y col., 2000).

4.1.2. Pieza intermedia o cuello

Se trata de una zona de unión entre la cabeza y la cola o flagelo. Las partes principales del cuello son el capítulo, las columnas estriadas y la placa basal o anillo posterior. Todo se encuentra en alineación con el centriolo, del cual saldrán las fibras y microtúbulos que originan la cola, y servirá como centro organizativo en la formación del axonema y las columnas estriadas. Cabe destacar que la presencia del centriolo no es necesario para la propagación y multiplicación del movimiento ondulatorio (Lindemann y Kanous, 1989).

4.1.3. Flagelo

El flagelo espermático o cola está formado por la porción intermedia, la pieza principal y la pieza terminal o segmento.

El axonema (Figura 4.2) es una estructura común a todas las partes de la cola o flagelo espermático, el cual funciona como aparato locomotor del mismo. Se encuentra formado por nueve pares o dobletes de microtúbulos, espaciados uniformemente, y unidos a una base central formada por dos microtúbulos más. Estos dobletes, a su vez, están rodeados de nueve fibras densas (Gagnon, 1995; Mortimer, 2000). En el interior de los dobletes, el microtúbulo más interno, proyecta dos brazos de dineína hacia el doblete contiguo, uno más externo y otro más interno. Del mismo modo genera una serie de proyecciones radicales hacia el par central de microtúbulos. Los nueve pares se conectan a través de puentes de nexina. En torno a de los dos microtúbulos centrales, el flagelo posee una vaina o fragmento helicoidal formado a partir de las proyecciones radicales (Gibbons, 1960).

El movimiento flagelar, se produce gracias al deslizamiento de los 9 pares de micro túbulos, y este desplazamiento se genera gracias al movimiento producido por los brazos de dineína que conectan un doblete con el siguiente. Cuando se produce un fallo en la formación de estos puentes de unión se produce un descenso de la motilidad espermática (Gagnon, 1995).

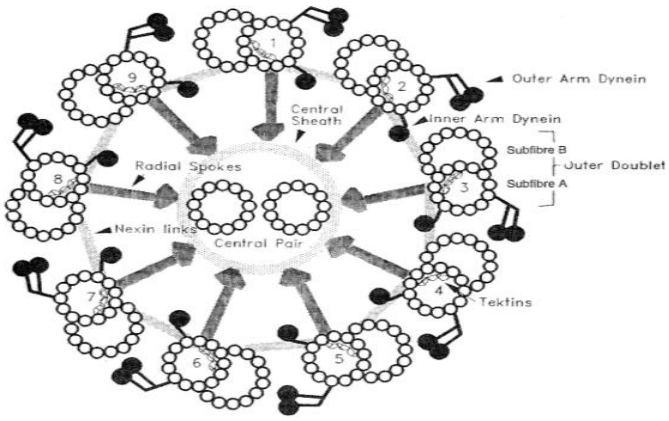


Figura 4.2. Esquema explicativo de la estructura del axonema flagelar. Fuente: (Gagnon, 1995).

4.2. ESTUDIOS DE LOS PARÁMETROS INDICATIVOS DE CALIDAD SEMINAL EN PORCINO.

Antes de comenzar a hablar de calidad seminal, vamos a mencionar el concepto de capacidad fecundante. La capacidad fecundante es considerada la habilidad que tienen los espermatozoides para fecundar un ovocito, el cual es considerado fisiológicamente normal y estructuralmente intacto. Para que este fenómeno se produzca, tienen que darse una serie de sucesos, que hagan que el espermatozoide adquiera las características adecuadas para poder fecundar. Estas fases son, hiperactivación, unión con la zona pelúcida, unión con la membrana plasmática del ovocito y fusión con dicha membrana (Gadea, 2001).

En cuanto a la calidad seminal, podemos definirla como el conjunto de parámetros que caracterizan la viabilidad del espermatozoide. En un inicio, se hacía referencia a los caracteres de morfología y movimiento, pero con posterioridad se han ido añadiendo otros parámetros cuyo objetivo es mejorar el análisis de la funcionabilidad espermática; así como, evaluar la contaminación microbiana del mismo (Gadea, 2001).

4.2.1. Volumen

El volumen medio del eyaculado de un verraco es de unos 250 ml, pudiendo oscilar entre 50-400ml. Esta variación podemos explicarla por el tamaño de las glándulas seminales y bulbouretrales, así como el grado de estimulación que el animal haya alcanzado antes de la colecta. También puede verse afectado por todos aquellos factores que tengan influencia sobre el verraco y que, de manera directa o indirecta, influyan en la producción espermática (edad, nutrición, momento de la recolecta…) (Frunza y col., 2008).

4.2.2. pH

Los cambios en el pH afectan a la viabilidad seminal y a la motilidad. La acidez o alcalinidad del pH, se ve influenciada por los niveles de secreción de las glándulas sexuales accesorias. El pH del semen porcino es de un valor en torno a 7.69, con variaciones de 0.33 (King y Macpherson, 1966).

Cuando el pH del esperma se encuentra en niveles superiores a 8, el eyaculado es de baja calidad o bien se estaba produciendo un proceso infeccioso en el momento de la extracción, bien en el tracto genital o bien en las glándulas accesorias. Además debemos tener en cuenta que el pH puede sufrir variaciones entre verracos.

La diferencia radica en que en el interior del epidídimo, el pH se encuentra en valores de 6.10, pudiendo oscilar entre 5.57 y 6.9, este medio ácido y la anaerobiosis mantiene a los espermatozoides inmóviles. Las glándulas accesorias, aumentan o disminuyen su secreción en función de los niveles de eyaculado, además de determinar los niveles de alcalinidad o acidez.

Por último destacar que los cambios en el pH influyen negativamente en la viabilidad y motilidad espermática (Frunza y col., 2008).

4.2.3. Motilidad espermática

Como parámetro de calidad seminal, es definida como el porcentaje de espermatozoides móviles y con movimiento progresivo que contiene el eyaculado. Es una de las características más significativas de capacidad fecundante in vivo de una muestra de semen y se correlaciona positivamente con la fertilidad (Tardif y col., 1999).

La motilidad, depende en cierto modo, de los fluidos seminales y la secreción prostática. Los fluidos seminales, producen una pérdida de la motilidad espermática, mientras que la secreción prostática, posee factores que estimulan la motilidad y al entrar en contacto con el espermatozoide lo protegen de los efectos negativos de las secreciones vesiculares (Mortimer, 1997).

El movimiento normal de los espermatozoides es rectilíneo, realizando rápidos movimientos de la cola. En algunas ocasiones, los espermatozoides sufren algún proceso por el cual alteran su movimiento, (en círculos, vibraciones, hacia atrás…). Consideramos que un eyaculado es de alta fertilidad cuando posee un 80% mínimo de espermatozoides motiles progresivos. Además debemos tener en cuenta la velocidad con la que realizan el movimiento, la cual puede variar por múltiples factores, como los cambios en la temperatura (Frunza y col. , 2008).

4.2.4. Concentración espermática

Cuando hablamos de concentración espermática, nos referimos al número de espermatozoides por ml de eyaculado.

En el caso del verraco, podemos decir que se caracteriza por presentar concentraciones espermática relativamente bajas, en torno a 500.000 spz/mm^3 de semen. La concentración nos indica la capacidad productora de gametos en los túbulos seminíferos, y además aunque no tiene relación directa con la fertilidad, influye en el número de dosis procesables a partir de un eyaculado (Tardif y col., 1999).

4.2.5. Morfología

El estudio de la morfología espermática no muestra relación directa con la fertilidad espermática, pero si es indicador de baja calidad espermática, permitiendo descartar a estos animales como reproductores. En muchas ocasiones los espermatozoides presentan formas anormales de la cabeza, zona intermedia o cola, y esto afectara a la capacidad fecundante que posea. La morfología debe estudiarse en un número de espermatozoides que sea lo suficientemente elevado para ser representativo de ese eyaculado.

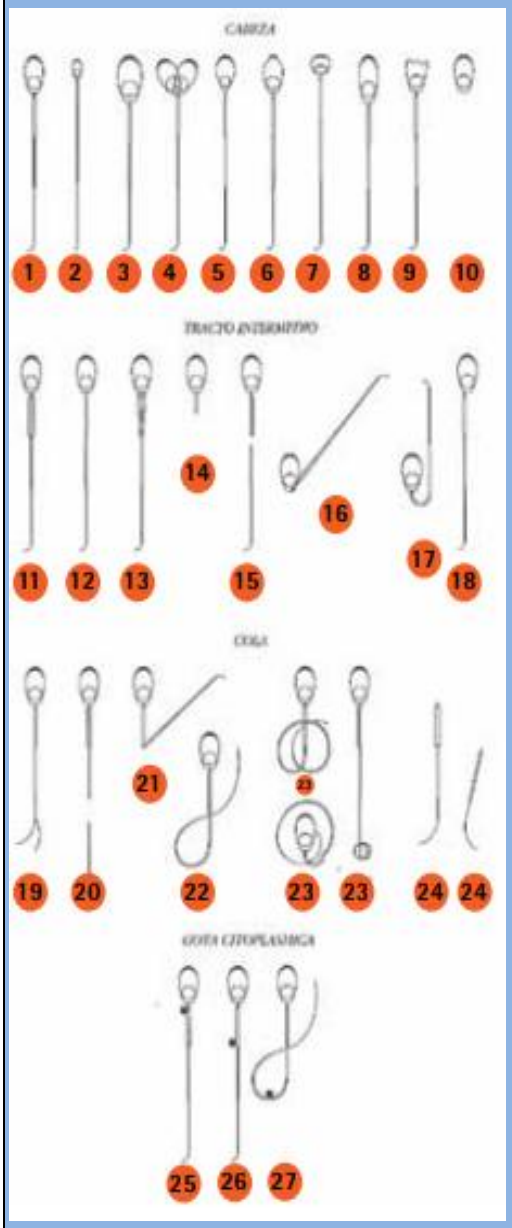
Al estudiarla, podemos encontrarnos células epiteliales descamadas, las cuales son un hallazgo común y de poca importancia, pero si encontramos un aumento de células espermatogénicas e inflamatorias, pueden ser indicativas de que el animal está sufriendo algún proceso patológico, el cual tenemos que vigilar.

La evaluación final de la morfología espermática, debe de realizarse en conjunto con el resto de datos cuantitativos (volumen, concentración…) así como con los datos de calidad espermática, entre los que se encuentra la propia morfología (Rodríguez Martínez, 2008).

Tabla 4.1. Representación del porcentaje de anormalidades típicas del eyaculado porcino. Fuente: (Rodríguez Martínez, 2008)

PARÁMETRO	RANGO
Volumen de eyaculado	100-300 ml
Número total de espermatozoides	10-100 x 10^9
Motilidad progresiva	70-90 %
Anormalidades de la cabeza	2-5%
Gotas citoplasmáticas proximales	1-5%
Defectos del acrosoma	1-2%
Anormalidades de la pieza media	2-5%
Colas dobladas simples	1-5%
No puede haber ni contaminación con sangre ni presencia de células inflamatorias	

Tabla 4.2. Representación de los tipos de anormalidades que pueden presentar los espermatozoides porcinos. Fuente: (Kubus S.A, 2010)



Anormalidades de la cabeza	
1. Normal	2. Microcabeza
3. Macrocabeza	4. Doble
5. Piriforme	6. Afilada
7. Achatada	8. Alargada
9. Desintegrada	10. Suelta
Anormalidades de la pieza intermedia	
11. Engrosado	12. Filiforme
13. Doble	14. Partido
15. Desprendido	16. Flexionado
17.Retorcido	18. Excéntrico
Anormalidades de la cola	
19. Doble 20. Partida 21. Flexionada 22. En látigo 23. en ovillo 24. Suelta	
Gota citoplasmática	
25. Proximal 26. Distal 27. Distal y cola látigo	

4.3. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN PORCINO.

La inseminación artificial (IA) es un punto clave dentro de la producción animal en general, pero muy importante en la producción porcina actual. Para que el proceso sea eficaz, debemos conocer la relación exacta entre la calidad seminal y la fertilidad, la cual no solo depende de la cerda, sino de muchos parámetros dependientes del verraco, de tal manera que cuanto más controlemos dichos parámetros, mayor eficacia tendremos en el proceso.

Es una técnica que consiste en la introducción manual del semen en el interior del aparato reproductor de la hembra, haciendo uso de diferentes métodos y utensilios, sin necesidad de usar un macho que la monte. Esta técnica permite la obtención de mayor descendencia con el uso de un único verraco de buenas características genéticas, así como la expansión de dichas características.

4.3.1. Historia de la inseminación artificial

La IA ha sufrido un gran proceso evolutivo desde sus orígenes hasta la actualidad.

La primera referencia con la que contamos sobre IA es del año 1400. Se tratan de unos documentos escritos sobre un jefe árabe que inseminaba sus propias yeguas con el semen de animales pertenecientes a grupos rivales. Más tarde en 1678 Leeuwenhoek, fue el primero en estudiar los gametos masculinos. Spallanzani en el año 1784, consiguió inseminar a una perra, la cual pario tres cachorros. En el hombre no fue hasta 1800 cuando se intentó la primera IA por Hunter. Heape en 1897 comienza a realizar estudios con conejos perros y caballos y a finales del siglo XIX Ivanov trabaja con células espermáticas e IA, siendo sus trabajos considerados pioneros en este campo.

Desde estos momentos, la investigación en este campo ha sido ingente, sucediéndose múltiples proyectos, como el que realizo en 1964 Milavanov, quien diseño los primeros planes de inseminación artificial para explotaciones ovinas así como el diseño de las primeras vaginas artificiales, similares a las que encontramos en la actualidad (Broekhuijse y col., 2012).

En 1912, Ishukawa, comienza a realizar IA con caballos. El verdadero crecimiento de la IA ocurrió en el año 1940, en los Estados Unidos, y desde este momento los procedimientos se extendieron por todo el mundo (Broekhuijse y col.,2012).

En el caso del porcino, los primeros avances significativos tuvieron lugar en Japón, Estados Unidos y Europa Occidental. Los verracos eran entrenados con maniquíes y se les extraía el semen por medio de vaginas artificiales, que permitían aplicar la presión adecuada, o por medio del denominado método de la mano enguantada, que permitía disminuir la contaminación bacteriana. La conservación seminal para el envío de dosis, también se inició en los Estados Unidos, donde se desarrolló un método que permitía almacenar el semen durante largos periodos, así como la realización de la IA en el campo. Este método se basaba en el uso de yema de huevo y fosfato, que mantenía la viabilidad de los espermatozoides. Philips y Lardy en 1940, fueron los primeros en recomendar una temperatura de conservación de 15-20 ºC. Con estos avances la demanda de dosis seminales empieza a crecer.

En Europa el uso de la IA artificial en el porcino, fue promocionada por el Ministerio de Agricultura holandés, intentando sobre todo prevenir el traspaso de enfermedades contagiosas. De esta forma, criadores y compañías de IA comienza a trabajar de forma conjunta, con el fin de conseguir verracos con altos índices genéticos.

Entre los años 1980-1990, el desarrollo de la inseminación artificial en el porcino, fue considerable, ya que se empezó a tener más conocimiento sobre el ciclo estral de la cerda, la sincronización en el momento de la inseminación y las diluciones del eyaculado del verraco. Además comenzó la especialización de personas en este campo y su implementación en la práctica laboral (Broekhuijse y col., 2012).

4.3.2. Situación actual de la inseminación artificial

Desde la introducción de la IA en el sector porcino, la implantación de la misma en el sector ha ido en crecimiento. En el caso de Europa, en torno al 90 % de las hembras, son cubiertas por medio de la IA. Este aumento, se debe, fundamentalmente, al avance tecnológico, y al aumento de la demanda de carne de cerdo de alta calidad, así como a la mejora del sistema de transporte de las dosis seminales, de unos puntos a otros del planeta, permitiendo así el comercio internacional de las mismas (Johnson y col. , 2000b).

La IA en la actualidad se encuentra implementada por todo el mundo, aunque su uso es diferente en función del país. Actualmente se realizan en torno a 19 millones de inseminaciones artificiales en el mundo, y casi todas con semen refrigerado (Julca Salvador, 2015). En el caso de España, la IA no creció mucho en las décadas de los 70-80, aunque sí que ha sufrido un importante incremento en los últimos años gracias a los avances técnicos y a la creación de centros de IA.

A lo largo del tiempo, se han obtenido diferentes resultados en prolificidad y fertilidad, que varían a favor o en contra de la IA, en función del momento del estudio. Se sabe que los resultados, fruto de la combinación de la IA con la monta natural (MN), son mejores que los de ambas técnicas por separado. En el año 1993 el 75.6 % de la cabaña ganadera de España fue inseminada de forma artificial. Una mayoría de las hembras cubiertas, lo hicieron con dosis seminales de ganaderías que contaban con su propio centro de inseminación. Las dosis restantes, se produjeron en centros de IA independientes a las ganaderías, que contaban con más de 20 verracos (Martín Rillo y col. , 1994).

Actualmente hay una serie de normativas que regulan el uso de la IA y que se inician con el Decreto 2.499/1971, de 13 de agosto, donde se establecen las Normas Reguladoras de la Reproducción Ganadera. Más adelante se publica la Orden Ministerial de 31 de octubre de 1978, que establece las normas específicas de IA en porcino. El 17 de enero de 1980, se publica una resolución de la dirección General de la Producción Agraria, donde se dictan las normas complementarias, para la realización de esta actividad, referentes tanto a las empresas dedicadas al sector como a los propios animales (Cantero Ciudad, 2010).

4.3.3. Ventajas e inconvenientes de la inseminación artificial

La IA ha traído consigo un gran desarrollo en el campo de la producción animal, con un notable impacto en todos los sectores ganaderos, no solo en el porcino. Con la extensión de la IA por todo el mundo, se llegó a la separación de los llamados centros de IA y las granjas de cría de tal manera que, cada uno por separado, se impulsó la investigación y los avances técnicos en los diferentes estadios de la IA. Los centros de IA (CIA), por su parte, comienzan a mejorar la producción de dosis seminales, obteniendo una mayor eficiencia. Comienzan a realizarse mejoras, no solo en la obtención de las dosis, sino también en su manipulación, empaquetamiento e incluso en el proceso de inseminar a las hembras, creando catéteres de inseminación específicos que se adaptan al aparato genital de la misma. Por su parte las granjas de cría, se centran más en el estudio del ciclo estral de la madre, lo que conlleva una mejora en la prolificidad, ya que se reconocen los celos y se centra en el momento en el que debe realizarse la inseminación. La disponibilidad de un mayor número de verracos en los CIA permite un mejor estudio de la transmisión de buenas cualidades genéticas; así como, un estudio exhaustivo de la calidad seminal y fertilidad de cada verraco.

Una de las principales ventajas de la IA frente a la monta natural, son las de **carácter sanitario:** por la disminución de la transmisión de enfermedades infecto-contagiosas por vía sexual, producida por la disminución de la monta directa de los animales; por la disminución de número de animales que entran en las granjas y pueden ser trasmisores de enfermedades; y por la mejora de la limpieza llevada a cabo en el proceso de inseminación (Knox, 2016).

Debemos mencionar otro grupo de ventajas importantes**, las zootécnicas**, las cuales se pueden resumir de la siguiente manera: 1) permite un menor número de animales por granja, ahorrando con ello en costes de mantenimiento y espacio; 2) permite un aumento de la difusión del potencial genético, danto lotes de lechones más homogéneos y 3) aumenta la capacidad de selección ya que las concepciones son más numerosas y en menos tiempo y permite aumentar el número de servicios por eyaculado.

Por otro lado podemos hablar de las facilidades en **el manejo**: como la disminución en el tiempo de trabajo de los operarios; el facilitar el manejo en bandas; permite el uso de animales de diferente peso en los cruces, disminuye el stress que estos sufren durante la monta natural; finalmente, al disminuir la cantidad de verracos necesarios en las granjas, también disminuyen los inconvenientes y costes derivados del mantenimiento de los mismos.

Además hay una formación de grupos mucho más homogéneos, aumentando la precisión de la evaluación del valor genético, el aumento de la descendencia de un mismo semental y el aumento de la evaluación de los caracteres medidos, debido al aumento de la información media e incluida en el índice de selección. Se produce un aumento en la intensidad de selección, al aumentar el número de concepciones por semental y disminuir el número de sementales seleccionados.

Mencionar que se consigue una mejora de la calidad espermática de los sementales usados para la reproducción porcina, ya que por un lado la selección ayuda a eliminar aquellos verracos de mala calidad y, por otro, están menos influidos por factores externos. (Kubus S.A, 2010).

Sin embargo, a pesar de las múltiples ventajas que hemos nombrado anteriormente, debemos tener en cuenta que hay ciertos inconvenientes en el uso de estas técnicas de reproducción.

Uno de estos inconvenientes son las **alteraciones genéticas**, producidos por la realización de malos cruces y la posible consanguinidad existente entre los animales pertenecientes a una misma granja tras mucho tiempo de selección.

Además hay un problema muy importante que ha ido surgiendo con el uso de dosis seminales refrigeradas y que es el principal objetivo de análisis de este trabajo, es la posible aparición de **cepas resistentes de amplio espectro**, probablemente debido a una mala praxis en el uso de los antibióticos en los procesos de inseminación artificial.

Las enfermedades bacterianas más preocupantes en el ganado porcino, son la brucelosis, la clamisiosis y la leptospirosis por generar trastornos reproductivos en nuestra ganadería. Todas ellas pueden ser combatidas con la realización de buenas prácticas higiénicas en el proceso de recolección e inseminación, así como el uso de antibióticos de amplio espectro en las dosis seminales. Además de enfermedades bacterianas, también hay algunas enfermedades víricas como por ejemplo, Parvovirus y Circovirus porcino, o el Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS), que afectan a la fertilidad de los verracos, y de igual manera son trasmitidas por un mal manejo en el proceso de inseminación (Althouse y Rossow, 2011).

4.3.4. Técnica de inseminación artificial en porcino

Como ya hemos mencionado la IA en porcino lleva usándose desde 1930, pero no es hasta 1980 cuando este sector presenta un desarrollo importante.

El proceso de IA artificial debe ser realizado por alguien formado en la aplicación de esta técnica y además debemos asegurarnos de que las dosis seminales utilizadas sean de calidad, ya que todos los procesos realizados en el semen acaban influyendo sobre su calidad. En la actualidad, las tres formas de IA más usadas son: IA cervical o tradicional, IA postcervical e IA intrauterina profunda.

- Inseminación artificial cervical:

La inseminación cervical fue descrita en el año 1950 por Hancock (Figura 4.4). Consiste en la deposición de la dosis en el cérvix del aparato reproductor femenino. Se depositan en torno a $2,5 \times 10^{9}$ espermatozoides por dosis, en un volumen de 70-100 ml, lo que limita la cantidad de dosis producidas de un mismo eyaculado (Bortolozzo y col. , 2015).

- Inseminación artificial intrauterina o post- cervical:

En el año 2000 se produce el desarrollo de la inseminación postcervical (Figura 4.4). En esta técnica, se introduce la dosis en el interior del útero, lo que permite disminuir la cantidad de espermatozoides usados en el servicio. Aunque no se ha estandarizado aún la cantidad óptima de espermatozoides por dosis para la inseminación post-cervical, numerosos estudios comparativos realizados con la inseminación convencional sugieren cifras de entre 1 y 1.5 millones de espermatozoides (Bortolozzo y col., 2015).

❖ Inseminación artificial intrauterina profunda

Esta técnica consiste en introducir una sonda larga en uno de los cuernos uterinos (Figura 4.3), cerca de la unión útero-tubárica (Figura 4.4). Esta técnica es capaz de reducir de forma significativa la cantidad de espermatozoides usados en el proceso de inseminación (150 x 10^{6} espermatozoides por dosis), así como el volumen de dosis utilizados (5 ml). Es especialmente interesante su aplicación con semen descongelado, donde la viabilidad de los espermatozoides se ve muy reducida por el proceso de congelación/descongelación de las dosis. También es importante en la IA con semen sexado (Guerrero y col., 2008; Bortolozzo y col., 2015) .

Un factor muy significativo a tener en cuenta en el proceso de IA, es el periodo de tiempo transcurrido desde la inseminación hasta la ovulación. En todos los tipos de inseminación no se recomiendan periodos de más de 24 horas desde que se produce el servicio hasta que se prevé que va a tener lugar la ovulación, ya que se pueden producir bajadas en la fertilidad, haciendo que la hembra no quede gestante o que el número de embriones viables disminuya. Para asegurar que la inseminación se realiza en el momento adecuado, se producen de 2-3 servicios, realizados durante el periodo de celo del ciclo estral, de manera que nos aseguramos que al menos uno coincida con el momento óptimo.

Del mismo modo, entre los tipos de inseminación hay diferencias en el material utilizado (Figura 5.3), y el tipo de hembra para la que está recomendado. En el caso de la inseminación post-cervical, los catéteres que se introducen en el interior son solo recomendados para hembras multíparas, donde en un 95 % de las mismas no hay dificultades para la realización del proceso, mientras que, en las hembras de primer parto, estos niveles desciende a un 30-40 % (Bortolozzo y col.., 2015).

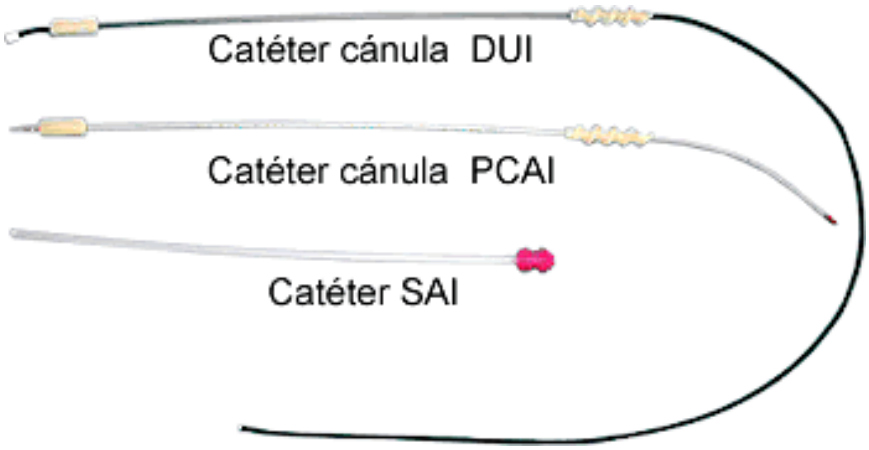


Figura 4.3. Representación de los catéteres usados para cada proceso de inseminación; DUI (inseminación artificial profunda; PCAI (inseminación post- cervical); SAI (inseminación cervical). ***Fuente: https:// www.google.es/ search?q=catéteres+de+inseminación+artificial.***

El volumen de dosis utilizado, para la IA cervical y postcervical, en un principio fue el mismo, 80 ml, pero conforme el número de gametos se vio disminuido, la dosis también fue descendiendo a niveles de 60, 30, e incluso 20 ml. Es importante no sobrepasar la disminución de la dosis ya que esto podría suponer una disminución en la fertilidad.

Un acontecimiento a tener en cuenta en la inseminación cervical, es el reflujo (***backflow*),** generado tras la deposición del semen. Aproximadamente un 70% de la dosis y un 25 % de los espermatozoides son eliminados por este proceso. Este fenómeno se ve considerablemente disminuido en la inseminación postcervical, a pesar de que sigue presente. Esta disminución del reflujo nos permite minimizar el volumen de las dosis y la cantidad de gametos usados, puesto que una mayor cantidad de los mismos podrán llegar a los cuernos y trompas uterinos (Bortolozzo y col., 2015).

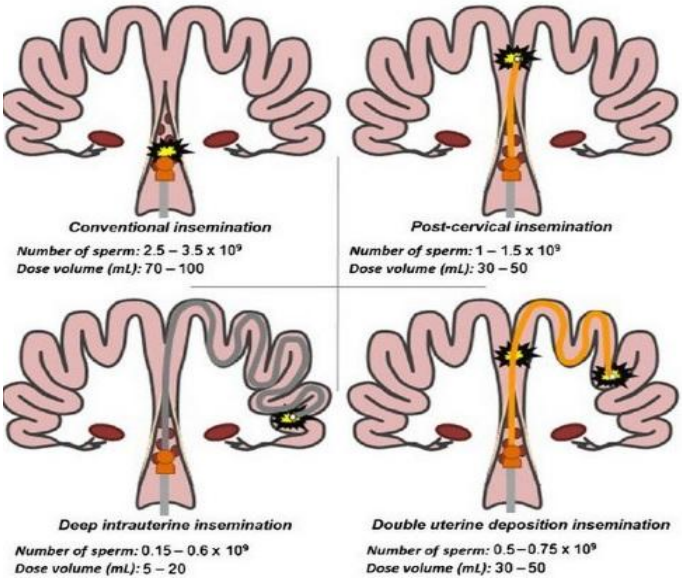


Figura 4.4. Representación de los diferentes tipos de inseminación. ***Fuente:*** *(http://www.veterinariargentina.com/revista/2014/06/inseminacion-artificial-en-porcinos-1%C2%AA-parte/)*

4.3.5. Conservación seminal en porcino

Uno de los problemas más importante de la conservación seminal, es el efecto que tiene la bajada de la temperatura en el espermatozoide porcino. Un indicador importante es el daño que se produce en la membrana plasmática, el cual podemos estimarlo con el uso de una serie de tinciones o sondas o por la liberación de ciertas sustancias intracelulares. Estos cambios de permeabilidad son diferentes si hablamos de membrana acrosómica o membrana plasmática. Cuanto estamos ante un semen conservado de 4-8 días, aumenta la cantidad de espermatozoides que se encuentran capacitados y con un acrosoma dañado o reaccionado (Conejo-Nava y col., 2003).

Shock térmico: se produce cuando hay un descenso brusco desde la temperatura corporal a niveles térmicos bajos. La dilución y el enfriamiento generan cambios en la permeabilidad de las membranas (Ortman y Rodriguez-Martinez, 1994), estos cambios son similares a los observados en la capacitación y en la reacción acrosómica, comprometiendo la viabilidad de los espermatozoides (Green y Watson, 2001). Cuando la bajada de la temperatura se realiza de manera gradual, se produce una resistencia por parte del espermatozoide, facilitando la supervivencia del mismo. Se cree que esta reacción se produce por las características de fluidez de la membrana lipídica del espermatozoide porcino. Al bajar la temperatura hay una disminución en el movimiento de la membrana, haciendo que el fluido cambie a una fase de gel. La membrana lipídica, es una diferencia fundamental entre especies. En el caso del porcino, la mala conservación se debe por un lado a las características de sus fosfolípidos, que poseen una mayor cantidad de *phosphatidylcholine* y de *phosphatidylethanolamine,* que producen una menor estabilidad de la membrana. Por otro lado, el colesterol, en el caso del verraco, no se encuentra distribuido de manera uniforme en la bicapa lipídica, lo que hace que la proporción colesterol/ forfolípidos, sea muy baja. Esta baja proporción hace que sobre todo, en la monocapa externa, se produzca una vulnerabilidad al frio, el cual cambia la organización de los fosfolípidos, generando a su vez, cambios en la permeabilidad, que afectan la funcionabilidad del espermatozoide porcino (Johnson y col., 2000b).

El semen puede ser conservado en refrigeración o en congelación, estando esta última, mucho más limitada debido a la sensibilidad de los espermatozoides porcinos al frio (Ochoa y Ortega, 2008).

Cuando usamos semen porcino refrigerado, se requieren temperaturas de refrigeración entre 15 y 20ºC, con un máximo de unos 5 días de conservación, pero hay autores ,que muestran que hay una disminución de fertilidad espermática a partir de las 24-48 horas de conservación en refrigeración (Bortolozzo, y col. 1994; Soede, y col., 1995).

Algunos autores han propuesto que la radiación emitida sobre los espermatozoides con ultrarrojos, aumenta y mejora la actividad mitocondrial de los mismos (Abdel-Salam y Harith, 2015; Preece y col., 2017). Luther y col. (2018), realizaron un experimento en el cual se establecieron dos tipos de muestras. Una de ellas con n=10 conservadas durante 24h en oscuridad a 17ºC. La otra contaba con n= 6, conservadas durante las primeras 6 horas a 22ºC y las otras 52 horas a 5ºC en oscuridad. En medio estuvieron a 17 ºC para evitar el choque que produce la brusca bajada de la temperatura. El total de horas de conservación fue de 72 h. Tras el periodo de conservación, las muestras fueron irradiadas en tres periodos consecutivos, los primero 10 min con una fase luminosa, a continuación una más fuerte y en oscuridad, y para finalizar otros 10 min en fase luminosa. Esto puede suponer una importante ventaja para los eyaculados conservados en medios líquidos a bajas temperaturas. En la actualidad, Yeste y col. , (2018) han experimentado la radiación con *light- emitting diodes* (LED), solo en dosis de bajos volúmenes (1ml), estableciendo que el día que se pueda conseguir el efecto en las dosis completas, 80-100 ml, se producirá un gran avance en el sector de la IA.

Un factor a tener en cuenta a la hora de establecer la forma de conservación de las dosis seminales, es el uso que hacen los espermatozoides mamíferos del ATP, como fuente de

energía, para llevar a cabo las funciones de fertilización. El ATP y sus precursores, ADP y AMP, han sido estudiados en múltiples ensayos, determinando la cantidad de los mismos, en dosis conservadas a 17ºC y a 5ºC, y valorando la reducción que se produce con el paso del tiempo en refrigeración. Nguyen y col. (2016), realizaron la revisión del protocolo de extracción del ATP con dosis en diferentes medios de conservación. Además establecieron que no había diferencia en las concentraciones de ATP y ADP según el tiempo, sin embargo, sí aumentaba las concentraciones de AMP en los eyaculados almacenados 24h respecto a los almacenados durante 72h, esta diferencia tenía correlación con la cantidad de espermatozoides, con la presencia del plasma seminal y con el daño en la membrana acrosómica.

4.3.6. Características de los tipos de diluyentes usados en la realización de dosis seminales

Un diluyente es una solución que permite la conservación de los espermatozoides, ya que aporta el medio apropiado para el mantenimiento de los mismos y de su fertilidad (Condoy, 2017).

El eyaculado, se diluye con una solución, compuesta de una serie de sustancias, que permiten disminuir las temperaturas de conservación de las dosis y amplían la supervivencia temporal, al disminuir las necesidades metabólicas de los espermatozoides (Condoy, 2017).

A pesar del uso de estos diluyentes, hay una pérdida de la motilidad del espermatozoide y un aumento en el daño de la membrana, lo cual acaba disminuyendo la viabilidad de la célula. Aún no se tiene una respuesta segura a la pregunta de por qué se genera el llamado efecto dilución, pero, autores como Watson (1995), establecen que podría ser debido a una pérdida de los componentes intracelulares de la membrana. Otros autores, como Harrison y col. (1982), establecen que podría deberse a la ausencia de estimuladores proteicos de la motilidad presentes en el plasma seminal. Esto podría ser solucionado con la adicción de albumina, como estabilizador de membrana

En concreto se ha demostrado que la seroalbumina bovina (BSA) tiene muchos beneficios, si se introduce en la cantidad correcta en los diluyentes. Buhr y col. (2001), experimentaron con la BSA, intentando mejorar la fluidez de la membrana, evitando el deterioro que el frio generaba en los fosfolípidos y los ácidos libres de la misma. Asumió que los cambios en la membrana lipídica, producía un fallo en el traspaso del Ca^{2+}, el cual es esencial para la capacitación espermática, ya que sin él el espermatozoide no puede fecundar el ovocito. Sin embargo, la BSA, solo disminuyo levemente los cambios de fluidez, por lo que fue complicado extraer una interpretación de los resultados. Esta pérdida de Ca^{2+} junto con la disminución del adenosín trifosfato (ATP) y del adenosín monofosfato cíclico (AMPc), son los que generan grandes pérdidas de viabilidad (Johnson y col. , 2000a).

A pesar de todo lo mencionado, el uso de diluyentes, no previene del todo los cambios que suceden en el espermatozoide, observándose cambios funcionales similares a los acontecidos por un envejecimiento natural, modificándose por las condiciones y el periodo de conservación (Rath y col. , 2009).

Los diluyentes deben cumplir cuatro requisitos básicos (Condoy, 2017):

- Aportar energía para el metabolismo de los espermatozoides.
- Contrarrestar los residuos metabólicos.
- Mantener el equilibrio osmótico.
- Estabilizar las membranas plasmáticas.

Alguno de los componentes básicos de los diluyentes son (Condoy, 2017):

- Glucosa: es la que aporta la energía necesaria para el mantenimiento espermático, es la más usada debido a su valor energético, pero también pueden usarse otros tipos de azucares.
- Tampones (TES, HEPES, MOPS, TRIPS): son los encargados de regular el pH seminal, evitando así la reducción del metabolismo energético, así como la motilidad, lo que mejora la capacidad de fertilización siendo independientes de las temperaturas.
- Sales inorgánicas: reguladoras de la presión osmótica, ya que si esta disminuye por debajo de 200 mOsm la motilidad se verá afectada.
- Antibióticos: se incluyen porque tanto el eyaculado contaminado, como alguno de los componentes de los propios diluyentes, como la glucosa, facilitan la proliferación bacteriana, y esta proliferación genera cambios en el eyaculado. La adición de antibióticos en la cantidad adecuada, mejora la supervivencia espermática y mejora la fertilidad (Colenbrander y col. , 1993; Althouse y col., 2000). Este es uno de los objetivos de estudio en el presente trabajo, debido a la enorme importancia que tienen en la actualidad, tanto por las limitaciones legales de su uso actual, como por la enorme resistencia bacteriana que está generando el abuso de los mismos.

Los diluyentes pueden ser clasificados en dos grandes grupos (Gadea, 2003).

- Diluyentes a corto plazo:

Son usados fundamentalmente para el transporte de dosis a corta distancia, conservando el semen a 15-20 ºC. Estos diluyentes permiten el uso de una concentración espermática baja, así como un menor costo de preparación con respecto al diluyente de larga duración

Los tipos de diluyentes de corta duración más usados son DICIP, D16 y BTS. Usados para tiempos de conservación no superiores a 48-72 horas en refrigeración.

- Diluyentes a largo plazo:

Algunas de las ventajas de este tipo de diluyente, es que permiten el transporte de las dosis a largas distancias, permitiendo además su uso en situaciones de alta carga de trabajo en el centro de inseminación, con machos de poca demanda y realizar pruebas diagnósticas antes de ser usados. . Como desventaja cabe mencionar la necesidad de usar grandes concentraciones de espermatozoides para compensar las pérdidas de viabilidad producidas por el envejecimiento.

Estos diluyentes, permiten la conservación de las dosis de 5-6 días, requiriendo temperaturas de 15-17ºC.

Para la realización de estos diluyentes se han producido adaptaciones de diluyentes usados para semen bovino, los cuales están generados a base de yema de huevo con fosfatos, citrato y leche. Entre estos diluyentes cabe destacar el Illinois Variable Temperature (IVT), adaptado para semen porcino por medio de la adición de EDTA, un agente quelante que permite bloquear la acción del calcio, mejorando los procesos de capacitación y reacción acrosómica, cambiando su nombre por KIEV, que ha permitido una gran difusión de la IA porcina.

Además del ya mencionado, otros diluyentes a largo plazo son el BTS, el Zorlesco, el Modena, el MR-A (usado para la realizan de nuestra fase experimental) y el ZORVPA.

4.3.7. Uso de los antibióticos en los diluyentes.

La finalidad del uso de antibióticos en la producción porcina se puede resumir en tres puntos:

- Tratamiento de enfermedades.
- Prevención de enfermedades.
- Aumento de la eficacia nutricional.

En general hay una serie de principios establecidos para poder usar los antibióticos de manera correcta y responsable. En primer lugar debemos establecer cómo reducir el uso de los antibióticos en nuestra explotación, implantando programas de bioseguridad, higiene, rutinas de control de la salud, y vacunaciones, que prevengan ciertas enfermedades y que por lo tanto disminuyan la posibilidad de tener que hacer uso de los mismos. Se debe valorar siempre la relación coste beneficio, y en el caso de tener que utilizarlos, hacerlo siempre siguiendo las directrices establecidas para el uso responsable de productos zoosanitarios y siempre bajo control veterinario (Toledo Castillo y Herrera Matín, 2014).

En la mayoría de los casos, el tejido testicular y las glándulas accesorias, contienen bacterias libres, que contaminan el eyaculado durante la recolección del semen por el método de la mano enguantada (Gadea, 2003). Un estudio estableció que el 62% de los eyaculados puros y los 79,5% de los diluidos, exportados, son diseminadores de enfermedades bacterianas (Maroto Martín y col., 2010).

Se ha detectado contaminación bacteriana en más de un 80% del semen porcino, generando un deterioro en el eyaculado, al disminuir la motilidad durante la conservación de las dosis (Okazaki y col., 2010). Además algunas bacterias, afectan a la actividad reproductiva de las hembras, reduciendo su fertilidad (Andrabi y col., 2001).

Cuando encontramos altos niveles de contaminación, solemos encontrar aglutinaciones, daños en el acrosoma, baja motilidad espermática y reducción de la vida útil del espermatozoide. Por todo ello, los antibióticos forman a día de hoy una parte esencial de los diluyentes para la conservación seminal (Althouse y Lu, 2005).

Los agentes antimicrobianos son imprescindibles en el control del crecimiento bacteriano de los eyaculados porcinos. Actualmente el problema principal se establece por las resistencias que los antibióticos convencionales están generando, ya que las bacterias desarrollan mecanismos diferentes para los que dichos antibióticos no están preparados. Un estudio reciente revela que el 26% de 344 dosis de semen obtenidas de 24 centros de IA europeos en los años 2010-2011 fueron positivos a contaminación bacteriana, en concreto había 21 especies diferentes, en su mayoría gram negativas y 18 de ella fueron identificadas y resultaron ser resistentes a los antibióticos de uso común en la reproducción porcina. Cabe destacar que la mayoría de las bacterias aisladas en los eyaculados, procedían de contaminaciones producidas por el manejo en el propio laboratorio (Schulze y col., 2015).

La adicción de antibióticos en las dosis seminales se encuentra regulada por las autoridades. Tenemos dos referencias fundamentales, la Organización Internacional de Epizootias (OIE) y la Unión Europea (UE)

La OIE regula, en su código internacional de sanidad animal (2001), las condiciones aplicables a los diluyentes. Básicamente aconseja que cuando en los diluyentes se encuentre como componente la leche, la yema de huevo o cualquier otra proteína de origen animal, estos productos deben estar libres de patógenos o esterilizados. Así mismo se permite la adición de antibióticos siempre que sean declarados en los certificados veterinarios internacionales.

En la Unión Europea (UE) esta regulación se refleja en la directiva 90/429/EEC, y describe el efecto producido por la combinación de antibióticos, en concreto, contra leptospira y micoplasma. Desde el año 1980, la combinación de estreptomicina y penicilina se suspendió, ya que los microorganismos habían desarrollado grandes resistencias (Sone y col., 1982). En el 2005 estudios realizados en Estados Unidos, encontraron evidencias de la resistencia generada por las bacterias de los eyaculados porcinos a algunos de los antibióticos más comunes, amoxicilina, gentamicina, lincomicina, tilosina y espectinomicina (Althouse y Lu, 2005). Entre 2010 y 2011, se estudiaron 24 centros de inseminación diferentes entre Alemania y Australia, 16 de los mismos revelaron una resistencia de las bacterias a la gentamicina. Después de identificar algunos puntos críticos de higiene en el procesado y la implantación de medidas estrictas para solucionarlo, se produjo una gran reducción de las bacterias resistentes en las dosis de semen, esto se fue confirmando en posteriores estudios (Schulze y col., 2015)

4.3.8. Otros antimicrobianos como alternativa al uso de antibióticos

La continua exposición de los eyaculados a dosis de antibióticos no inhibitorias, favorecen el desarrollo de resistencias (Specky col., 2014). Para intentar reducir esta resistencia, surge la tendencia de usar una mezcla de antibióticos de amplio espectro, que potencie la actividad antibacteriana de los mismos e intente reducir la toxicidad producida sobre el eyaculado (Morrell y Wallgren, 2014).

Uno de los grandes esfuerzos realizados en la actualidad, es el desarrollo de péptidos antimicrobianos (AMPs) para la lucha contra las enfermedades infecciosas (Hancock y Patrzykat, 2002). Los AMPs, muestran un número impresionante de posibilidades (Zaiou,

2007). La creación de los AMPs como aditivos antimicrobianos, está generando una enorme expectativa en el mundo de la IA porcina, limitada por su elevado coste económico actual. Los requisitos que deben cumplir dichos aditivos son: alto espectro antimicrobiano y bajo potencial capaz de generar resistencia, así como ser de fácil aplicación y económicamente rentable (Speck y col., 2014), ausencia de toxicidad para los espermatozoides y alta estabilidad y actividad en las temperaturas de conservación seminal (Schulze y col., 2014). Los primeros datos sobre los AMPs, vienen del año 1980, cuando se describieron péptidos (cecropins) con alto espectro de actividad antimicrobiana, al formar parte del sistema humoral de las polillas (Boman y col., 2009) Posteriormente, se ha ido describiendo en el sistema del resto de organismos, plantas, animales y humanos (Zhao, X. y col., 2013). Los AMPs generalmente están compuestos por secuencias cortas de aminoácidos, de 10-50. La composición y estructuras de los aminoácidos son muy diversas, obteniendo características biológicas y biofísicas que los clasifican como AMPs, la estructura más común es elíptica, aunque hay algunos con estructuras cíclicas o irregulares. Sin embargo, la carga catiónica y el carácter anfipático de los AMPs, se conservan y son de vital importancia para realizar el efecto selectivo sobre las membranas bacterianas. Las membranas bacterianas son ricas en lípidos de carga negativa, tales como fosfodilglicerol y cariolipidos. A veces las membranas de las gram negativas, tiene altas concentraciones de lipidopolisacáridos de carga negativa. La interacción electroestática conduce a un acúmulo de péptidos catiónicos con cargas negativas por las membranas bacterianas. El cambio en el agrupamiento de las cabezas lipídicas, induce cambios conformacionales, produciendo una separación de los residuos catiónicos e hidrofóbicos. Cuando los lípidos ácidos interaccionan con los residuos hidrofóbicos, los péptidos penetran en la membrana lipídica, cambian su estructura y destruyen la función de la membrana. La ausencia de lípidos aniónicos y la rigidez de la membrana, producida por las altas cantidades de colesterol, disminuyen la fluidez y es considerada una de las mayores causas de la baja actividad citolítica y citotóxica de los AMPs en las células eucariotas (Dathe y col.., 2002).

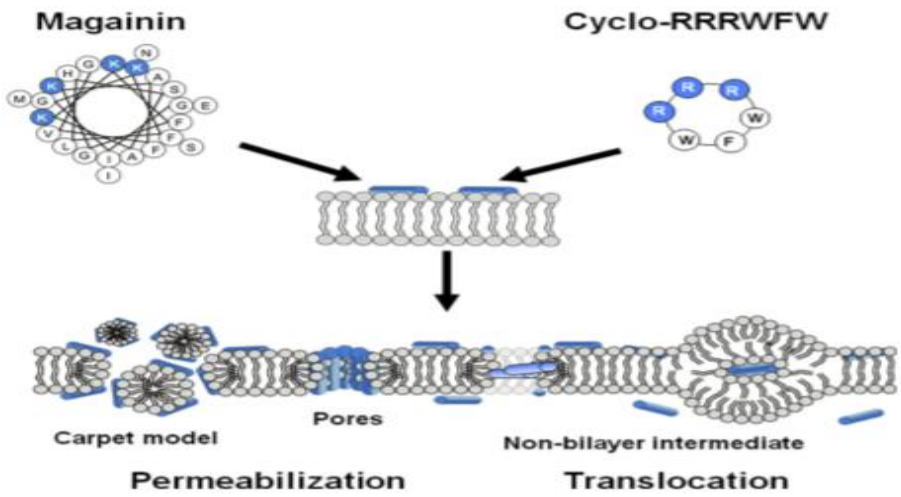


Figura 4.5. Esquema de la actuación de los AMPs. Fuente: (Schulze y col., 2016).

4.3.9. Otras aproximaciones como alternativa al uso de antibióticos

En la actualidad, algunos laboratorios están creando diluyentes sin antibióticos, que utilizando temperaturas de refrigeración de hasta 5ºC permiten mantener la calidad espermática y evitan el crecimiento microbiano. (Grossfeld y col., 2016) realizaron un experimento en el que conservaron semen a 17ºC con antibiótico, manteniéndolo durante 2 h a 24ºC y posteriormente a 17ºC durante 48h y semen a 5ºC sin antibiótico, manteniéndolo durante un tiempo de 6 horas a 24ºC y posteriormente bajaron a 5ºC hasta las 48 horas. Tras estos periodos de tiempo, inseminaron a un total de 40 cerdas adultas y 10 cerdas jóvenes, repitiendo la inseminación cada 8-12 horas hasta el final del celo. Los resultados que obtuvieron fue una alta similitud entre ambos protocolos, con resultados similares de calidad seminal, elevadas tasas de preñez y número similar de lechones entre ambos diluyentes.

Otra alternativa aun en prueba, es la encapsulación de los espermatozoides. Esta es una técnica utilizada en multitud de campos como la industria química o farmacológica. En el caso de la biotecnología se usa para el encapsulamiento de células o tejidos, permitiendo la protección frente al medio externo y el mantenimiento la actividad biológica (Sánchez-Sánchez y col., 2017). La encapsulación seminal podemos definirla como el proceso por el que el espermatozoide es cubierto por una membrana semipermeable, produciendo partículas semisólidas. El espermatozoide queda atrapado en esta matriz, permitiendo el paso de moléculas de bajo peso molecular y evitando el paso de macromoléculas (Nebel y col., 1996).

Esta técnica mejora diferentes partes de la inseminación porcina. Entre estas, debemos hablar de la conservación de las dosis, ya que al proteger los espermatozoides permiten bajar las temperaturas de conservación y disminuir la proliferación microbiana. Con la permeabilidad selectiva que posee el encapsulamiento, protege del paso de macromoléculas así como de microorganismos que interfieren en la conservación y retrasan la capacitación espermática (Lim y Sun, 1980).

5. OBJETIVOS:

La hipótesis de trabajo de la línea de investigación en la que se integra este trabajo fin de grado propone que la conservación de las dosis seminales de verraco a 5ºC puede permitir la eliminación de los antibióticos en los diluyentes lo que evitaría la aparición de bacterias multi-resistentes en las explotaciones porcinas donde se realizan rutinariamente técnicas de inseminación artificial. El objetivo general de la línea de investigación es optimizar la conservación de dosis seminales de verraco a 5ºC en diluyentes sin antibióticos añadidos.

Se han planteado dos objetivos concretos en el presente trabajo:

1. Estudiar si la conservación de las dosis seminales de verraco a 5ºC en un diluyente sin antibióticos inhibe el crecimiento bacteriano.

2. Estudiar los efectos de la conservación de las dosis seminales de verraco a 5ºC en la motilidad y en la función de los espermatozoides de esta especie.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. SOLUCIONES UTILIZADAS

Tampón Fosfato Salino (PBS): consiste en una solución amortiguadora del pH utilizada en diferentes procesos bioquímicos, y cuya osmoralidad y concentración de iones es similar a la del líquido extracelular de los mamíferos. Está constituida a partir de Cloruro de Sodio, Fosfato de Sodio y en algunos casos con Fosfato de Potasio. Composición (Tabla 6.1)

Tabla 6.1.composición del tampón fosfato salino (PBS). pH= 7,4.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
NaCl	137 mM
KCl	2,7mM
Na_2HPO_4	5,62 mM
NaH_2PO_4	1,09mM
KH_2PO_4	1,47 mM

6.2. RECOLECCIÓN DE LOS EYACULADOS

Para la realización del presente estudio, se han utilizado eyaculados obtenidos de 6 animales, de raza Duroc Jersey, dos de ellos de la línea genética PIC. Los eyaculados se han obtenido del centro de inseminación artificial Tecnogenext S.L, situado en Arroyo de San Serván, en Mérida.

La recolección seminal se llevó a cabo por el método de la mano enguantada. El material necesario para la recolección consiste en:

- Vasos de recolección con un filtro o gasa (previamente atemperados a 37ºC con el fin de evitar el shock térmico).
- Guantes de vinilo sin polvos
- Toallitas con clorhexidina para limpiar y desinfectar previamente la zona prepucial del verraco.

Se realiza la técnica de doble guante, por lo que el recolector debe ponerse dos guantes. En primer lugar, con el verraco ya montado en el potro de extracción (Figura 6.2), vaciamos y limpiamos el prepucio, masajeándolo cuidadosamente, para estimular al animal. Posteriormente, se quita un guante, realizando la recolección con el segundo guante, para evitar contaminación con la zona prepucial. En el momento de la recolección el operario pone la mano en contacto con el pene, una vez salga del prepucio, estando el verraco ya excitado y mantenerlo horizontalmente. Posteriormente, se aprieta la extremidad del pene bloqueando la espiral con los dedos (Figura 6.1).

Figura 6.1. Extracción seminal por el método de la mano enguantada. Fuente: *http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=6332*

Destacar que la eyaculación de los verracos es trifásica. La primera porción del semen, se debe dejar caer, ya que es un líquido con el que se limpia las vías genitales de los verracos y está muy contaminado. Es blanquecino, casi transparente. La fracción posterior es la más importante, es la rica en espermatozoides y se distingue de la anterior por su color blanco lechoso. La ultima fracción, es algo más transparente y es opcional su recolecta, ya que no suele ser muy rica en espermatozoides.

Figura 6.2. Sala de extracción y potro para la monta del verraco en el proceso de recolección (TECNOGENEXT)

6.3. ELABORACIÓN DE LAS DOSIS SEMINALES.

Los eyaculados en fresco, a los que se les añade una pequeña cantidad de diluyente para su óptima conservación, fueron transportados al laboratorio del grupo de investigación en Señalización Intracelular y Tecnología de la Reproducción (SINTREP), Instituto de Investigación INBIO G+C, Universidad de Extremadura, donde se elaboraron las dosis.

Se prepararon dos diluyentes diferentes, MRA® con antibióticos y MRA® sin antibióticos, ambos de la empresa KUBUS S.A. (Madrid, España). Para su preparación, se mezcló un litro de agua destilada con un sobre de diluyente según las indicaciones del fabricante. A continuación, el diluyente así preparado, se atempero a 38ºC antes de su uso.

La elaboración de las dosis seminales comprende varios pasos sucesivos una vez recibidos los eyaculados. En primer lugar, se determina la concentración espermática en cada eyaculado, para lo que se hizo uso de la cámara Makler® (Figura 6.3.).

Figura 6.3. Imagen de la cámara Makler ®. Fuente: https://www.akralab.es/producto/camara-mackler-esperma/

Se trata de una cámara reutilizable, que permite valorar motilidad, concentración y morfoanomalias de muestras no diluidas. La cámara posee dos partes diferenciadas:

- Parte superior, cubierta por un cristal rodeado de un anillo metálico. En el centro cuenta con una rejilla de 1 mm^2, dividida en 100 cuadritos de 0.1 x 0.1 mm.
- Parte inferior, formada por una base de metal con dos asas. En el centro cuenta con el disco de vidrio plano, donde se deposita la muestra de estudio.

La distancia entre ambas es de 20 µm. Este tipo de cámara además cuenta con un soporte, que le permite la adaptación a la base del microscopio, facilitando así su manejo.

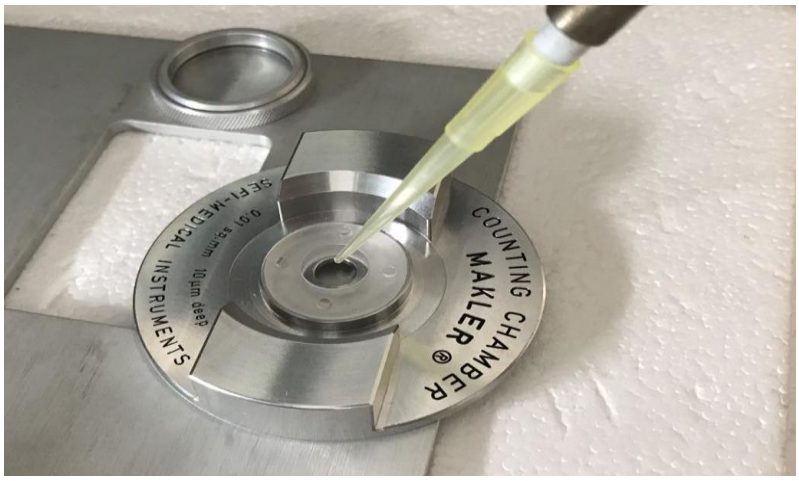


Figura 6.4. Representación de cómo cargar la cámara Makler ®.

Una vez determinada la concentración de los eyaculados se procede a su dilución en el diluyente adecuado, previamente atemperado a la misma temperatura que el eyaculado, para obtener una concentración de entre 25-30 x 10^6 espermatozoides ml^{-1}. Finalmente, se procedió a depositar el semen diluido en tubos Falcon de 15 ml, reduciendo al mínimo posible el aire restante una vez añadido el semen.

6.4. PROTOCOLO DE TRABAJO

Cuando se trabaja con espermatozoides es importante tener en cuenta que, cuando llegamos al laboratorio, lo primero es calentar todos los equipos y material fungible que se va a utilizar durante el trabajo experimental hasta alcanzar la temperatura de trabajo, aproximadamente 38ºC.

Se estableció un protocolo de trabajo que permitiera realizar una aproximación al efecto de la conservación de las dosis seminales a 5ºC en presencia o ausencia de antibióticos. Las dosis seminales se dividieron en tres lotes, cada uno de ellos con 6 muestras diferentes:

1. MRA con antibiótico, refrigerado a 17ºC (n=6)
2. MRA con antibiótico, refrigerado a 5ºC (n= 6)
3. MRA sin antibiótico, refrigerado a 5ºC (este último grupo de muestras cuenta con n=4, ya que por problemas en la elaboración de dosis, se perdieron dos.)

Cada determinación realizada quedaba identificada de la siguiente manera:

- Parámetro determinado
- Identificación del verraco del que procedía la dosis
- Temperatura de conservación
- Presencia o no de Antibióticos
- Y días de conservación (2 ó 4)

Las muestras fueron analizadas en los siguientes tiempos de conservación:

- 24 h: solo el grupo control (17ºC), se realizó para comprobar que las dosis realizadas presentaban la calidad necesaria.
- 48h: en todos los grupos experimentales.
- 96h: en todos los grupos experimentales.

Preparación de las Muestras:

Antes de la determinación de los diferentes parámetros funcionales se procedió a calentar las dosis seminales, conservadas en refrigeración, a la temperatura fisiológica de trabajo de 38,5ºC. Para ello, las dosis conservadas a 5ºC se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente durante al menos 2h. Tras este periodo, todas las dosis se incubaron durante 30 min en una estufa a 38,5ºC, después de lo cual se procedió a la determinación de la motilidad y de otros parámetros funcionales.

6.5. VALORACIÓN DE LA MOTILIDAD

La motilidad espermática, a las 24h, 48h y 96h de conservación, se valoró de forma objetiva por medio de un sistema de análisis de la motilidad por ordenador, el CASA.

Para la determinación de la motilidad en dosis seminales refrigeradas se estableció el siguiente protocolo (Figura 6.5):

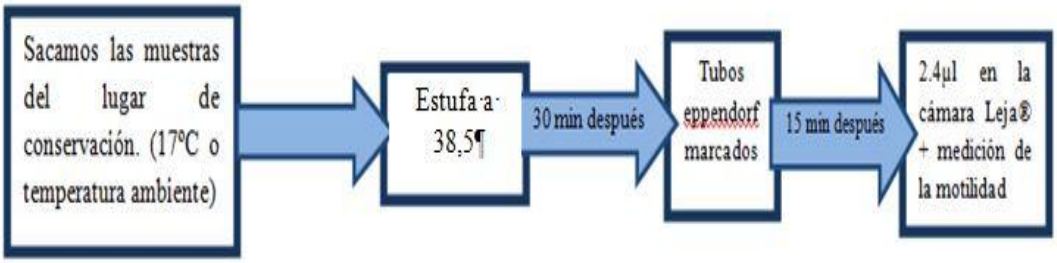


Figura 6.5. Representación de los tiempos usados para la medición de la motilidad.

Para homogenizar el tiempo de medición de la motilidad, las muestras fueran introducidas en el incubador con una diferencia de al menos 5 min, tiempo necesario para la determinación de la motilidad. Para la determinación de la motilidad se utilizó una cámara desechable Leja®, Microptic S.L. (Barcelona, España). En concreto se utilizó la cámara Leja de 20 micras, distancia entre el cubre y el porta, estandarizada para su uso en la mayoría de las especies de interés veterinario (Figura 6.6). Las cámaras Leja presentan un recubrimiento especial que hace que en la muestra no se generen burbujas de aire que puedan interferir con el análisis; así como, que los espermatozoides no aglutinen o se peguen al vidrio. Las cámaras Leja se cargan por capilaridad con 2 µl de muestra, colocando la pipeta con unos 45 grados de inclinación como se muestra en la (Figura 6.7) Al ser desechables, estas cámaras eliminan cualquier tipo de contaminación cruzada que pudiera surgir de la reutilización.

Figura 6.6. Imagen de la cámara Leja® de 8 cámaras y 20 micras, usada para el análisis de la motilidad de las dosis seminales

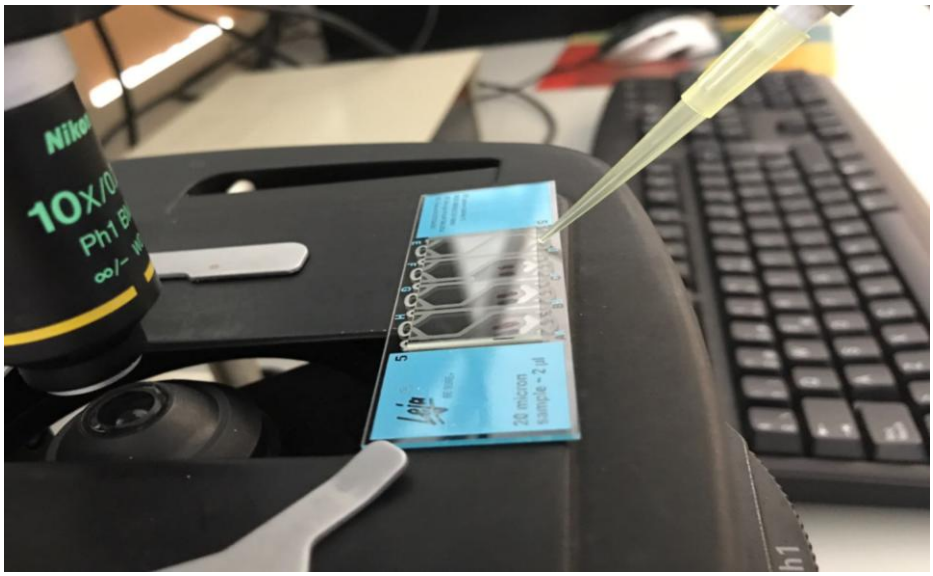


Figura 6.7. Representación de la carga de una cámara Leja®.

El sistema de análisis CASA, usado para la medición de la motilidad espermática, fue el *Integrated Semen Analysis System* (ISASvl, Proiser R+D S.L. Valencia, España). Acoplado con un microscopio E200 (Nikón, Japón), con un objetivo de contraste de fase de 10X y una cámara BLASLER de alta resolución. Además el microscopio posee una platina atemperada a 38,5ºC, que facilita el mantenimiento de la movilidad espermática.

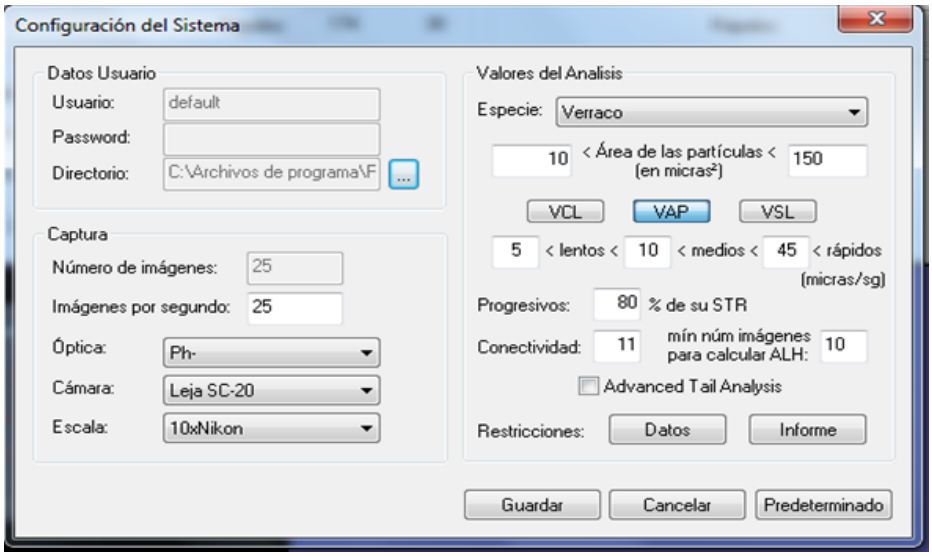


Figura 6.8. Captura de pantalla de la configuración del sistema ISASv1 ®

Lo primero a tener en cuenta con este sistema es que se deben configurar los parámetros utilizados en función de la especie estudiada. En nuestro caso se configuro de la siguiente manera (Figura 6.8)

- Selección de la cámara que se usa, lo que determina la escala del microscopio.
- Área de partículas: mínimo 30 y máximo 80 micras.
- Se toman 25 imágenes/segundo durante 1 segundo.
- Los espermatozoides analizados son aquellos que presentan un mínimo de 11 imágenes.
- Se toman al menos cuatro campos por determinación con un mínimo de 300 espermatozoides analizados.

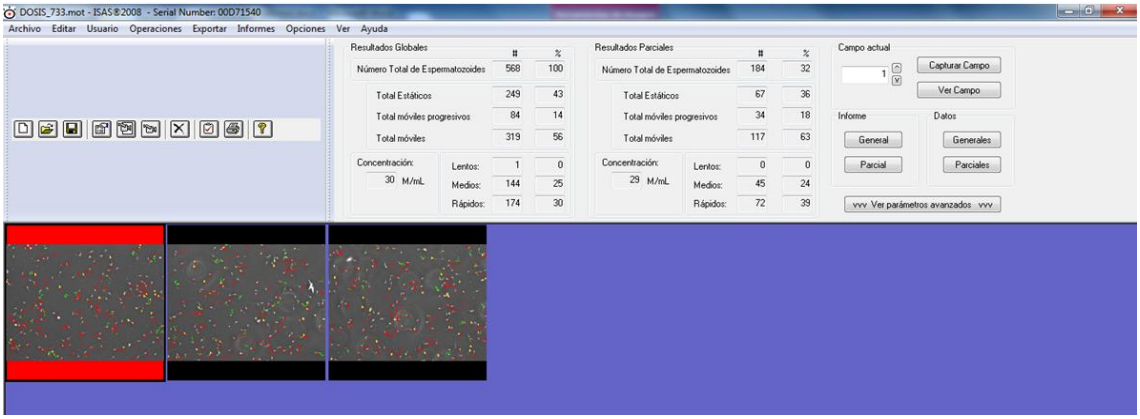


Figura 6.9. Captura de pantalla del inicio del sistema ISASv1 ®

- VAP (o velocidad media): se utiliza para determinar el tipo de movimiento de los espermatozoides, estableciendo como **estáticos** aquellos que presentan una VAP menor a 10 micras/segundo, **lentos** aquellos espermatozoides con una VAP entre 10 y 25 micras/segundo, **medios** entre 25 y 45 micras/segundo y **rápidos**, lo que tienen una VAP superior a 45 micras/segundo (Figura 6.10)

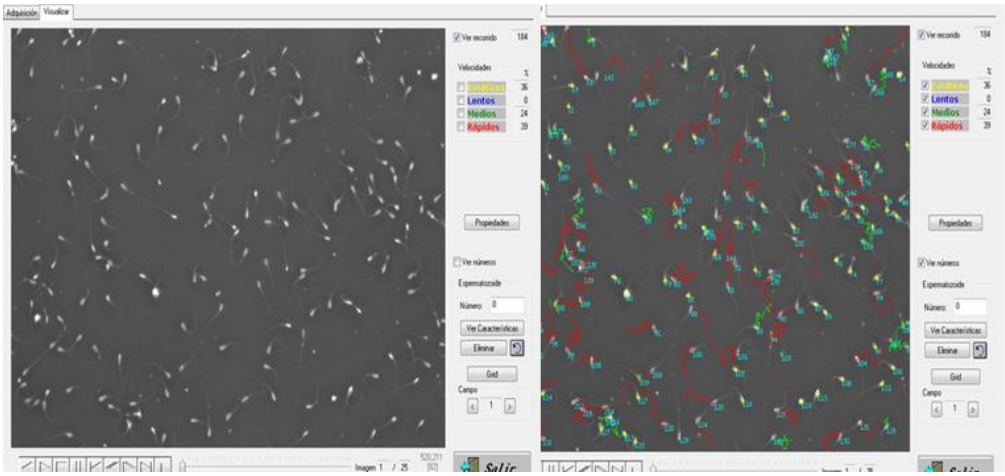


Figura 6.10. Imagen comparativa de las trayectorias seguida por los espermatozoides medidos por el sistema ISASv1 ®.

- Movimiento Progresivo: espermatozoides que presentan un coeficiente de rectitud o STR superior al 80% (Figura 6.11).

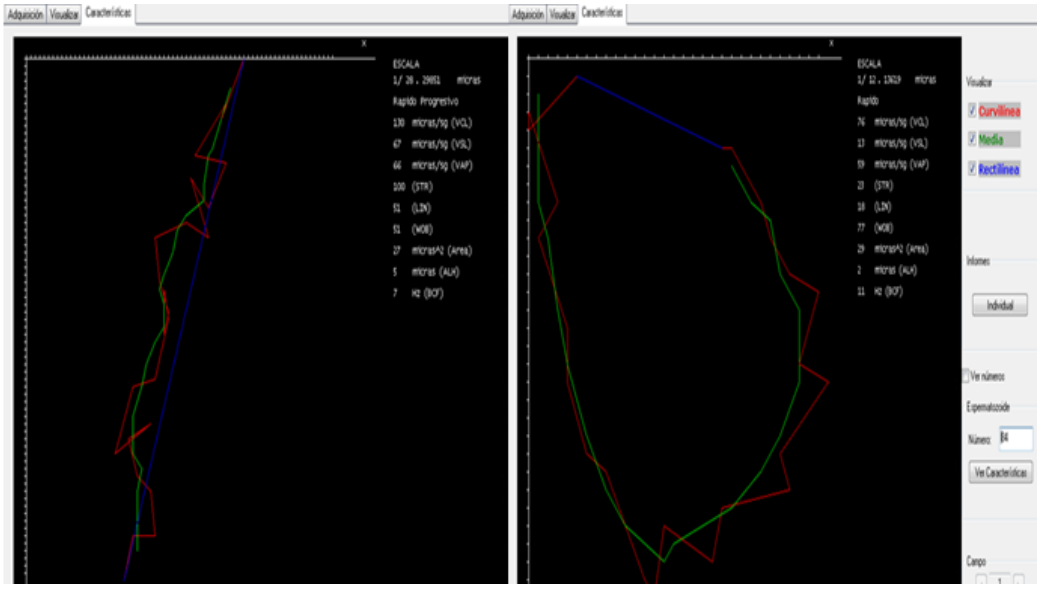


Figura 6.11. Imagen comparativa de una trayectorias lineal y curvilínea de dos espermatozoides medidos por el sistema ISASv1 ®.

6.6. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Consiste en una técnica rápida de análisis, principalmente de células individuales suspendidas en un flujo laminar, por medio de un rayo láser que índice sobre ellas, desviándose, o estimula determinados fluorocromos que emiten en determinadas longitudes de onda. El análisis de dicha desviación, de su intensidad y de la fluorescencia emitida por los fluorocomos nos proporcionan información sobre el tamaño y estructura de la células; así como, del estado funcional, presencia de determinados antígenos, pH, estado redox, etc…

Podemos dividir el citómetro en tres partes: un sistema de inyección, un sistema óptico y un sistema digital de análisis de datos. Tras la inyección de la muestra, esta queda vehiculizada en una solución salina de alta presión, que produce un flujo laminar y que hace que los espermatozoides queden alineados cuando traspasan el haz del láser. Al pasar los espermatozoides a través del haz del láser, este se fracciona, causando la dispersión de la luz. Cuando la ***difracción*** de la luz tiene lugar en sentido frontal se puede evaluar el tamaño de las células (parámetro denominado *Forward Scatter*), mientras que con la medición de la ***reflexión*** de la luz de manera lateral se evalúa la granularidad o complejidad de éstas (parámetro denominado *Side Scatter)*.

Por otro lado, los espermatozoides pueden ser marcados con diferentes fluorocromos que tienen la capacidad de absorber fotones procedentes de las radiaciones luminosas del espectro visible. Estas absorciones de fotones provoca la reagrupación de los electrones, que al volver a su posición normal, liberan energía a diferentes longitudes de onda. Para poder medir los espectros de emisión el citómetro dispone de un sistema óptico que consiste en una serie de filtros alineados que dejan pasar ciertas longitudes de onda y reflejan otras. Tras los filtros se disponen los espejos dicroicos que están inclinados 45º y reflejan la luz hacia los detectores que se comportan como fotomultiplicadores.

El citómetro utilizado en este trabajo de fin de grado es el Novocyte, ACEA Biosciences (San Diego, CA) (Figura 6.12) que consta de dos laser sólidos que emiten a 488 y 561 nm y de 4 fotodetectores:

- FL1: consigue captar longitudes de entre 520-575 nm, de color verde.
- FL2: en este caso las longitudes onda que capta se encuentran en valores de entre 575-620 nm, de color naranja.
- FL3: las longitudes de onda se encuentran por encima de 620 nm, en este caso de color rojo.
- FL4: las longitudes de onda se encuentran por encima de 750nm, en este caso de color rojo lejano.

Figura 6.12. Citómetro de flujo del laboratorio SINTREP.

Los análisis de citometría de flujo se realizaron excitando los fluorocromos con el láser de 488 nm. Un total de 10.000 eventos (basados en el FSC y en el SSC analizados en modo lineal) fueron analizados por cada muestra seminal, con una velocidad de paso de unos 500 eventos/segundo. Los datos de fluorescencia fueron obtenidos en modo logarítmico. Los parámetros funcionales de los espermatozoides de cerdo evaluados en este trabajo fueron viabilidad, membrana acrosomal y especies reactivas de oxígeno. Para ello se utilizaron las sondas recogidas en la (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Sondas usadas para la realización del análisis citométrico del presente trabajo.

Sonda	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Concentración	Tiempo (min)
SYBR-14	488	518	2µM	20
IP	536	617	5µM	5/20
PNA-FICT	495	519	0.05 µg/ml	5
MitoSOX™ Red	530	580	5mM	10

Evaluación de la viabilidad espermática*:*

Para su evaluación se utilizó el Kit de Viabilidad espermática LIVE/DEAD Molecular Probes® (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España), compuesto por dos sondas. La sonda SYBR-14 se une al ADN, lo que nos permite identificar los espermatozoides de otras partículas presentes en la muestra. La segunda sonda es el yoduro de propidio (IP), este compuesto también se une al ADN, desplazando al SYBR-14, pero penetra en la célula solamente en el caso de producirse daño en la integridad de la membrana plasmática, es por ello que los espermatozoides marcados con IP son considerados no viables o muertos. Para la evaluación de la viabilidad espermática a 100 µl de cada muestra seminal (30 x 10^6 células/mL), se le añade IP (10µl, 5µM concentración final) y SYBR-14 (5µl, 2µM concentración final). A continuación añadimos PBS (400µl) y se incuba durante 15-30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Tras la incubación, los espermatozoide son analizados y el resultado se expresa como el porcentaje de espermatozides SYBR-14^+/IP^- (espermatozoidesviables).

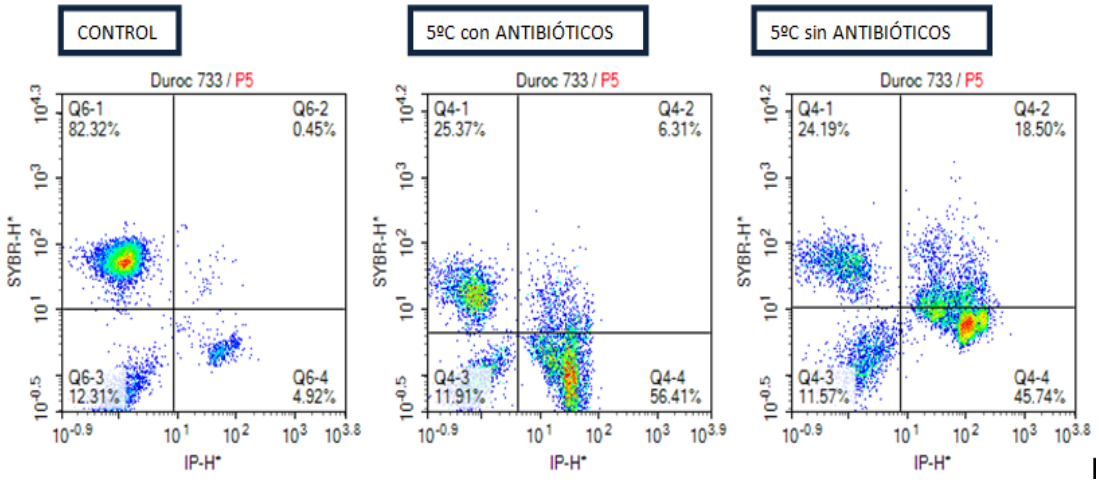


Figura 6.13. Imagen comparativa de la viabilidad en una dosis seminal con diferentes tratamientos a las 48 h de conservación.

Evaluación de la integridad de la membrana acrosómica:

Para su medición utilizamos dos sondas, IP, ya descrita anteriormente, y aglutinina de cacahuete unida a la sonda fluorescente isocianato de fluoresceína (PNA-FITC), Molecular Probes® (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). Esta sonda se une a los residuos de β-galactosa presentes en la membrana acrosómica interna. La sonda PNA-FITC no tiene la capacidad de penetrar la membrana plasmática integra, por lo que tan solo se unirán a las células con el acrosoma reaccionado o dañado. El protocolo seguido para la evaluación de la integridad acrosómica fue el siguiente: 100 µl de cada muestra seminal (30 x 10^6 célula/mL) se incuban a temperatura ambiente y en oscuridad durante 5 minutos con 5 µL de PNA-FITC (0,05 µg/mL, concentración final) y 10µL de IP (5µM, concentración final). Inmediatamente antes del análisis se añaden 400 µl de PBS a cada muestra y se mezcla suavemente. Las muestra se analizan por

citometría y el resultado se expresa como el porcentaje de espermatozoides PNA^{+}/IP^{-} (espermatozoides viables con la membrana acrosómica dañada o reaccionada).

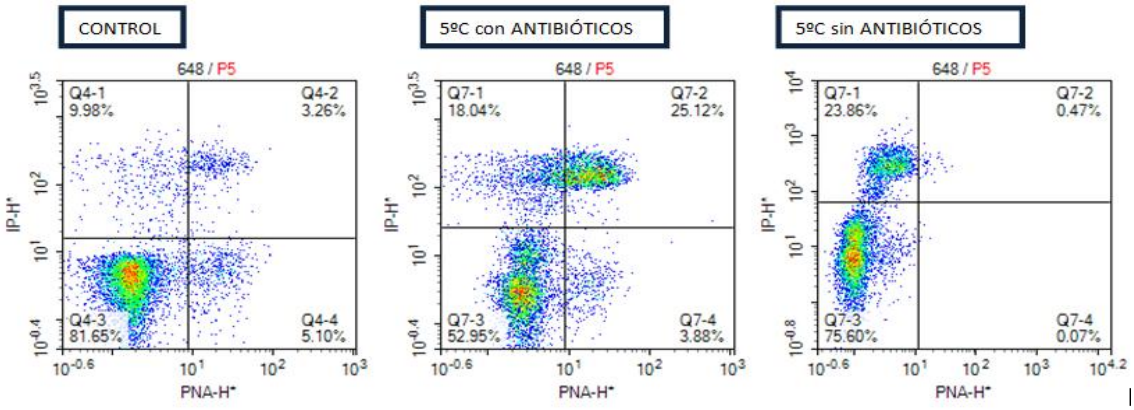


Figura 6.14. Imagen comparativa de la reacción acrosómica en una dosis seminal con diferentes tratamientos a las 48 h de conservación.

Evaluación de las especies reactivas de oxigeno*:*

La sonda MitoSOX^{TM} Red (Indicador rojo de superóxido mitocondrial) El reactivo rojo MitoSOX™ penetra las células y se localiza en las mitocondrias. Se oxida rápidamente por superóxidos, pero no por otros sistemas de generación de especies reactivas de oxígeno y de especies reactivas de nitrógeno (RNS). El producto oxidado es altamente fluorescente al unirse al ácido nucleico, emitiendo una fluorescencia roja. La sonda MitoSOX™ Red puede utilizarse en mediciones directas de superóxidos generados en las mitocondrias de las células vivas. Asimismo, puede constituir una herramienta útil para el descubrimiento de los agentes que modulan el estrés oxidativo producidos por diferentes procesos. Para la preparación de las muestras que determinan el potencial oxidativo, añadimos 1 µl de la sonda MitoSOXTM Red. Después añadimos PBS (400µl) y la muestra de dosis seminal (100µl). La incubación es de 15min en oscuridad a 37ºC.

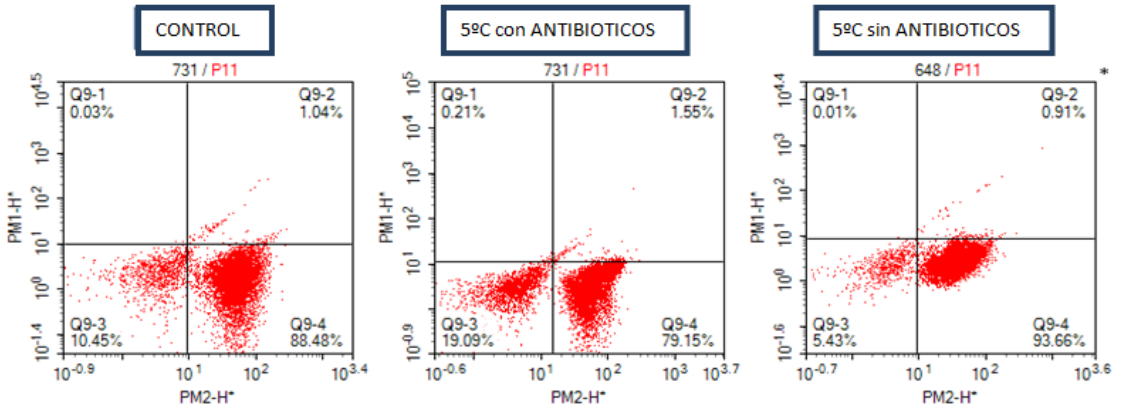


Figura 6.15. Imagen comparativa de la sonda Mitoxos RED en una dosis seminal con diferentes tratamientos a las 96h de conservación.

6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó por medio del programa. SPSS 15.0, IBM Analytics (Madrid, España) es un programa informático utilizado para la realización de análisis estadíticos de datos (Figura 6.16).

En nuestro caso el estudio se realizó para establecer un análisis comparativo entre los cambios producidos por la diferencia en el tiempo de conservación de dosis realizadas a partir del mismo diluyente, y posteriormente para comparar los cambios establecidos por el uso de diferentes tratamientos y tiempos en todos los parámetros medidos, tanto por el sistema de análisis de la motilidad, como por el citómetro de flujo.

Previo al análisis comparativo, se realizó un análisis de normalidad. Este se realiza para comprobar que la hipótesis de distribución normal de las muestras se está cumpliendo, y con ello que sean fiables los datos obtenidos en análisis posteriores de los datos. En nuestro caso la prueba de normalidad elegida fue la prueba de Shapiro-Wilk. Esta prueba requiere el cálculo de medias y varianzas, realizadas previamente mediante el programa Microsoft Office Excel 97.2013. A continuación por medio de coeficientes ya tabulados, se va calculando las diferencias entre los diferentes datos ordenados de menos a mayor.

Obteniendo que: $W= D^2/nS^2$ (D es la diferencia de las sumas corregidas).

Cuando $W< 0.05$, el parámetro medido se considera normal, si es mayor, es no significativo y por tanto no normal.

Una vez realizado todo este proceso, se estableció el análisis de medias multivariantes. Esta nos proporciona un análisis de las medias y varianzas, de variables dependientes de una o varias covariables consideradas variables factor. Esta variable factor nos divide la población en grupos (en nuestro caso es el tiempo de conservación). De esta manera conseguimos diferenciar si el efecto que tiene la variable factor sobre las variables dependientes, es o no estadísticamente significativo. Consideramos que es significativo en el momento que $p< 0.05$.

Debemos mencionar que en el presente trabajo, el tamaño muestral utilizado es muy inferior al necesario para la realización de una prueba estadística tan potente como la que se explica anteriormente, por lo tanto, los datos podrían variar en función de un aumento del tamaño muestral y una disminución de las varianzas de las medias.

motilidades 17ºC.sav [Conjunto_de_datos1] - Editor de datos SPSS

Archivo Edición Ver Datos Transformar Analizar Gráficos Utilidades Ventana ?

	Nombre	Tipo	Anchura	Decimales	Etiqueta	Valores	Perdidos	Columnas	Alineación	Medida
1	Verraco	Cadena	8	0		Ninguno	Ninguno	8	Izquierda	Nominal
2	Temperatur	Cadena	8	0		Ninguno	Ninguno	8	Izquierda	Nominal
3	Tiempo	Cadena	8	0		Ninguno	Ninguno	8	Izquierda	Nominal
4	Motiles	Numérico	8	2		Ninguno	Ninguno	8	Derecha	Escala
5	MP	Numérico	8	2		Ninguno	Ninguno	8	Derecha	Escala
6	VCL	Numérico	8	2		Ninguno	Ninguno	8	Derecha	Escala
7	VSL	Numérico	8	2		Ninguno	Ninguno	8	Derecha	Escala
8	VAP	Numérico	8	2		Ninguno	Ninguno	8	Derecha	Escala
9	LIN	Numérico	8	2		Ninguno	Ninguno	8	Derecha	Escala
10	SRT	Numérico	8	2		Ninguno	Ninguno	8	Derecha	Escala
11	WOB	Numérico	8	2		Ninguno	Ninguno	8	Derecha	Escala
12	ALH	Numérico	8	2		Ninguno	Ninguno	8	Derecha	Escala
13	BCF	Numérico	8	2		Ninguno	Ninguno	8	Derecha	Escala
14	TIPOA	Numérico	8	2		Ninguno	Ninguno	8	Derecha	Escala
15										

hivo Edición Ver Datos Transformar Analizar Gráficos Utilidades Ventana ?

Verraco DUR 648

	Verraco	Temperatur	Tiempo	Motiles	MP	VCL	VSL	VAP	LIN	SRT	WOB	ALH	BCF	TIPOA
1	DUR 648	17ºC	24_Ctrl	,84	,38	75,20	33,90	49,80	45,10	68,10	66,20	2,30	9,30	,51
2	DUR 652	17ºC	24_Ctrl	,93	,34	89,40	35,50	54,10	39,70	69,60	60,50	2,90	10,20	,65
3	DUR 731	17ºC	24_Ctrl	,84	,27	96,40	37,10	57,60	38,50	64,40	59,70	3,30	11,20	,61
4	DUR 733	17ºC	24_Ctrl	,56	,15	91,50	28,30	45,90	31,00	61,70	50,20	3,70	9,70	,31
5	PIC 1701	17ºC	24_Ctrl	,14	,06	58,50	27,40	35,50	46,80	77,20	60,60	2,70	9,40	,05
6	PIC 1702	17ºC	24_Ctrl	,61	,28	76,30	32,80	42,60	43,00	76,90	55,90	2,90	10,20	,25
7	DUR 648	17ºC	48_Ctrl	,82	,52	71,70	42,50	51,20	59,30	83,00	71,40	2,40	9,50	,54
8	DUR 652	17ºC	48_Ctrl	,89	,51	79,00	50,00	62,00	63,00	81,00	78,00	2,60	8,30	,65
9	DUR 731	17ºC	48_Ctrl	,83	,48	86,60	53,90	67,50	62,20	79,80	77,90	2,80	8,50	,65
10	DUR 733	17ºC	48_Ctrl	,81	,52	80,40	49,20	59,40	61,20	82,90	73,90	2,80	8,10	,61
11	PIC 1701	17ºC	48_Ctrl	,49	,37	41,20	26,90	31,60	65,20	85,10	76,60	1,60	6,90	,12
12	PIC 1702	17ºC	48_Ctrl	,87	,72	67,90	52,00	56,30	76,90	92,50	83,20	2,10	8,50	,63
13	DUR 648	17ºC	96_Ctrl	,74	,37	72,90	33,40	46,40	45,80	72,00	63,60	2,30	9,90	,34
14	DUR 652	17ºC	96_Ctrl	,90	,26	94,50	37,30	64,00	39,50	58,30	67,70	3,00	9,20	,77
15	DUR 731	17ºC	96_Ctrl	,83	,16	98,70	6,60	62,60	33,20	52,40	63,40	2,90	10,50	,68
16	DUR 733	17ºC	96_Ctrl	,84	,20	95,40	34,10	62,10	35,80	55,00	65,10	3,10	10,00	,66
17	PIC 1701	17ºC	96_Ctrl	,58	,44	48,40	32,40	35,90	67,00	90,30	74,20	1,80	7,10	,16
18	PIC 1702	17ºC	96_Ctrl	,83	,69	55,40	41,50	44,10	74,90	94,00	79,70	1,90	8,70	,41
19														
20														

Figura 6.16. Captura de pantalla de los datos y variables usados en el análisis estadístico

6.8. CULTIVO BACTERIANO

El cultivo bacteriano, fue realizado por la Unidad de diagnóstico de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínico Veterinario (HCV) de Cáceres.

Las bacterias más comunes en el semen porcino son *Streptococcos*, algunas Enterobacterias como *E. Coli*, *Stafilococcos*, algunas *Psedomonas* y *Micrococcos*. No suele haber presencia de anaerobios, y si los hay suelen tratarse de anaerobios facultativos, los cuales también crecen en los medios de crecimiento convencionales. Estas pueden ser flora normal del propio semen o incluso proceder de contaminación por mala praxis en la obtención y manipulación del semen.

Este cultivo fue realizado sobre tres medios de cultivo diferentes. *Agar sangre*, medio de cultivo creado para el crecimiento de una amplia gama de microorganismos. Al estar enriquecido con sangre, de ovino, permite que algunas bacterias que son nutricionalmente exigentes crezcan y vemos la hemolisis del medio. *Caldo BHI*, medio de cultivo líquido que ha sido preparado principalmente para el cultivo de microorganismos de difícil crecimiento y crecimiento rápido entre los que se incluyen bacterias aerobias y/o microaerofilos. Es un medio muy rico en nutrientes creado a partir de celebro de diferentes especies. Por último, medio A*gar MacConkey* es un mmedio selectivo y diferencial especial para el aislamiento de patógenos gram- negativos y ***entéricos*** y diferenciarlos sobre la base de la ***fermentación*** de la ***lactosa***. En su fórmula posee ***cristal violeta*** y las ***sales biliares*** que inhiben el crecimiento de organismos ***gram-positivos***, lo que permite la selección y el aislamiento de bacterias gram-negativas y un indicador rojo de ph que identifica cuando las bacterias entéricas degradan la lactosa del medio.

7. RESULTADOS:

7.1. EFECTO DEL TIEMPO DE CONSERVACIÓN EN LA MOTILIDAD OBJETIVA DE DOSIS SEMINALES DE VERRACO

Tabla 7.1. Efecto del tiempo de conservación en la motilidad de dosis seminales de verraco refrigeradas a 17ºC.

PARÁMETROS	HORAS DE CONSERVACIÓN		
	24h	48h	96h
Espermatozoides motiles (%)	65,20 ±12,90	78,45± 6,52	78,65± 5,14
Espermatozoides móviles progresivos (%)	24,72 ±5,40[a]	51,83±5,02[b]	35,32 ± 8,60[a,b]
Espermatozoides progresivos rápidos (%)	39,35±10,45	53,47±9,30	50,30 ± 10,54
VCL, Velocidad Curvilínea (µm/sg)	81,00±6.26	71,17 ± 7,20	77,55 ± 9,83
VSL, Velocidad Rectilínea (µm/sg)	32,50±1.74[a,b]	45,75± 4,48[a]	30,88 ± 5,52[b]
VAP, Velocidad Media (µm/sg)	47,58 ± 3.59	54,67± 5,61	52,52 ± 5,33
LIN, Índice de Linealidad (%)	40.68 ±2.54[a]	64,63± 2,83[b]	49,37 ± 7,79[a,b]
STR, Índice de Rectitud (%)	69,65 ±2.85	84,05±2,02	70,33 ± 8,16
WOB, Índice de Oscilación (%)	58,85 ± 2,40[a]	76,83 ±1,80[b]	68,95 ± 2,96[b]
ALH, Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (µm)	2,97 ± 0,22	2,38± 0,21	2,50± 0,26
BCF, Frecuencia de Batida de la Cola (Hz)	10,00 ± 0,31[a]	8,30 ±0,38[b]	9,23 ± 0,55 [a b]

La motilidad objetiva fue determinada por medio de un sistema ISASv1®. Los resultados se expresan como Media ± Error Estándar de la Media (ESM) (n=6). Diferentes superíndices (a,b) muestran la existencia de diferencias estadísticamente significativas para un mismo parámetro ($p < 0.05$).

Tabla 7.2. Efecto del tiempo de conservación a 5ºC en la motilidad objetiva de dosis seminales de verraco.

PARÁMETROS	HORAS DE CONSERVACIÓN	
	48h	96h
Espermatozoides motiles (%)	31,42 ± 7,78	28,27± 7,43
Espermatozoides móviles progresivos (%)	21,38 ±7,77	10,60 ± 3,64
Espermatozoides progresivos rápidos (%)	10,65 ± 3,55	9,67 ± 2,81
VCL, Velocidad Curvilínea (µm/sg)	57,55 ± 5,93	60,18 ± 5,59
VSL, Velocidad Rectilínea (µm/sg)	26,37 ± 1,42	24,18 ± 1,31
VAP, Velocidad Media (µm/sg)	35,63 ± 2,83	36,13 ± 2,73
LIN, Índice de Linealidad (%)	47,25 ± 3,98	41,63 ± 4,14
STR, Índice de Rectitud (%)	74,32 ± 3,55	68,38 ± 5,51
WOB, Índice de Oscilación (%)	62,70 ± 2,64	55,10 ± 7,33
ALH, Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (µm)	2,18 ±0,16	2,42 ± 0,26
BCF, Frecuencia de Batida de la Cola (Hz)	7,82± 0,60	7,15 ± 0,34

La motilidad objetiva fue determinada por medio de un sistema ISASv1®. Los resultados se expresan como Media ± Error Estándar de la Media (ESM) (n=6). Diferentes superíndices (a,b) muestran la existencia de diferencias estadísticamente significativas para un mismo parámetro ($p < 0.05$).

Tabla 7.3. Efecto del tiempo de conservación a 5ºC en un medio sin antibióticos añadidos en la motilidad objetiva de dosis seminales de verraco.

PARÁMETROS	HORAS DE CONSERVACIÓN	
	48h	96h
Espermatozoides motiles (%)	25,63 ± 5,99	19,43 ± 9,18
Espermatozoides móviles progresivos (%)	8,75 ± 1,21	5,88 ± 2,71
Espermatozoides progresivos rápidos (%)	8,23 ± 4,22	6,70 ± 4,01
VCL, Velocidad Curvilínea (µm/sg)	54,93 ± 12,69	59,88 ± 5,99
VSL, Velocidad Rectilínea (µm/sg)	21,08 ± 3,13	22,73 ± 1,98
VAP, Velocidad Media (µm/sg)	32,98 ± 6,19	36,60 ±3,11
LIN, Índice de Linealidad (%)	40,25 ± 3,95	38,38 ± 3,11
STR, Índice de Rectitud (%)	65,15 ± 4,57	61,10 ± 3,20
WOB, Índice de Oscilación (%)	61,58 ± 3,24	61,53 ± 3,11
ALH, Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (µm)	2,08± 0,26	2,40 ± 0,29
BCF, Frecuencia de Batida de la Cola (Hz)	6,03 ± 1,08	6,23 ± 0,35

La motilidad objetiva fue determinada por medio de un sistema ISASv1®. Los resultados se expresan como Media ± Error Estándar de la Media (ESM) (n=4). Diferentes superíndices (a,b) muestran la existencia de diferencias estadísticamente significativas para un mismo parámetro ($p < 0.05$).

7.2. EFECTO COMPARATIVO DE LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN Y DE LA AUSENCIA DE ANTIBIÓTICOS EN LA MOTILIDAD OBJETIVA DE DOSIS SEMINALES DEL VERRACO

7.2.1. Efecto de la temperatura de conservación y de la ausencia de antibióticos en la motilidad y progresividad de los espermatozoides en dosis seminales de verraco

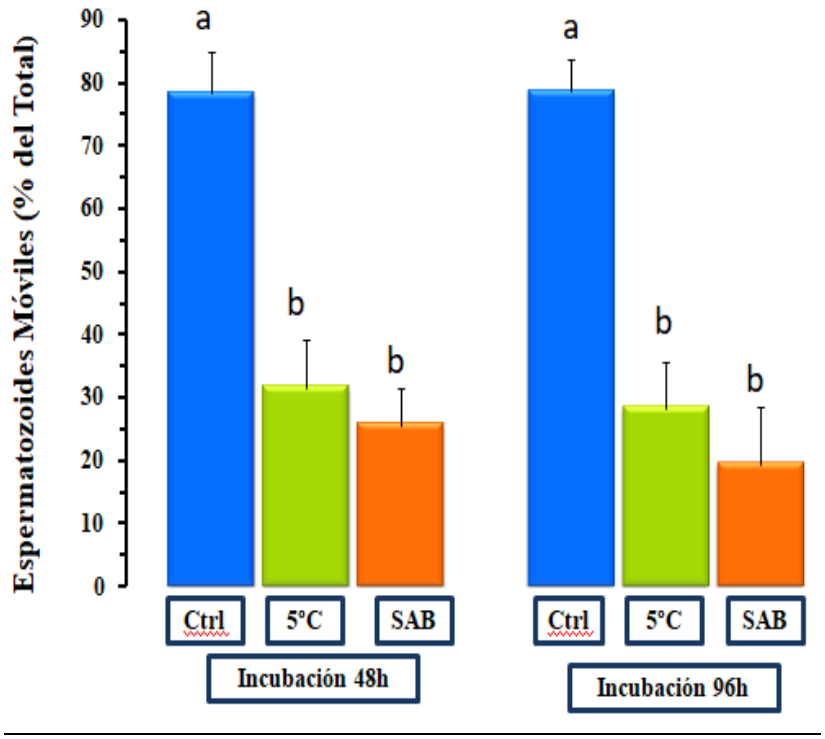


Figura 7.1. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en el porcentaje de espermatozoides mótiles en dosis seminales de verraco. Las dosis se conservaron a 17ºC y a 5ºC, en este último caso en presencia o ausencia de antibióticos. Los resultados se expresan como Media ± ESM (n= 4-6). Diferentes letras (a,b) muestran la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p< 0.05$).

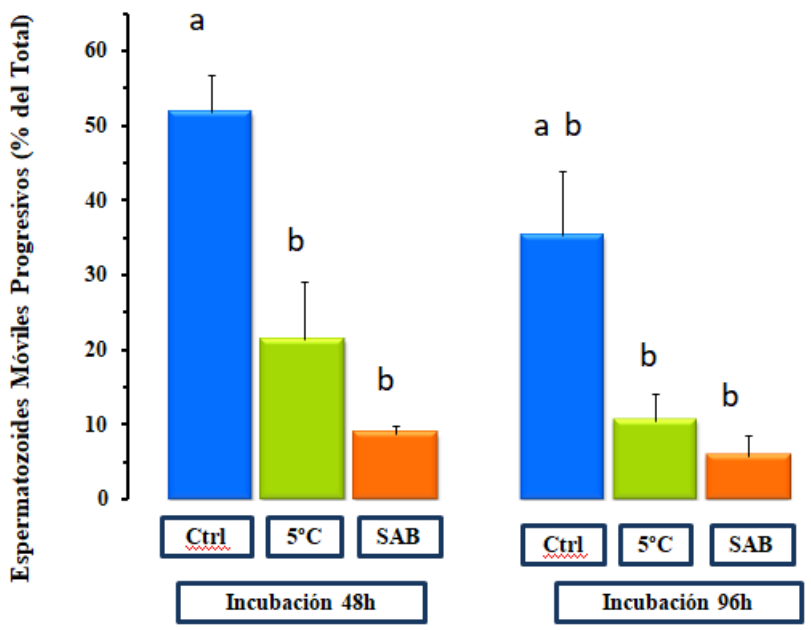


Figura 7.2. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en el porcentaje de espermatozoides mótiles progresivos en dosis seminales de verraco. Las dosis se conservaron a 17ºC y a 5ºC, en este último caso en presencia o ausencia de antibióticos. Los resultados se expresan como Media ± ESM (n= 4-6). Diferentes letras (a,b) muestran la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

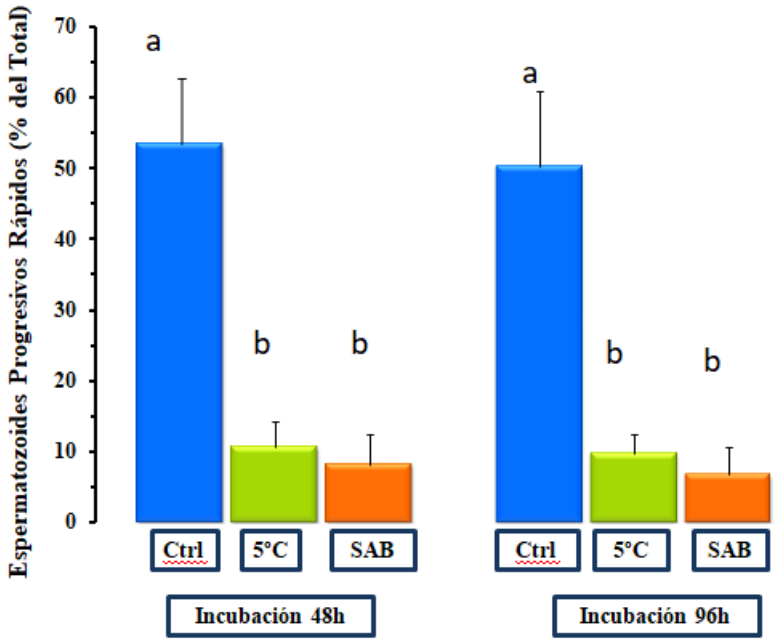


Figura 7.3 Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en el porcentaje de espermatozoides progresivos rápidos en dosis seminales de verraco. Las dosis se conservaron a 17ºC y a 5ºC, en este último caso en presencia o ausencia de antibióticos. Los resultados se expresan como Media ± ESM (n= 4,6). Diferentes letras (a,b) muestran la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

7.2.2. Efecto de la temperatura de conservación y de la ausencia de antibióticos en la velocidad de los espermatozoides en dosis seminales de verraco

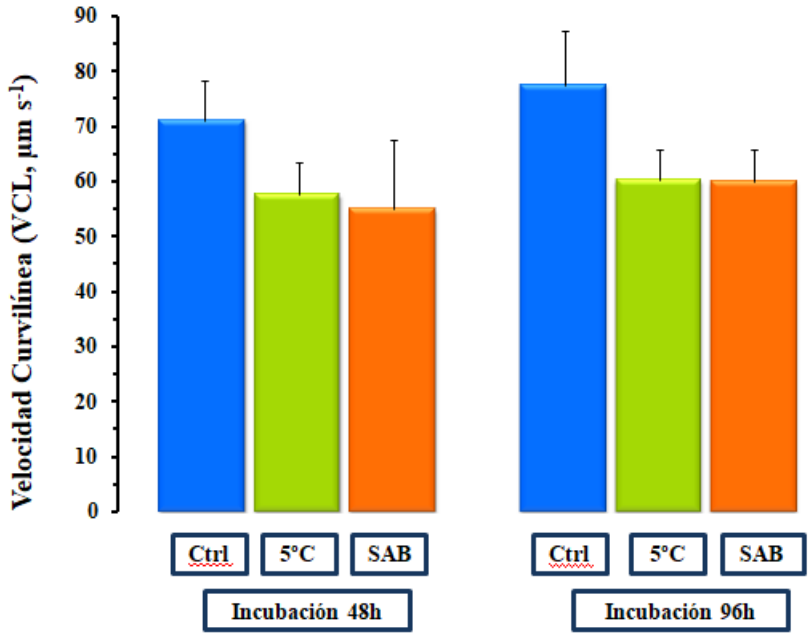


Figura 7.4. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en la velocidad curvilínea de los espermatozoides, en dosis seminales de verraco. Las dosis se conservaron a 17ºC y a 5ºC, en este último caso en presencia o ausencia de antibióticos. Los resultados se expresan como Media ± ESM (n= 4-6). Diferentes letras (a,b) muestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

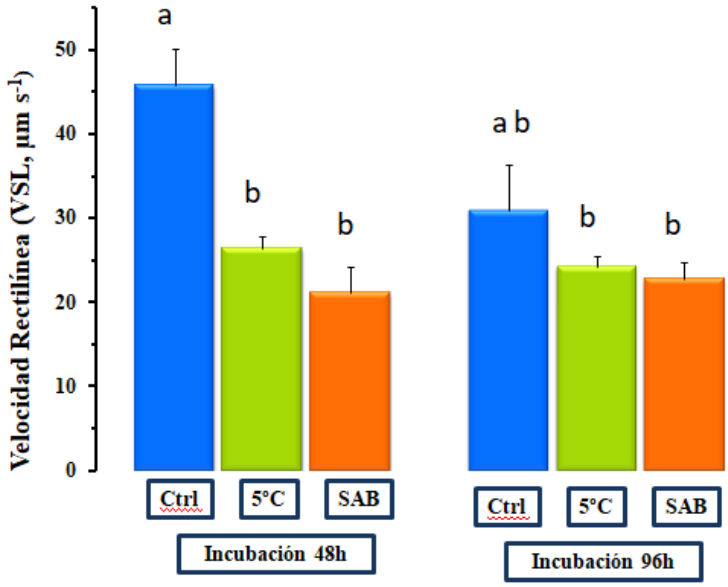


Figura 7.5. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en la velocidad rectilínea de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. Las dosis se conservaron a 17ºC y a 5ºC, en este último caso en presencia o ausencia de antibióticos. Los resultados se expresan como Media ± ESM (n= 4-6). Diferentes letras (a,b) muestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

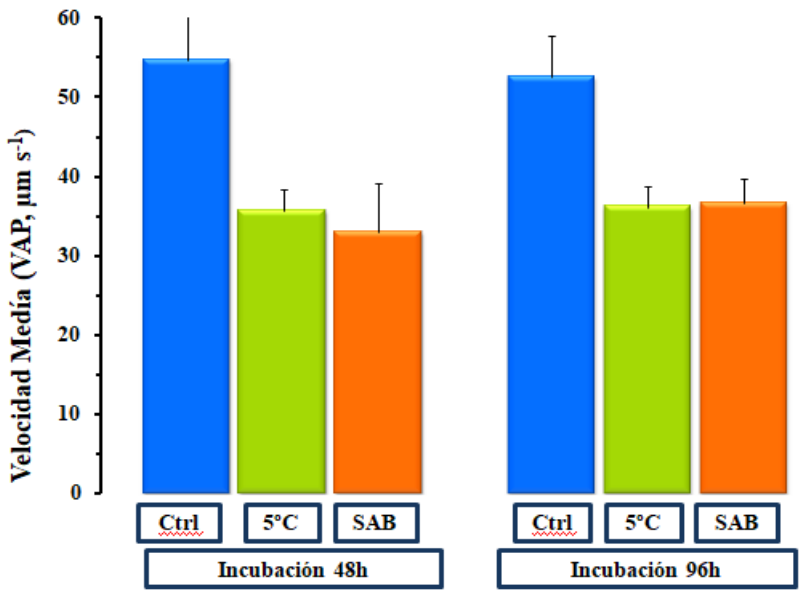


Figura 7.6. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en la velocidad media de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. Las dosis se conservaron a 17ºC y a 5ºC, en este último caso en presencia o ausencia de antibióticos. Los resultados se expresan como Media ± ESM (n= 4-6). Diferentes letras (a,b) muestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

7.2.3. Efecto de la temperatura de conservación y de la ausencia de antibióticos en diferentes índices de motilidad de los espermatozoides en dosis seminales de verraco

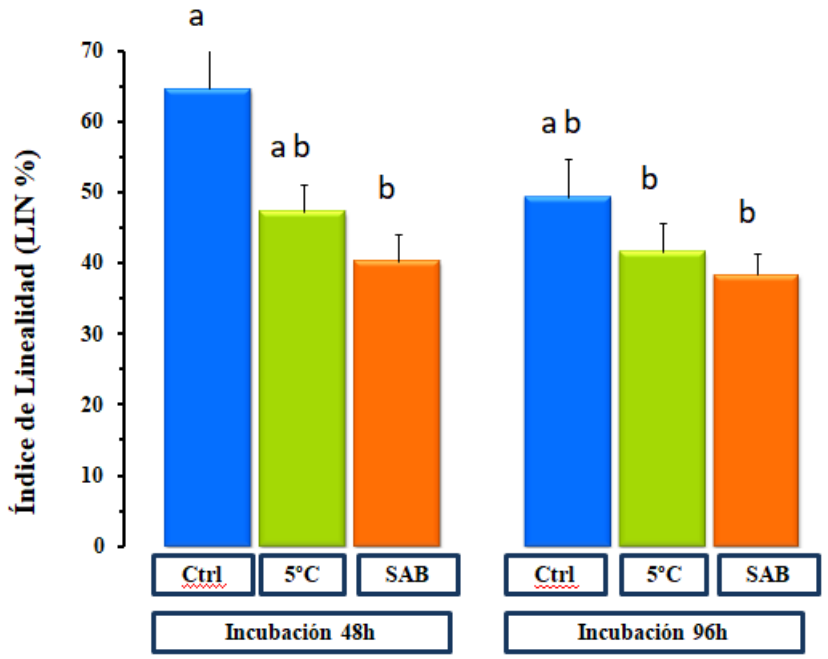


Figura 7.7. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en el índice de linealidad de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. Las dosis se conservaron a 17ºC y a 5ºC, en este último caso en presencia o ausencia de antibióticos. Los resultados se expresan como Media ± ESM (n= 4-6). Diferentes letras (a,b) muestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

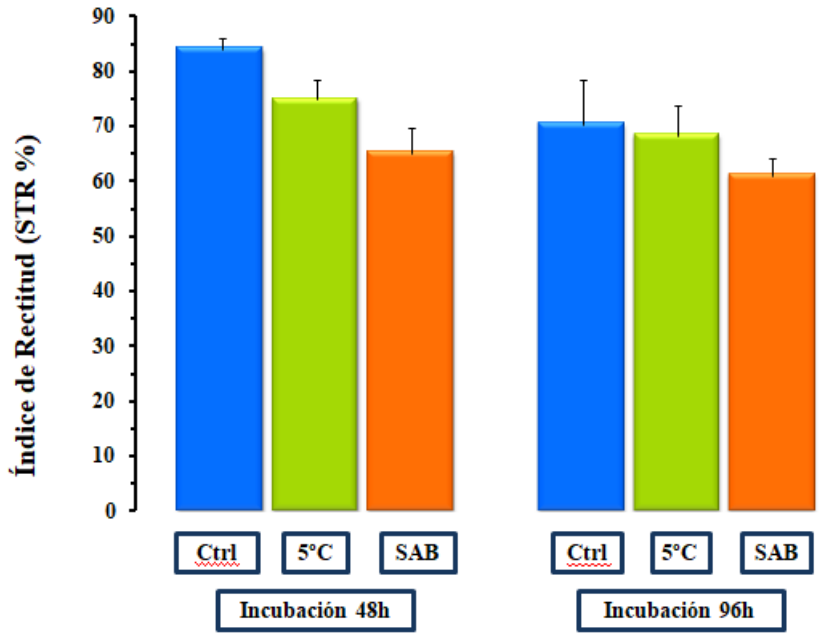


Figura 7.8. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en el índice de rectitud de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. Las dosis se conservaron a 17ºC y a 5ºC, en este último caso en presencia o ausencia de antibióticos. Los resultados se expresan como Media ± ESM (n= 4-6). Diferentes letras (a,b) muestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

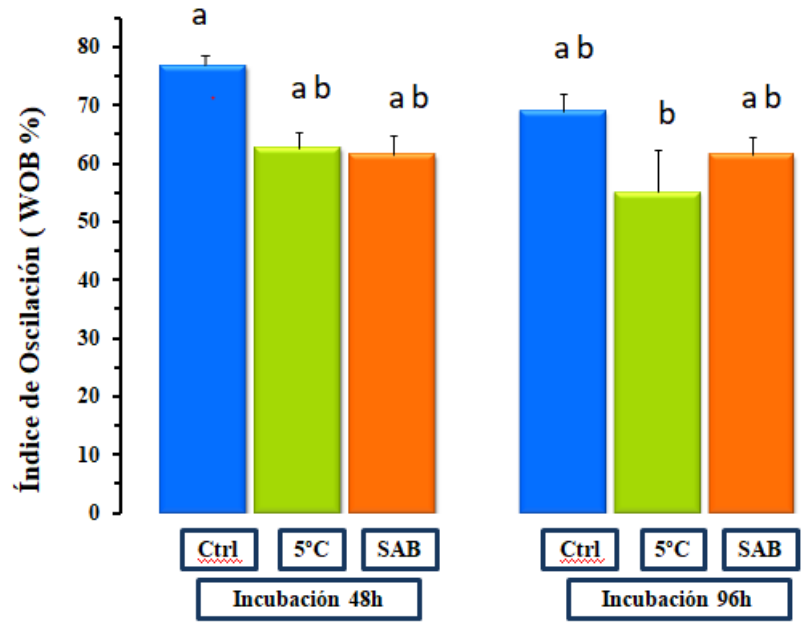


Figura 7.9. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en el índice de oscilación de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. Las dosis se conservaron a 17ºC y a 5ºC, en este último caso en presencia o ausencia de antibióticos. Los resultados se expresan como Media ± ESM (n= 4-6). Diferentes letras (a,b) muestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

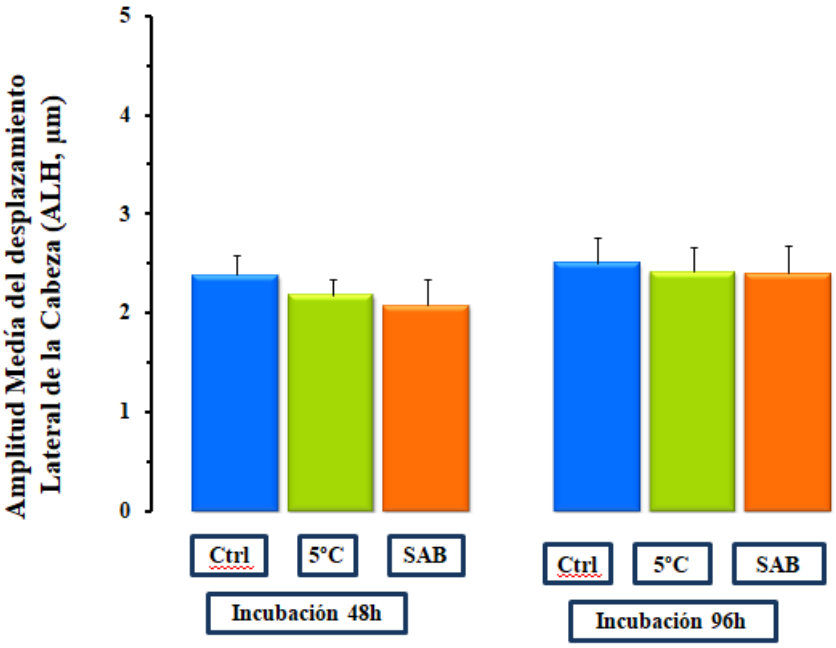


Figura 7.10Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. Las dosis se conservaron a 17ºC y a 5ºC, en este último caso en presencia o ausencia de antibióticos. Los resultados se expresan como Media ± ESM (n= 4-6). Diferentes letras (a,b) muestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas (p< 0.05).

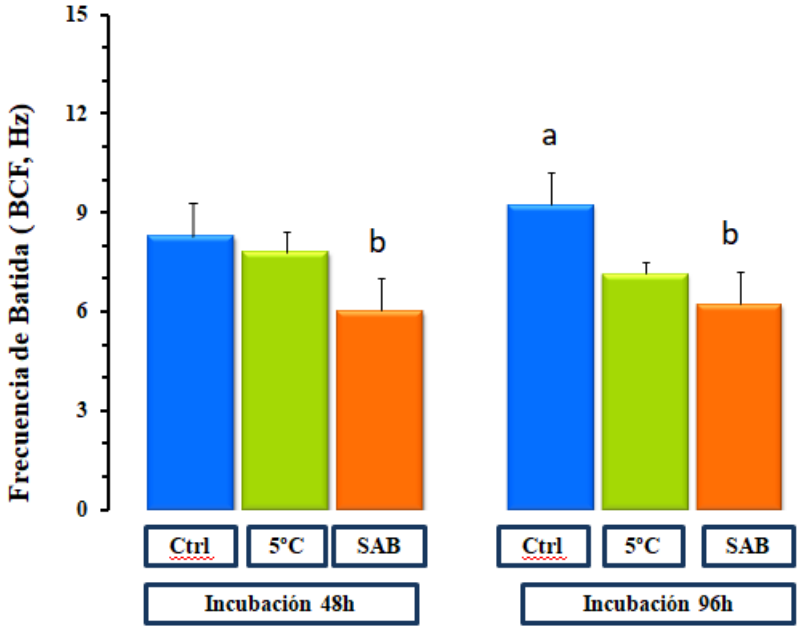


Figura 7.11. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en la frecuencia de batida de la cola de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. Las dosis se conservaron a 17ºC y a 5ºC, en este último caso en presencia o ausencia de antibióticos. Los resultados se expresan como Media ± ESM (n= 4-6). Diferentes letras (a,b,c) muestran la existencia de diferencias estadísticamente significativas (p< 0.05).

7.3. EFECTO DEL TIEMPO DE CONSERVACIÓN EN LA FUNCIONABILIDAD DE DOSIS SEMINALES DE VERRACO:

Tabla 7.4. Efecto del tiempo de conservación en la viabilidad, producción de ROS y estabilidad de la membrana acrosomal en dosis seminales de verraco refrigeradas a 17ºC.

PARÁMETROS	48h DE CONSERVACIÓN	96h DE CONSERVACIÓN
VIABILIDAD	80,77 ± 5,68	65,73 ± 2,96
MitoSOX Red		89,80 ± 3,93
REACCIÓN ACROSÓMICA	8,64 ± 2,86	10,43 ±1,83

Los diferentes parámetros fueron determinados por citometría de flujo. Los resultados se expresan como Media ± ESM (n=6). Diferentes superíndices (a, b) muestran la existencia de diferencias estadísticamente significativas para un mismo parámetro ($p< 0.05$).

Tabla 7.5. Efecto del tiempo de conservación en la viabilidad, producción de ROS y estabilidad de la membrana acrosomal en dosis seminales de verraco refrigeradas a 5ºC.

PARÁMETRO	48h DE CONSERVACIÓN	96h DE CONSERVACIÓN
VIABILIDAD	23,53 ± 4,87	25,12 ± 5,84
MitoSOX Red		89,55 ± 2,56
REACCIÓN ACROSÓMICA	40,93 ± 9,82	19,41 ± 6,56

Los diferentes parámetros fueron determinados citometría de flujo. Los resultados se expresan como Media ± ESM (n=6). Diferentes superíndices (a, b) muestran la existencia de diferencias estadísticamente significativas para un mismo parámetro ($p< 0.05$).

Tabla 7.6. Resultados del efecto del tiempo de conservación en la viabilidad, producción de ROS y estabilidad de la membrana acrosomal en dosis seminales de verraco refrigeradas a 5ºC en ausencia de antibióticos.

PARÁMETRO	48H DE CONSERVACIÓN	96H DE CONSERVACIÓN
VIABILIDAD	20,50 ± 8,09	19,98 ± 7,32
MitoSOX Red		83,87 ± 11,44
REACCIÓN ACROSÓMICA	17,67 ± 10,43	19,49 ± 6,43

Los diferentes parámetros fueron determinados citometría de flujo. Los resultados se expresan como Media ± ESM (n=4). Diferentes superíndices (a, b) muestran la existencia de diferencias estadísticamente significativas para un mismo parámetro ($p< 0.05$).

7.4. EFECTO COMPARATIVO DE LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN Y DE LA AUSENCIA DE ANTIBIOTICOS EN LA FUNCIONALIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES DE DOSIS SEMINALES DE VERRACO

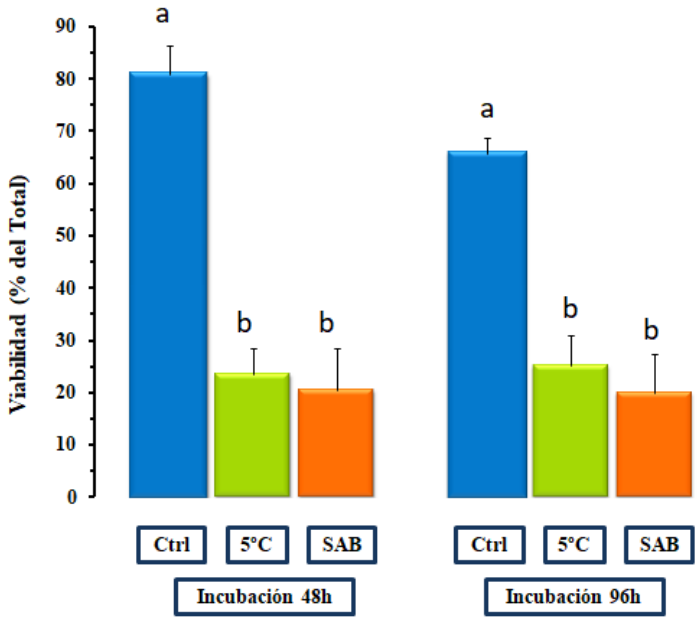


Figura 7.12. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en la viabilidad de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. Las dosis se conservaron a 17ºC y a 5ºC, en este último caso en presencia o ausencia de antibióticos. Los resultados se expresan como Media ± ESM (n= 4-6). Diferentes letras (a,b) muestran la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

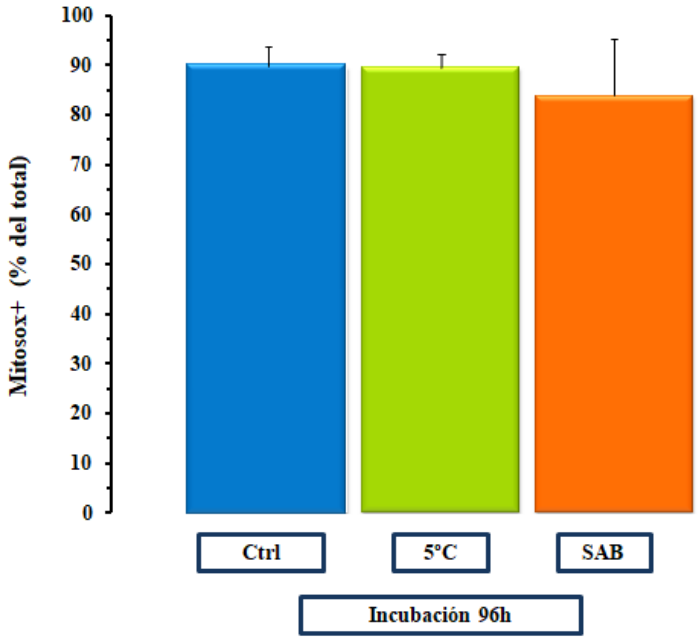


Figura 7.13. Efecto de diferentes tratamientos en las especies reactivas de oxígeno de los espermatozoides en dosis seminales de verraco conservadas 96h. Las dosis se conservaron 96h a 17ºC y a 5ºC, en este último caso en presencia o ausencia de antibióticos. Los resultados se expresan como Media ± ESM (n= 4-6). Diferentes letras (a,b) muestran la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

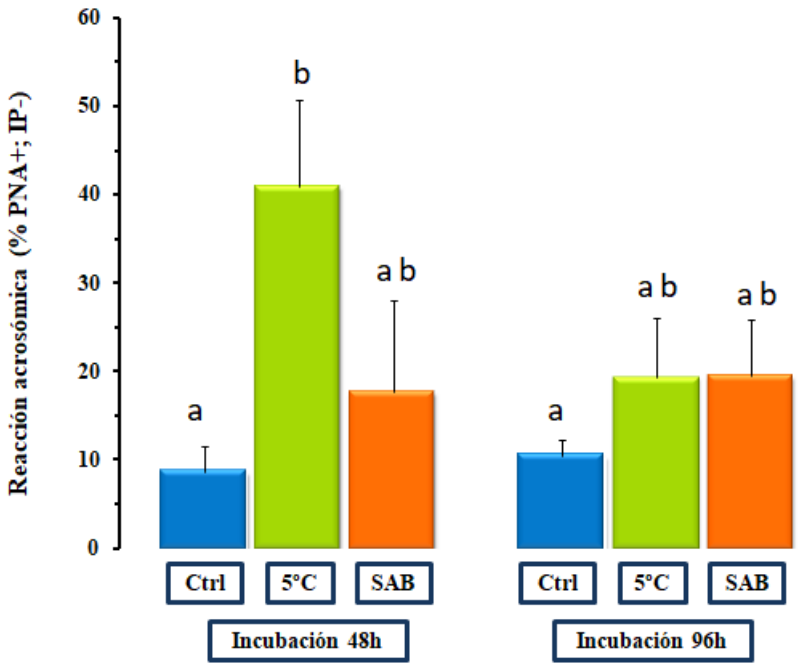


Figura 7.14. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en la reacción acrosómica de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. Las dosis se conservaron a 17ºC y a 5ºC, en este último caso en presencia o ausencia de antibióticos. Los resultados se expresan como Media ± ESM (n= 4-6). Diferentes letras (a,b) muestran la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

7.5. EFECTO DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE ANTIBIÓTICOS EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO EN DOSIS SEMINALES DE VERRACO REFRIGERADAS

Para la determinación de la presencia de bacterias en las dosis seminales de verraco se realizó un cultivo en agar sangre en la unidad de enfermedades infecciosas del *Hospital Clínico Veterinario de Cáceres (HCV)*, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 3.7.).

Tabla 7.7. Efecto de la presencia o ausencia de antibióticos en el crecimiento bacteriano en dosis seminales de verraco refrigeradas.

MUESTRA ANALIZADA			RESULTADO
	VERRACO	**HORAS DE CONSERVACIÓN**	
MRA 17ºC	**648**	96h	SIN CRECIMIENTO
	652	96h	SIN CRECIMIENTO
	731	96h	SIN CRECIMIENTO
	733	96h	SIN CRECIMIENTO
	1701	96h	SIN CRECIMIENTO
		168h	SIN CRECIMIENTO
	1702	96h	SIN CRECIMIENTO
		168h	SIN CRECIMIENTO
MRA 5ºC CON ANTIBIÓTICO	**648**	96h	SIN CRECIMIENTO
		168h	SIN CRECIMIENTO
	652	96h	SIN CRECIMIENTO
		168h	SIN CRECIMIENTO
	731	96h	SIN CRECIMIENTO
		168h	SIN CRECIMIENTO
	733	96h	SIN CRECIMIENTO
		168h	SIN CRECIMIENTO

MUESTRA ANALIZADA			RESULTADO
	VERRACO	**HORAS DE CONSERVACIÓN**	
	1701	96h	SIN CRECIMIENTO
		168h	SIN CRECIMIENTO
	1702	96h	SIN CRECIMIENTO
		168h	SIN CRECIMINETO
MRA 5ºC SIN ANTIBIOTICO	**648**	96h	SIN CRECIMIENTO
		168h	SIN CRECIMIENTO
	733	96h	SIN CRECIMIENTO
		168h	SIN CRECIMIENTO
	1701	96h	SIN CRECIMIENTO
		168h	SIN CRECIMIENTO
	1702	96h	SIN CRECIMIENTO
		168h	SIN CRECIMIENTO

Presencia o ausencia de crecimiento bacteriano en dosis seminales de verraco refrigeradas durante 96h y 168h a 17ºC y 5ºC, en este último caso en presencia o ausencia de antibióticos.

8. DISCUSIÓN Y NUEVAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN:

En la actualidad, la Inseminación Artificial se ha convertido en un pilar fundamental dentro de la producción porcina. En torno al 90% de las hembras en Europa son cubiertas por medio de técnicas de inseminación artificial (Johnson y col., 2000). Existen una serie de normativas que regulan la utilización de la Inseminación Artificial en la cabaña ganadera porcina. En concreto, son el Decreto 2.499/1971, de 13 de agosto, donde se establecen las Normas Reguladoras de la Reproducción Ganadera. El 17 de enero de 1980, se publica una resolución de la dirección General de la Producción Agraria, donde se dictan las normas complementarias para la realización de esta actividad, referentes tanto a las empresas dedicadas al sector, como a los propios animales (Cantero Ciudad, 2010).

El uso de la inseminación artificial, con respecto a la monta natural, presenta una serie de ventajas. Estas las encontramos a nivel de manejo, en lo tocante a la sanidad animal e incluso el aspecto zootécnico (Kubus S.A, 2010). Sin embargo, asociado a los procesos de inseminación artificial, también se ha demostrado la aparición de cepas bacterianas multiresistentes, cuya presencia se debe al uso de antibióticos en los diluyentes utilizados en la preparación de las dosis seminales de verraco (Kubus S.A, 2010).

Uno de los objetivos generales del grupo de investigación en el que me he integrado para la realización del presente trabajo fin de grado es, precisamente, buscar métodos alternativos en la fabricación y conservación de dosis seminales de verraco, que puedan evitar el uso de antibióticos en los diluyentes sin que se produzca crecimiento bacteriano.

En este Trabajo de Fin de Grado, nos hemos planteado como objetivo el estudio del efecto de la conservación de las dosis seminales de verraco a 5ºC en ausencia de antibióticos añadidos en el diluyente, tanto en el crecimiento bacteriano como en la funcionabilidad del espermatozoide de verraco.

Para la realización del análisis del crecimiento bacteriano, se han utilizado medios enriquecidos, tanto en anaerobiosis como en aerobiosis, en los que cabría esperar que, si hubiera una mínima presencia de bacterias en el semen, se generaría un crecimiento visible. Además, en los primeros cultivos, a las 96h de conservación, se efectuaron una serie de diluciones de las dosis, previas al cultivo, para que una vez las colonias hubieran crecido, se pudiera proceder a su contaje. Tras los resultados negativos en este primer cultivo, se volvió a repetir la siembra a las 168h, esta vez ya con dosis seminales sin diluir para aumentar la sensibilidad del ensayo. Nuestros resultados muestran la ausencia de crecimiento bacteriano tanto en las dosis seminales conservadas a 17ºC con antibióticos añadidos como en las conservadas a 5ºC en ausencia de antibióticos añadidos al diluyente. Estos resultados muestran que la conservación a 5ºC en ausencia de antibióticos, inhibe el crecimiento bacteriano. Para determinar la eficacia real de este método de conservación, no debemos olvidar que las condiciones en las que se ha recolectado el semen y en las que se han manipulado las dosis seminales están muy controladas, con un alto grado de asepsia, condiciones que no siempre se cumplen en el trabajo de campo y que disminuyen notablemente la carga bacteriana en las dosis seminales utilizadas en este estudio. Por lo tanto, podemos argumentar que la conservación de dosis seminales de verraco a

5ºC, unido a unas condiciones de asepsia elevadas en el proceso de manipulación seminal, podría ser una buena aproximación para la conservación de dosis de verraco refrigeradas sin la necesidad de añadir antibióticos a los diluyentes.

Nuestros resultados muestran un claro efecto inhibidor en la función del espermatozoide de verraco refrigerado a 5ºC. Existen pocos trabajos que describan el efecto de la conservación de dosis seminales a 5ºC en la motilidad y funcionalidad de los espermatozoides de verraco (Namula y col., 2013; Grossfeld y col. 2016; Thu Nguyen y col., 2016). Sin embargo, existen numerosas publicaciones en las cuales se destaca la existencia de un fenómeno denominado pseudo-capacitación cuando se congelan los espermatozoides de cerdo apareciendo este fenómeno en el proceso de enfriado a 5ºC (Martin-Hidalgo, 2013)

La disminución en la motilidad y viabilidad en espermatozoides de verraco refrigerados a 5ºC, observada en este trabajo, coincide con un estudio anterior donde la conservación de dosis seminales de verraco a 5ºC durante más de dos semanas presenta un claro efecto inhibidor tanto en la motilidad como en la viabilidad (Namula y col., 2013). Este efecto negativo fue revertido por la adición de leche desnatada al diluyente (Namula y col., 2013). Por otra parte, en un estudio reciente se determino que el enfriamiento a 5ºC reduce la concentración de ATP, correlacionando esta disminución con una disminución en el porcentaje de espermatozoides que presentan la membrana plasmática y acrosomal intactas (Thu Nguyen, y col., 2016). De forma similar nuestros resultados muestran que la conservación de dosis seminales de verraco a 5ºC tiene un claro efecto inhibidor en el porcentaje de espermatozoides viables; así como, produce un incremento significativo en el porcentaje de espermatozoides que presentan la membrana acrosomal dañada. Finalmente, señalar que el estudio realizado por Grossfeld y col. (2016) mostró que no habia diferencias significativas al comparar los indices de fertilidad y prolificidad obtenidos tras inseminar cerdas con dosis seminales refrigeradas a 5ºC con dosis seminales refrigeradas a 17ºC. Sin embargo, cabe destacar que estos autores si obtuvieron una reducción no significativa en el porcentaje de espermatozoides motiles con un aumento no significativo en el porcentaje de espermatozoides con la membrana acrosomal dañada.

Si observamos con detenimiento el trabajo presentado por Grossfeld y col. (2016), presenta diferencias significativas en el protocolo de enfriamineto seguido con respecto al seguido en este trabajo fin de grado. En primer lugar, los autores utilizan un diluyente especificamente diseñado para contrarestar, en lo posible, los efectos adversos de la refrigeración de los espermatozoides de verraco a 5ºC. En segundo lugar, en el citado trabajo, se realiza una incubación de 6h de las dosis seminales a temperatura ambiente previa a su refrigeración a 5ºC. Por otra parte, nuestros resultados sugieren que es en las primeras horas de la refrigeración a 5ºC cuando se producen los efectos deletereos en los espermatozoides de verraco, ya que no hay diferencias significativas entre las 48h y las 96h en los diferentes parámetros estudiados en dosis seminales conservadas a 5ºC.

Nuestros resultados y los obtenidos por otros autores, sugieren que el efecto negativo observado en la función de los espermatozoides de verraco durante su refrigeración y conservación a 5ºC se producen, fundamentalmente, en el proceso de enfriamiento desde la temperatura de trabajo hasta la temperatura de conservación, 5ºC. Teniendo en cuenta esta

hipótesis, nos planteamos continuar el estudio siguiendo dos líneas de trabajo fundamentales: 1) optimización del protocolo de enfriamiento de las dosis seminales a 5ºC, modificando los tiempos con la inclusión de periodos de incubación a diferentes temperaturas o la realización de rampas de enfriamiento a velocidad controlada y 2) usar diluyentes especificamente diseñados para amortiguar los efectos negativos que se producen durante el proceso de enfriamiento y conservacion de las dosis seminales de verraco a 5ºC.

- ✓ *NUEVAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN:*

- ❖ Creemos que nuestros resultados indican la prioridad de trabajar en la optimización del proceso de enfriado de las dosis seminales a 5ºC para evitar el efecto negativo que tiene tanto en la motilidad como en la funcionalidad de las membranas, como se ha mostrado en el presente trabajo. Una posible línea de investigación a desarrollar en el futuro es la utilización de rampas de temperatura con el objetivo de amortiguar el shock térmico observado.
- ❖ También sería interesante el uso de diluyentes específicos de refrigeración a bajas temperaturas, que amortigüen el daño que dicha bajada produce sobre los espermatozoides.

9. CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos en la realización de este trabajo nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. En ausencia de antibióticos, la refrigeración y conservación a 5ºC de las dosis seminales de verraco inhibe el crecimiento bacteriano.
2. La refrigeración de dosis seminales de verraco a 5ºC tiene un efecto deletéreo en los espermatozoides de esta especie.

10. BIBLIOGRAFÍA:

Abdel-Salam, Z., y Harith, M. A. (2015). Laser researches on livestock semen and oocytes: A brief review. *Journal of Advanced Research*, *6*(3), 311–317.

Althouse, G. C., Kuster, C. E., Clark, S. G., y Weisiger, R. M. (2000). Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*, *53*(5), 1167–1176.

Althouse, G. C., y Lu, K. G. (2005). Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*, *63*(2 SPEC. ISS.), 573–584.

Althouse, G. C., y Rossow, K. (2011). The potential risk of infectious disease dissemination via artificial insemination in swine. *Reproduction in Domestic Animals*, *46*(SUPPL. 2), 64–67.

Andrabi, S. M. H., Ahmad, N., y Abbas, A. (2001). Effect of two different antibiotic combinations on fertility of frozen buffalo and Sahiwal Bull semen. *ResearchGate*, *21*(January), 166–169.

Boman, H. ., Steiner, H., Hultmark, D., Engström, Å., y Bennich, H. (2009). Insect Two Antibacterial Proteins Involved in Pillars Article: Sequence and Specificity of. *The Journal of Immunology*, *182*, 6635–6637. /

Bortolozzo, F. P., Menegat, M. B., Mellagi, A. P. G., Bernardi, M. L., y Wentz, I. (2015). New Artificial Insemination Technologies for Swine. *Reproduction in Domestic Animals.*, *50 Suppl 2*, 80–84.

Bortolozzo, F. P., Willmen, T., y Petzoldt, R. (1994). The initial ferrilizing capacity of longterm- stored liquid boar semen following pre- and postovulatory insemination. *Theriogenology*, 1367–1377.

Broekhuijse, M. L. W. J., Feitsma, H., y Gadella, B. M. (2012). Artificial insemination in pigs: predicting male fertility. *The Veterinary Quarterly*, *32*(3–4), 151–157.

Buhr, M. M., Fiser, P., Bailey, J. L., y Curtis, E. F. (2001). Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *Journal of Andrology*, *22*(6), 961–969.

Cantero Ciudad, C. (2010). Inseminacion artificial del ganado porcino. *Ministerio De Agricultura, Pesca Y Alimentacion*, *1*, 1–5.

Colenbrander, B., Feitsma, H., y Grooten, H. J. (1993). Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, *48*, 207–215.

Condoy, C. (2017). Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina. *Revista Electrónica Veterinaria*, *18*, 1–11.

Conejo-Nava, J., Fierro, R., Gutierrez, C. G., y Betancourt, M. (2003). Membrane status and in vitro capacitation of porcine sperm preserved in long-term extender at 16 degrees C. *Archives of Andrology*, *49*(4), 287–295.

Dathe, M., Meyer, J., Beyermann, M., Maul, B., Hoischen, C., y Bienert, M. (2002). General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1558*(2), 171–186.

Frunza, I., Cernercu, H., y Korodi, G. (2008). Physical and chemical parameters of boar sperm.

Gadea, J. (2001). Evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mendiante la fecundación in vitro.

Gadea, J. (2003). Review: semen extenders used in the artificial inseminarion of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*, *1*(2), 17.

Gagnon, C. (1995). Regulation of sperm motility at the axonemal level. *Reproduction, Fertility, and Development*, *7*, 847–855.

Gibbons, I. R. (1960). On Flagellar Structure in Certain Flagellates. *The Journal of Cell Biology*, *7*(4), 697–716.

Gonzalez Villalobos, D. (2008). Evaluación de los parametros morfometricos de los espermatozoides como herramienta para determinar la calidad seminal de machos porcino.

Green, C. E. ., y Watson, P. F. (2001). Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, *122*(6), 889–898.

Grossfeld, R., Peralta, W., Weitze, K., y Waberski, D. (2016). Antibiotic-free hypothermic storage of boar semen in Androstar +5 extender results in similar fertility results compared to semen stored at 17°C in extender with antibiotic content. *Animal Reproduction Science*, *169*(2016), 125.

Guerrero;, M. G. M. R. V. (2008). Inseminación intrauterina profunda, *110*, 110–112.

Hancock, R. E. W., y Patrzykat, A. (2002). Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Current Drug Targets. Infectious Disorders*, *2*(1), 79–83.

Harrison, R. A. P., Dott, H. M., y Foster, G. C. (1982). Bovine Serum-Albumin, Sperm Motility, and the Dilution Effect. *Journal of Experimental Zoology*, *222*(1), 81–88.

Iguácel Soteras, F., y Espada Domingo, M. (2012). Coyuntura actual del sector porcino aragonés : Empleo generado , bienestar animal y Análisis DAFO.

Januskauskas, A., Johannisson, A., Söderquist, L., y Rodriguez-Martinez, H. (2000). Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology*, *53*(4), 859–875.

Johnson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P., y Maxwell, W. M. (2000a). Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, *62*(1–3), 143–172.

Johnson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P., y Maxwell, W. M. (2000b). Storage of boar semen. *Anim Reproduction Science*, *64*(1–2), 133–134.

Julca Salvador, A. E. (2015). Universidad Nacional Agraria de la Selva Tingo María.

King, G. J., y Macpherson, J. W. (1966). Alkaline and acid phosphatase activity, pH and osmotic pressure of boar semen. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, *30*(11), 304–307. Retrieved from

Knox, R. V. (2016). Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*, *85*(1), 83–93.

Kubus S.A. (2010). *Inseminación artificial porcina*.

Lim, F., y Sun, A. (1980). Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*, *210*(4472), 908–910.

Lindemann, C. B., y Kanous, K. S. (1989). Regulation of mammalian sperm motility. *Archives of Andrology*, *23*(1), 1–22.

Luther, A., Le Thi, X., Schäfer, J., Schulze, M., y Waberski, D. (2018). Irradiation of semen doses with LED- - based red light in a photo chamber does not improve in vitro quality of thermically stressed boar spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, (December 2017), 8–11.

Maroto Martín, L., Muñoz, E. ., De Cupere, F., Van Driessche, E., Echemendia-Blanco, D., Rodríguez Machado, J., y Beeckmans, S. (2010). Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Animal Reproduction Science*, *120*(1–4), 95–104.

Martín Rillo, S. , Lapuente Granados, S., García Ruvalcaba, J.A, y Gil Pascual, J. (1994). La

Inseminación artificial en España. *Mundo Ganadero*, 46–54.

Morrell, J. ., y Wallgren, M. (2014). Alternatives to Antibiotics in Semen Extenders: A Review. *Pathogens*, *3*(4), 934–946.

Mortimer, S. T. (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction*, *3*(5), 403–439.

Mortimer, S. T. (2000). CASA--practical aspects. *Journal of Andrology*, *21*(4), 515–524.

Namula, Z., Sato, Y., Kodama, R., Morinaga, K., Luu, V. V. y Taniguchi, M. (2013). Motility and fertility of boar semen after liquid preservation at 5°C for more than 2 weeks. *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho*, *84*(8), 600–606.

Nebel, R. L., Vishwanath, R., McMillan, W. H., y Pitt, C. J. (1996). Microencapsulation of bovine spermatozoa: Effect of capsule membrane thickness on spermatozoal viability and fertility. *Animal Reproduction Science*, *44*(2), 79–89.

Ochoa, G., y Ortega, R. (2008). Evaluacion in Vitro E in Vivo De Semen Porcino Conservado En Diluyentes De Larga Duracion G. *Revista Computarizada de Producción Porcina*, *15*(número 4), 298–306.

Okazaki, T., Mihara, T., Fujita, Y., Yoshida, S., Teshima, H., y Shimada, M. (2010). Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar sperm during liquid storage and cryopreservation. *Theriogenology*, *74*(9), 1691–1700.

Ortman, K., y Rodriguez-Martinez, H. (1994, February). Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. Germany.

Preece, D., Chow, K. W., Gomez-Godinez, V., Gustafson, K., Esener, S., Ravida, N. y Berns, M. W. (2017). Red light improves spermatozoa motility and does not induce oxidative DNA damage. *Scientific Reports*, *7*(March), 1–9.

Ramírez C, M. L. (2010). Comparación de tres técnicas de tinción para la evaluación de la biometría de la cabeza espermática en semen criopreservado de toros.

Rath, D., Bathgate, R., Rodriguez-Martinez, H., Roca, J., Strzezek, J., y Waberski, D. (2009). Recent advances in boar semen cryopreservation. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, *66*, 51–66.

Rodríguez martínez, H. (2008). Evaluación de la calidad seminal en el verraco.

Sánchez-Sánchez, R., Martín-Lluch, M., De la Cruz-Vigo, P., Pérez-Garnelo, S., Carrascosa, C., y González-Bulnes, A. (2017). Biotecnología de la encapsulación del semen porcino., *204*, 18–23.

Schulze, M., Ammon, C., Rüdiger, K., Jung, M., y Grobbel, M. (2015). Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. *Theriogenology*, *83*(3), 430–437.

Schulze, M., Dathe, M., Waberski, D., y Müller, K. (2016). Liquid storage of boar semen: Current and future perspectives on the use of cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*, *85*(1), 39–46.

Schulze, M., Junkes, C., Mueller, P., Speck, S., Ruediger, K., Dathe, M., y Mueller, K. (2014). Effects of cationic antimicrobial peptides on liquid-preserved boar spermatozoa. *Plos One*, *9*(6), 1–9.

Soede, N. M., Wetzels, C. C., Zondag, W., Hazeleger, W., y Kemp, B. (1995). Effects of a second insemination after ovulation on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *Journal of Reproduction and Fertility*, *105*(1), 135–140.

Sone, M., Ohmura, K., y Bamba, K. (1982). Effects of various antibiotics on the control of bacteria in boar semen. *The Veterinary Record*, *111*(1), 11–14.

Speck, S., Courtiol, A., Junkes, C., Dathe, M., Müller, K., y Schulze, M. (2014). Cationic

synthetic peptides: Assessment of their antimicrobial potency in liquid preserved boar semen. *Plos One*, *9*(8), 1–8.

Tardif, S., Laforest, J. P., Cormier, N., y Bailey, J. L. (1999). The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology*, *52*(3), 447–459.

Thu Nguyen, Q. , Wallner U. , Schimicke, M. , Waberski, D., H. H. (2016). Energy metabolic state in hypothermically stored boar spermatozoa using a revised protocol for efficient ATP extraction. *The Company of Biologists.*, *5*(11), 1743–1751.

Toledo Castillo, M., y Herrera Matín, J. (2014). Uso responsable de los antibióticos (I). *Anaporc*, (I), 12–18.

Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility, and Development*, *7*(4), 871–891.

Watson, P. F. (1996). Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reproduction in Domestic Animals*, *31*(1), 135–140.

Yeste, M., Castillo-Martín, M., Bonet, S. y Rodríguez-Gil, J. E. (2018). Impact of light irradiation on preservation and function of mammalian spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, (December 2017), 1–14.

Zaiou, M. (2007). Multifunctional antimicrobial peptides: Therapeutic targets in several human diseases. *Journal of Molecular Medicine*, *85*(4), 317–329.

Zhao, X. Wu, H., Lu, H., Li, G., y Huang, Q. (2013). LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides. *Plos One*, *8*(6), 6–11.

11. OTROS ÍNDICES

Índice de tablas:

Tabla 4.1. Representación del porcentaje de anormalidades típicas del eyaculado porcino. ...*8*

Tabla 4.2. Representación de los tipos de anormalidades que pueden presentar los espermatozoides porcinos *9*

Tabla 6.1.Composición del tampón fosfato salino (PBS).....*24*

Tabla 6.2. Sondas usadas para la realización del análisis citométrico del presente trabajo. ..*33*

Tabla 7.1. Efecto del tiempo de conservación en la motilidad de dosis seminales de verraco refrigeradas a 17ºC.....*39*

Tabla 7.2. Efecto del tiempo de conservación a 5ºC en la motilidad objetiva de dosis seminales de verraco. *40*

Tabla 7.3. Efecto del tiempo de conservación a 5ºC en un medio sin antibióticos añadidos en la motilidad objetiva de dosis seminales de verraco. *41*

Tabla 7.4. Efecto del tiempo de conservación en la viabilidad, producción de ROS y estabilidad de la membrana acrosomal en dosis seminales de verraco refrigeradas a 17ºC.....*48*

Tabla 7.5. Efecto del tiempo de conservación en la viabilidad, producción de ROS y estabilidad de la memrana acrosomal en dosis seminales de verraco refrigeradas a 5ºC.....*48*

Tabla 7.6. Resultados del efecto del tiempo de conservación en la viabilidad, producción de ROS y estabilidad de la membrana acrosomal en dosis seminales de verraco refrigeradas a 5ºC en ausencia de antibióticos. *48*

Tabla 7.7. Efecto de la presencia o ausencia de antibióticos en el crecimiento bacteriano en dosis seminales de verraco refrigeradas. *51*

Índice de figuras:

Figura 4.1. Representación de la anatomía del espermatozoide.. 4

Figura 4.2. Esquema explicativo de la estructura del axonema flagelar. 5

Figura 4.3. Representación de los catéteres usados para cada proceso de inseminación 14

Figura 4.4. Representación de los diferentes tipos de inseminación. 15

Figura 4.5. Esquema de la actuación de los AMPs. 21

Figura 6.1. Extracción seminal por el método de la mano enguantada. 25

Figura 6.2. Sala de extracción y potro para la monta del verraco en el proceso de recolección (TECNOGENEXT).....25

Figura 6.3. Imagen de la cámara Makler ®. 26

Figura 6.4. Representación de cómo cargar la cámara Makler ®. 27

Figura 6.5. Representación de los tiempos usados para la medición de la motilidad. 28

Figura 6.6. Imagen de la cámara Leja® de 8 cámaras y 20 micras, usada para el análisis de la motilidad de las dosis seminales 29

Figura 6.7. Representación de la carga de una cámara Leja®. 29

Figura 6.8. Captura de pantalla de la configuración del sistema ISASvc ®.....30

Figura 6.9. Captura de pantalla del inicio del sistema ISASvc ® 30

Figura 6.10. Imagen comparativa de las trayectorias seguida por los espermatozoides medidos por el sistema ISASvc ®. 31

Figura 6.11. Imagen comparativa de una trayectorias lineal y curvilínea de dos espermatozoides medidos por el sistema ISASvc ®. 31

Figura 6.12. Citómetro de flujo del laboratorio SINTREC. 33

Figura 6.13. Imagen comparativa de la viabilidad en una dosis seminal con diferentes tratamientos a las 48 h de conservación. 34

Figura 6.14. Imagen comparativa de la reacción acrosómica en una dosis seminal con diferentes tratamientos a las 48 h de conservación. 35

Figura 6.15. Imagen comparativa de la sonda Mitoxos RED en una dosis seminal con diferentes tratamientos a las 96h de conservación. 35

Figura 6.16. Captura de pantalla de los datos y variables usados en el análisis estadístico ...37

Figura 7.1. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en el porcentaje de espermatozoides mótiles en dosis seminales de verraco. 42

Figura 7.2. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en el porcentaje de espermatozoides mótiles progresivos en dosis seminales de verraco. 43

Figura 7.3. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en el porcentaje de espermatozoides progresivos rápidos en dosis seminales de verraco. 43

Figura 7.4. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en la velocidad curvilínea de los espermatozoides, en dosis seminales de verraco. 44

Figura 7.5. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en la velocidad rectilínea de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. 44

Figura 7.6. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en la velocidad media de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. 45

Figura 7.7. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en el índice de linealidad de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. 45

Figura 7.8. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en el índice de rectitud de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. 46

Figura 7.9. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en el índice de oscilación de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. 46

Figura 7.10. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. 47

Figura 7.11. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en la frecuencia de batida de la cola de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. 47

Figura 7.12. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en la viabilidad de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. 49

Figura 7.13. Efecto de diferentes tratamientos en las especies reactivas de oxígeno de los espermatozoides en dosis seminales de verraco conservadas 96h. 49

Figura 7.14. Efecto de diferentes tratamientos y tiempos de conservación en la reacción acrosómica de los espermatozoides en dosis seminales de verraco. 50

Abreviaturas

ADN: adenosin desoxiribonucleico

ADP: adenosin difosfato

ALH: Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide

AMP: adenosin monofosfacto

AMPc: adenosin monofosfato ciclico

AMPs: Peptidos antimicrobianos

ATP: adenosin trifosfato

BCF: Frecuencia de Batida de la Cola

BHI: Brain Heart Infusion

CIA: centro de inseminación artificial

DUI: inseminación artificial profunda

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FL: Laser fluorescente

HCV: Hospital Clínico Veterinario

IA: inseminación artificial

IP: yoduro de propidio

ISASvc: Integrated Semen Analysis System

IVT: Illinois Variable Temperature

LED: ligh emetting diodes

LIN: Índice de Linealidad

MP:Espermatozoides móviles progresivos

MT: Espermatozoides motiles totales

OIE: Organización Internacional de Epizootias

PBS : Tampón Fosfato Salino

PCAI: inseminación post-cervical

PNA-FITC: aglutinina de cacahuete unida a la sonda fluorescente isocianato de fluoresceína

SAI inseminación cervical

SINTREP: Señalización Intracelular y Tecnología de la Reproducción

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

STR: Índice de Rectitud

UE: Unión Europea

VAP: Velocidad Media

VCL: Velocidad Curvilínea

VSL: Velocidad Rectilínea

WOB: Índice de Oscilación