



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD
ESPERMÁTICA Y DETERMINACIÓN DE
CRECIMIENTO BACTERIANO EN DOSIS
SEMINALES DE VERRACO CON DILUYENTE
DE LARGA DURACIÓN SOMETIDAS A
ESTRÉS TÉRMICO**

TESIS

Que para obtener el título de
Médica Veterinaria Zootecnista

PRESENTA

Elizabeth Campos Ortega

ASESORES DE TESIS

Dra. María Elena Trujillo Ortega

M en C. Verónica Rojas Trejo

M en C. Rolando Beltrán Figueroa



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mis padres, Elizabeth y Salvador.

A mis hermanos, Salvador y Claudia.

A mi esposo y apoyo incondicional, Jahir.

A mi cuñada Erendira y mis sobrinos León Salvador y Valeria.

A mi mejor amigo y compañero de carrera, César Adrian.

A mis asesores Dra. María Elena, Dra. Verónica y Dr. Rolando.

Al Dr. Eslí Tapia Vale (†).

A mi perrita y gran compañera de desveladas, Pupe.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la vida y brindarme de salud y bendiciones.

A mis padres, Elizabeth y Salvador, por su amor y apoyo incondicional a lo largo de mi vida, por darme valores y una carrera profesional.

A mi esposo, Jahir, por tu cariño, por incitarme a ser una mejor persona, por recordarme siempre que puedo lograr mis sueños y por que sé que puedo contar contigo siempre.

A mi mejor amigo, Adrian, por tu apoyo e incondicional amistad, por que “siempre sale”.

A mis asesores y amigos, Verito y Rol, por su paciencia, apoyo, amistad y cariño en todo este proceso de aprendizaje y crecimiento.

Al Dr. Eslí Tapia Vale (†) por su nobleza, por su apoyo, por confiar en este proyecto y por abrirme las puertas.

A mi amada Universidad Nacional Autónoma de México y a mi hermosa Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por haberse convertido en mi segundo hogar y haberme permitido formarme en sus aulas.

A mis sinodales Dra. María Elena Trujillo Ortega, Dr. Oscar Gutiérrez Pérez, Dra. Susana Espinosa Hernández, Dr. Lázaro Verdiguél Fernández, Dr. Rodrigo Mena Bañuelos, por la paciencia y apoyo brindado.

A todos mis profesores quienes me han forjado como una profesional en esta etapa universitaria, tanto dentro como fuera de las aulas de clase.

CONTENIDO

Tabla de contenido

DEDICATORIAS.....	- 2 -
AGRADECIMIENTOS.....	- 3 -
CONTENIDO.....	- 4 -
RESUMEN	- 6 -
INTRODUCCIÒN	- 7 -
Inseminación artificial (IA)	- 7 -
Manejo de los verracos y la producción de semen	- 12 -
Temperatura	- 14 -
Diluyentes de semen porcino	- 15 -
Evaluación de la fertilidad del verraco y del semen	- 18 -
Evaluación de semen por Sistema CASA.....	- 20 -
Bacteriospermia.....	- 25 -
JUSTIFICACIÒN.....	- 29 -
HIPÒTESIS	- 30 -
OBJETIVO GENERAL	- 31 -
OBJETIVOS ESPECÌFICOS.....	- 32 -
MATERIAL Y MÉTODOS	- 33 -
Recepción de dosis seminales.....	- 33 -
Metodología semanal	- 35 -
<i>Registro de las dosis seminales</i>	- 35 -
<i>Preparación de las muestras</i>	- 36 -
<i>Grupos experimentales</i>	- 37 -
Análisis y evaluación de calidad espermática (Sistema CASA AndroVision® y tinciones de fluorescencia).....	- 38 -

Módulo de “Morfología y Morfometría” y “Motilidad y Concentración”	- 38
-	
Módulo de “Análisis Avanzados” (tinciones de fluorescencia)	- 41 -
Análisis Bacteriológico	- 48 -
Preparación de medios de cultivo	- 48 -
Cultivo bacteriológico	- 49 -
Aislamiento bacteriológico	- 51 -
Análisis estadísticos	- 55 -
Temperaturas de transporte	- 55 -
Parámetros de calidad espermática	- 56 -
RESULTADOS	- 57 -
Temperatura de transporte	- 57 -
Parámetros de calidad espermática	- 58 -
Recuento bacteriano total y aislamiento de bacterias	- 61 -
DISCUSIÓN	- 63 -
CONCLUSIONES	71
REFERENCIAS	72

RESUMEN

CAMPOS ORTEGA ELIZABETH. Evaluación de la calidad espermática y determinación de crecimiento bacteriano en dosis seminales de verraco con diluyente de larga duración sometidas a estrés térmico (bajo la dirección de: Dra. María Elena Trujillo Ortega, M EN C. Verónica Rojas Trejos y M EN C. Rolando Beltrán Figueroa).

Actualmente, el uso de la inseminación artificial en cerdos tiene varios desafíos como alargar el tiempo de vida del eyaculado, aplicando diluyentes de larga duración con un efecto antimicrobiano y protector de la célula espermática, con el objetivo de extender la viabilidad del espermatozoide para satisfacer las necesidades de los Centros de Transferencia Genética. Se recibieron 4 muestras por semana: 2 dosis (grupo control, siempre a 17° C) y 2 dosis (grupo experimental) para obtener un total de 64 muestras analizadas durante 16 semanas. Las evaluaciones para monitorear la calidad espermática se realizaron a las 24, 48 y 96 horas para determinar el efecto del estrés térmico. En el grupo experimental se elevó la temperatura a las 24 horas a 25° C y posteriormente se disminuyó a 17° C a las 48 horas efectuándose en total 3 análisis durante el tiempo experimental por medio del Sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) AndroVision® mediante el módulo básico y el módulo de análisis avanzados, así como aislamiento bacteriológico. Los resultados obtenidos de las diferentes variables analizadas demostraron tener una distribución normal por lo que fueron analizadas mediante un Análisis de Varianza de medidas repetidas mediante el procedimiento GLM del software IBM SPSS® Statistics 25; las variables que no demostraron una distribución normal (*% de cabezas*, *% de gota proximal* y *grado de aglutinación*) se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Friedman. Las variables analizadas mediante el Sistema CASA AndroVision® no presentaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo control ($P > 0.05$). En cuanto al grupo experimental, se aplicaron modelos univariantes de medidas repetidas a los 32 datos de muestras, con el tiempo como factor intra-sujeto, en el cual si existieron diferencias estadísticamente significativas en las variables *% motilidad progresiva* y *% gota distal* ($P < 0.05$). Los resultados obtenidos en cuanto a bacteriología arrojaron que el 5.62% del total de evaluaciones realizadas (11 de 192) fueron positivas a contaminación bacteriana. Los recuentos variaron de 1 a 20 UFC/ml después de 24, 48 y 96 horas de almacenamiento en los rangos de temperatura de 17°- 25° C. Las bacterias gram negativas identificadas fueron *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter iwoffii*). El Sistema CASA AndroVision® permitió la evaluación de la calidad espermática analizando la biología básica del espermatozoide porcino reduciendo el tiempo de evaluación por muestra. El uso del diluyente de larga duración demostró su efecto protector en la calidad espermática de las dosis cuando fueron sometidas a estrés térmico (25° C), demostrando también su efecto antimicrobiano. Es importante evaluar la calidad de las dosis seminales por medio del módulo básico y el módulo de análisis avanzados, así como analizar los algoritmos de trayectoria de las células espermáticas.

INTRODUCCIÒN

Inseminación artificial (IA)

La IA (inseminación artificial) llevada a cabo en las naciones desarrolladas de la industria porcina global, estuvo en 1998 en un nivel extremadamente alto. En Europa, países como Noruega y Bélgica con un 90% de IA, los Países Bajos y España con un 85% e Italia con un 80%, mantuvieron el liderazgo con una proporción extrema de las cerdas mediante IA. La IA sigue aumentando incluso en estos países y, sobre todo, en las demás naciones industrializadas (*Riesenbeck, 2011*).

En la mayoría de las naciones industrializadas con una alta producción de carne de cerdo, la tasa de IA ha aumentado significativamente en Francia del 55% al 95%, Suecia del 70% al 95% y Alemania del 59% al 98%. En la parte norte industrializada del continente americano, la IA ha alcanzado un nivel muy alto en los Estados Unidos y México en aproximadamente el 90% y en Canadá en el 80%. Además, la producción porcina de los países de América del Sur ha aumentado considerablemente en total en la última década (Brasil en 450%, Argentina en 112% y Chile en 65%), presentando una IA extremadamente alta con casi el 100% en Chile y el 66% en Brasil (*Riesenbeck, 2011*). Este pronóstico estaba justificado. A continuación (**Cuadro 1**) se enlistan los mayores productores de carne de cerdo del mundo (anuario de la FAO 2008). Los datos restantes fueron facilitados por la dirección de los centros nacionales de IA, las autoridades nacionales y la industria de la IA. De esto, también pueden resultar diferencias entre la producción de carne de cerdo y la proporción de cerdos criados (*Riesenbeck, 2011*).

Cuadro 1

PRINCIPALES PRODUCTORES DE CARNE DE CERDO, % DE IA, NÚMERO DE VERRACOS, CENTROS DE IA Y DOSIS SEMINALES (*Riesenbeck, 2011*).

País	Millones de toneladas de carne de cerdo (2008)	Millones de hembras	% IA	No. de verracos	No. de centros de IA	Dosis totales (millones)/año
1) China	47.18	44	10	-	-	24
2) E.U. A	9.52	5.778	90	27	-	34
3) Alemania	4.45	2.225	-	6.611	22	12.47
4) España	3.46	2.2	95	7.5	74	12.5
5) Brasil	3.02	2.432	66	-	-	12
16) México	1.15	0.95	70	-	-	5.5
		0.67	90	-	-	-

El fundamento principal del uso de la IA en los cerdos fue la de alargar el tiempo de vida del esperma y su aplicación en forma líquida. Los avances en la producción animal y la elaboración de dosis seminales fueron el inicio de la revolución mundial de la IA que ocurrió en la década de los noventa. Durante los primeros años, la vida del esperma porcino en forma líquida podía extenderse hasta 3 días, lo que permitió que el semen se enviara a distancias que no estaban muy lejos de los centros de IA. Con los avances en el desarrollo de la tecnología de diluyentes de larga duración, la capacidad de extender la vida del esperma abrió una nueva oportunidad en el mercado que fue la aceptación de esta tecnología, adaptándose rápidamente la IA alrededor del mundo. En países con grandes áreas de espacio, sitios agrícolas remotos y sistemas de transporte menos desarrollados, los diluyentes de larga duración permitieron que el semen fuera embarcado con un mayor tiempo de tránsito sin pérdida de la fertilidad (*Knox, 2016*).

Durante la última década, la proporción de apareamientos por IA alcanzó un máximo de 90-100% en la mayoría de los diez principales países productores de carne de cerdo con la excepción de China, donde las tasas actuales de IA se estiman en 40% (**Cuadro 2**) (Waberski et al., 2019).

Cuadro 2

TASAS Y TÉCNICA DE IA EN LOS 10 PRINCIPALES PAISES PRODUCTORES DE CARNE DE CERDO (Waberski et al., 2019).

País	Producción porcina 2018 (en 1,000 toneladas métricas) *	% estimada de IA (del total de cría)	% estimada de PCAI (del total de IA)	Fuente
China	54,650	40% **	50%	Minitube
E.U	24,050	95%	0-60% ***	Varios
E.U.A	12,166	90%	30%	Minitube
Brasil	3,675	95%	60%	F. Bortolozzo
Rusia	3,050	85% **	25%	Minitube
Vietnam	2,800	90%	30%	D.H. Bui, X. Le Thi
Canadá	2,015	>95% **	30%	Minitube
Filipinas	1,600	85% **	5%	PIC
Corea del Sur	1,321	90%	30%	PIC
México	1,305	90%	25%	Minitube

PCAI: Inseminación artificial post cervical.

*** <https://www.statista.com/statistics/273232/net-pork-production-worldwide-by-country/>.**

**** >90% en fincas profesionales.**

***** 0%: Dinamarca, Alemania, Holanda.**

La IA es el método preferido para la reproducción en la mayoría de los sistemas de producción porcina intensiva del mundo (López et al., 2017). El éxito para la cría de cerdos mediante IA puede atribuirse a mejoras en la fertilidad, eficiencia laboral, mejoramiento genético y una mejor optimización en la producción. En el año 2014 en un estudio realizado donde evaluaron en comportamiento productivo

de 1.3 millones cerdas, los resultados muestran una tasa de fertilidad al parto del 86% y 14 LNV (lechones nacidos vivos) en promedio (Knox, 2016).

El nivel de fertilidad alcanzado con IA, a pesar de la considerable variación entre diferentes países, granjas y sistemas de producción, puede ser atribuido a una metodología de trabajo para que la IA pueda evaluarse y lograr éxito utilizando medidas clave para el control de calidad espermática y rendimiento reproductivo (Knox, 2016).

El mejoramiento genético se ha acelerado drásticamente mediante el uso de la IA. La mayoría de las granjas de cría obtienen el semen de centros de IA externos llamados actualmente Centros de Transferencia Genética (CTG). La propiedad de estos lugares es variables ya que pueden ser empresas genéticas, compañías independientes o cooperativas de porcicultores, en donde se realiza la recolección de semen in situ. Los proveedores genéticos a través de esta nueva modalidad han permitido aumentar la selección y acelerar las tasas de mejora genética gracias al uso de cruza dirigidas con el uso de softwares a través de registros de producción que capturan información de datos de los parámetros productivos del pie de cría (cerdas-sementales) y su progenie (Knox, 2016).

El número de espermatozoides utilizados por dosis seminales para cada cerda gestante disminuyó significativamente en los últimos años. La deposición transcervical tradicional de 70-100ml de semen diluido que contiene entre $1.5-2.5 \times 10^9$ espermatozoides conservados durante varios días a 17° C, sigue siendo el método más común de IA, sin embargo, actualmente la deposición de semen en el cuerpo uterino llamada también inseminación post cervical (IA-PC), permite reducir el número de espermatozoides por dosis de semen. Actualmente esta técnica de inseminación es una tendencia de uso después de capacitar al personal en granjas tecnificadas. En las operaciones comerciales se utilizan actualmente valores umbrales de $1-2 \times 10^9$ espermatozoides por cada dosis de semen en un volumen entre 30-50 ml (Waberski et al., 2019).

La evolución de la IA en la industria porcina tuvo como principal objetivo el reducir la incidencia de la transmisión de enfermedades infecciosas en las granjas de pie

de cría, mejorando así el estatus sanitario (*Knox, 2016*). La IA, reduce el riesgo de transmisión de enfermedades en comparación con el apareamiento natural además permite la introducción de genes superiores en grupos de cerdas, así como también una mejor rentabilidad de cada eyaculación de verraco (*López et al., 2017*)

La IA ahora sirve como una tecnología de puerta de entrada para nuevas tecnologías reproductivas como el semen sexado, crio preservado y nuevos métodos para la transferencia de genes (*Knox, 2016*). A pesar del avance de los métodos para crio preservar el semen porcino, el semen congelado no se ha utilizado rutinariamente en las granjas debido a su limitada eficacia (*Waberski et al., 2019*), dando lugar a problemas con la supervivencia, el daño y la fertilidad del espermatozoides (*Knox, 2016*). Por otro lado, la colección y conservación del semen hasta siete días en diluyentes de larga duración, es de uso común y es en gran medida responsable del uso generalizado de la IA y sigue siendo el principal método para estabilizar el espermatozoides de los verracos hasta la inseminación (*Waberski et al., 2019*).

La industria contribuyó en gran medida a este éxito promoviendo el desarrollo de diluyentes, proporcionando también máquinas de llenado altamente eficientes e higiénicas (que ahora alcanzan la producción de hasta 2,000 dosis de semen/h), así como bolsas y tubos para el semen, que sean convenientes y seguros, al igual que diseñando catéteres para la inseminación transcervical y postcervical, e integrando herramientas de diagnóstico computarizado fáciles de usar en los laboratorios de inseminación artificial (*Waberski et al., 2019*). Con esta alta intensidad de producción, se ha incorporado a los CTG un mayor nivel de tecnología concomitante para la colecta de semen (sistemas de recogida automática), el análisis de semen (sistemas CASA y núcleo contadores) y el procesamiento de semen (máquinas llenadoras de semen de alta eficiencia) (*Riesenbeck et al., 2015*).

Manejo de los verracos y la producción de semen

En los CTG, los verracos se alojan en corrales o establos con un número de entre 25 y 2,000 machos alojados en un sitio individual. Las instalaciones están diseñadas para controlar el medio ambiente y los sistemas de gestión para optimizar la salud y la fertilidad de los sementales. Dependiendo de su tamaño, los sementales individuales suelen servir como proveedores de 20 a 200 granjas con una producción de cientos a miles de dosis de semen cada semana (Knox, 2016).

En el caso de los verracos que entran en la rotación de colección, muchos sementales de la línea materna sólo pueden permanecer en el hato durante 6 meses a nivel del núcleo, mientras que los verracos de línea terminal para la producción comercial pueden permanecer en el grupo durante 2 años o más antes de ser sacrificados por razones genéticas o de otro tipo (Knox, 2016).

Los verracos que entran al centro de IA son entrenados para la recolección en un maniquí a partir de los 7 meses de edad con un entrenamiento típicamente completado en 2 semanas para la mayoría de los machos. Si los verracos pasan sus evaluaciones tempranas de fertilidad a los 8 hasta los 9 meses de edad, entrarán en la rotación regular de recolección donde serán trabajados una vez por semana antes de pasar a recolecciones más frecuentes, con intervalos de descanso de 4 a 5 días para optimizar la calidad del semen y la producción de dosis (Knox, 2016).

El promedio de producción de esperma oscila entre 60 y 120 mil millones de espermatozoides por eyaculado. La mayoría de los centros de IA tienen criterios para procesar un eyaculado que incluyen parámetros de calidad como la motilidad total con un mínimo de 70%, así como anomalías espermáticas que no rebasen el 20%. En esta lista, se pueden incluir medidas para el total de espermatozoides, volumen del eyaculado, concentración de espermatozoides, aglutinación y contaminación bacteriana. Si la muestra cumple los criterios mínimos, se diluye y luego se divide en recipientes de plástico desechables que contienen dosis únicas de IA de 1,500 a 3,000 millones de espermatozoides

viabiles en volúmenes que pueden oscilar entre 30 y 80 ml. Si el semen está destinado a la producción comercial o de multiplicadores, un eyaculado puede ser mezclado con el de otros tres a cinco sementales (heteroespermia). El semen mezclado está destinado a minimizar los efectos de los problemas de un solo padre y de la eyaculación, aunque no se han demostrado nunca claras ventajas de la fertilidad (Knox, 2016).

En el futuro, la practicidad del uso de semen en grupo parece limitada por el riesgo de propagación de enfermedades. Los centros de IA programan la recolección de verracos para satisfacer las necesidades de los clientes, ya que muchas granjas de cría tienen órdenes permanentes de números de dosis y semen para la genética especificada. Este tipo de programación es importante para ayudar a manejar el inventario de los machos, la rotación de la recolección, la eficiencia de la producción de esperma, la fertilidad del esperma, y ajustarse a las disminuciones estacionales de la calidad de la eyaculación. En promedio, los verracos se recogen 1.4 a 1.7 veces por semana, con 4 a 5 días de descansos entre una colecta y otra (Knox, 2016).

Los CTG a menudo retienen dosis de semen de cada lote para la evaluación del control de calidad mientras está almacenado. Estas muestras se evalúan a lo largo del tiempo en almacenamiento y sirven como indicadores de problemas en la calidad del semen debido al verraco, el diluyente, el procesamiento, el empaquetado, el envío y la manipulación en la granja. En los centros de IA, el control bacteriano en el área de procesamiento de semen es una prioridad porque se espera que una proporción de los eyaculados recolectados tenga algún nivel de contaminación (Knox, 2016).

Las bacterias que se llegan a encontrar en el semen debido al mal manejo de la colecta o por ser causantes de enfermedad son preocupantes porque pueden dañar los espermatozoides. Por ello, la desinfección de las instalaciones, limpieza de equipos para el procesamiento de semen y el cultivo para detectar la presencia de bacterias, se realizan de forma rutinaria para evitar la contaminación por dosis durante el procesamiento y el envasado. Las dosis de IA se etiquetan y a veces se

codifican por color para el lote o la genética y se almacenan a 17° C (puede variar entre 15°-18° C) hasta su distribución (Knox, 2016).

En la mayoría de las granjas de cría comerciales, las dosis de semen se empaquetan a granel en bolsas de plástico dentro de cajas de espuma de poliestireno, selladas con paquetes de gel de 17° C para el control de la temperatura. La protección térmica del semen también puede ser mejorada en invierno o en verano, especialmente con envíos más largos, con doble embalaje y el uso de paquetes de gel exteriores de diferentes temperaturas. La mayoría de las colectas rutinarias de semen están programadas para la mañana y el envío se realiza más tarde el mismo día, lo que permite que el semen llegue a la granja de cría el mismo día o a primera hora de la mañana siguiente. En ciertos casos, como el envío internacional, las dosis de semen pueden no llegar a la granja de cría durante 3 o 4 días postproducción, ya que se transporta hacia los aeropuertos y posteriormente a la aduana (Knox, 2016).

Para que la producción de semen sea rentable, es necesario obtener una cantidad máxima de semen de calidad de cada uno de los eyaculados de los verracos (López et al., 2017).

Temperatura

Se ha determinado empíricamente que la temperatura óptima de almacenamiento del semen de verraco conservado en líquido está entre 15°-18° C. Las temperaturas más bajas proporcionan una ventaja para inhibir el crecimiento bacteriano, pero se consideran críticas debido a la alta sensibilidad de los espermatozoides del verraco al daño por frío. Se ha demostrado que las temperaturas de almacenamiento más altas provocan una deficiencia de energía debido a una depresión insuficiente de la actividad metabólica de las células. Sin embargo, falta evidencia experimental de alteraciones del estado energético de los espermatozoides en relación con la temperatura y la duración del almacenamiento (Henning et al., 2022).

Los espermatozoides porcinos recién colectados son sensibles a una rápida reducción de la temperatura debido a los procesos de transición y separación de fases de los lípidos. La gestión de la temperatura durante el procesamiento del semen puede determinar la calidad de las muestras almacenadas. La gama de temperaturas para las transiciones de fase lipídica en las membranas de los espermatozoides porcinos se sitúa entre 10°-30° C. Las temperaturas por debajo de la transición de fase van acompañadas de un aumento de la permeabilidad de la membrana con la consiguiente fuga de cationes, la reducción de la actividad enzimática y la alteración de las proteínas de la membrana. Las membranas de los espermatozoides porcinos tienen una menor concentración de colesterol y, por lo tanto, se vuelven más lábiles al enfriamiento que los espermatozoides de otras especies (*Schulze et al.*, 2013).

El manejo de los eyaculados debe ser controlado y asistido para evitar el daño de los espermatozoides y evitar una repercusión directamente en la calidad espermática (*López et al.*, 2017).

Diluyentes de semen porcino

Los diluyentes suelen ser soluciones translúcidas que evitan que los espermatozoides se aglutinen (*Brito et al.*, 2016). Son medios utilizados para el almacenamiento de líquidos necesarios para prolongar la supervivencia de los espermatozoides proporcionando energía a las células, amortiguando el pH de la suspensión y evitando el crecimiento de bacterias (*López et al.*, 2017).

En los últimos 30 años, los hitos de la investigación han incluido el desarrollo de diluyentes con capacidad de mayor preservación (*Waberski et al.*, 2019). Los primeros diluyentes eran simples, ya que servían para extender el volumen, mantener el pH, proporcionar el equilibrio osmótico y estabilizar la membrana. Pueden clasificarse en corto plazo (3 días), mediano plazo (4-5 días) y largo plazo (>7 días). Los diluyentes de largo plazo, cuyas fórmulas son en su mayoría patentadas, pueden contener mejores agentes amortiguadores, antioxidantes,

antibióticos y son populares en muchos lugares del mundo por sus resultados en campo (*Knox, 2016*).

La mayoría de los diluyentes en el mercado proporcionan una protección aceptable de la viabilidad del esperma durante las primeras 72 horas de almacenamiento, aunque la motilidad y la fertilidad disminuyen cuando el semen se almacena durante más de 4 días (*López et al., 2017*). En el centro de IA, los diluyentes se reciben en forma de polvo y se disuelven en agua bidestilada o desionizada. La calidad del agua puede ser importante para la supervivencia, la fertilidad del esperma, y se requiere pureza de los compuestos orgánicos, bacterias, endotoxinas, partículas e iones inorgánicos. La purificación puede producirse mediante procesos que implican la destilación, la deionización, la filtración y la iluminación UV. Su pureza puede comprobarse mediante el pH, la conductividad, la osmolaridad y la bacteriología (*Knox, 2016*). No solo es importante la calidad microbiológica del agua, sino también el contenido de electrolitos, especialmente la ausencia de iones calcio (*López et al., 2017*).

Se ha estimado que en la actualidad se utilizan aproximadamente 12.8 millones de litros de diluyente al año en todo el mundo. La calidad del agua y la precisión de la preparación del diluyente tienen un enorme impacto en la calidad del esperma almacenado. Los modernos equipos de producción de agua, por ejemplo, la ósmosis inversa y la desinfección del agua mediante luz UV, son comunes en muchos centros de IA. Los errores humanos y técnicos en la preparación del diluyente son fuentes potenciales de errores, especialmente en los centros con una alta rotación de personal y falta de capacitación (*Riesenbeck et al., 2015*).

Los malos resultados medidos por la calidad del semen suelen estar asociados a la contaminación bacteriana o a desequilibrios osmóticos debido a errores de pesaje durante la preparación del diluyente. Los espermatozoides porcinos son especialmente sensibles a las condiciones hipotónicas resultantes de una medición inexacta (baja) por peso del polvo de diluyente (*Riesenbeck et al., 2015*).

La IA también simplificó la propagación y el intercambio de potencial genético incluso más allá de las fronteras nacionales. Sin embargo, esto viene junto con un

mayor riesgo de propagación de enfermedades a través de semen preservado, lo que requiere un alto nivel de control sanitario. Debido al proceso de recolección, el semen porcino suele contener bacterias. Por esta razón, los antibióticos se incluyen comúnmente en los diluyentes de semen porcino. Para prevenir la propagación de enfermedades, las regulaciones nacionales e internacionales estipulan que los antibióticos tienen que ser parte del diluyente (*Oehler et al.*, 2019). Tradicionalmente, la penicilina y la estreptomicina eran la combinación antimicrobiana común que se agregaba a los diluyentes. Hoy en día, la clase de conservantes antimicrobianos más utilizada en los diluyentes de semen porcino son los aminoglucósidos, especialmente la gentamicina (*Schulze et al.*, 2014).

La inclusión de antibióticos en el diluyente tiene efectos importantes en la supervivencia de los espermatozoides porque las bacterias se asocian comúnmente con los eyaculados porcinos y pueden crecer bastante bien en el diluyente a temperaturas de almacenamiento más elevadas, ocasionando efectos espermicidas. Se han establecido métodos para reducir al mínimo la contaminación del semen y son el mejor enfoque para reducir el riesgo de contaminación asegurando que las heces se retiren del área de recolección, y se han establecido procedimientos para proteger el eyaculado de la contaminación bacteriana del área del prepucio y los vellos (*Knox*, 2016).

A pesar de los numerosos proyectos de investigación en los diluyentes, la desventaja consiste en la temperatura de almacenamiento requerida, por regla general a 17° C (puede variar entre 15°-18° C). Esta temperatura de almacenamiento representa un problema logístico no sólo para el transporte sino también para el almacenamiento en la granja. Se necesitan cajas especiales con temperatura controlada. El semen podría ser transportado a larga distancia, incluso más allá de las fronteras nacionales con el diluyente apropiado (*Riesenbeck*, 2011).

Evaluación de la fertilidad del verraco y del semen

El control de calidad para la producción de dosis de IA implica pruebas para identificar problemas de fertilidad en un verraco o en una eyaculación mediante el espermograma. Muchos estudios de verracos se basan en la evaluación microscópica de la motilidad, las anomalías del eyaculado y en la evaluación microscópica o fotométrica de la concentración de espermatozoides (Knox, 2016). Un número cada vez mayor de CTG están aplicando sistemas de control de calidad en los que se supervisa cada paso, desde la colecta hasta el envasado por medio de auditorías externas (López *et al.*, 2017).

La introducción del análisis de semen asistido por computadora ha revolucionado la forma en que muchos centros grandes de IA procesan y evalúan los eyaculados. Las máquinas tienen la capacidad de contar rápidamente cientos de espermatozoides en segundos para determinar la motilidad, la concentración y para calcular las tasas de dilución para la producción de dosis de IA (Knox, 2016).

Como parte integral de los programas de garantía de calidad, las empresas de cría han definido criterios que incluyen la calidad del espermatozoide al último día de almacenamiento, es decir, la fecha de caducidad. Las comparaciones entre organizaciones de cría pueden ser limitadas debido a los diferentes métodos de evaluación del semen y la ausencia de comparaciones entre laboratorios. No obstante, los estándares mínimos para el semen en cuanto a motilidad (70% de motilidad total) y morfología de los espermatozoides (20-30% de formas anormales), con o sin especificación de umbrales para espermatozoides con gotas citoplasmáticas (15-30%), se encuentran en un rango similar. La motilidad y la carga bacteriana son los principales parámetros de calidad. Muchas organizaciones exigen la ausencia de bacterias determinadas en las unidades formadoras de colonias (UFC) después del cultivo aeróbico hasta la fecha de vencimiento (**Cuadro 3**) (Waberski *et al.*, 2019).

Cuadro 3

PARÁMETROS MÍNIMOS PARA EL USO DE SEMEN PORCINO EN 3 CASAS GENÉTICAS PORCINAS (*Waberski et al., 2019*).

Parámetros	A	B	C
Motilidad total (%)			
Dosis seminal recién procesada	ND	ND	80
Dosis seminal al día de expiración	60	60	70
Motilidad progresiva (%)			
Dosis seminal recién procesada	ND	ND	ND
Dosis seminal al día de expiración	50	45	ND
Anormalidades espermáticas (%)	30	30	ND
Aglutinación (%)	30	ND	ND
Días de almacenamiento	ND	4	4
Tipo de diluyente	Ld	Cd	Cd
Contaminación bacteriana (UFC/ml)	0	ND	300
A) Pig Improvement Company (PIC) B) Topigs Norsvin C) DanBred Cd = corta duración Md = media duración Ld = larga duración ND = No Descrito			

Los avances también han permitido el análisis informatizado de la morfología del espermatozoide y la utilización de la citometría de flujo (CF) para evaluar la funcionalidad de un eyaculado. Estos parámetros incluirían la motilidad, la viabilidad, la integridad del acrosoma y del ADN, la función mitocondrial, la unión al oviducto y la penetración del óvulo. La selección de las combinaciones de pruebas que generarán las mejores medidas de predicción de la fertilidad del semen y el semental continuará evolucionando (*Knox, 2016*). Por lo tanto, el análisis de CF y el análisis de espermatozoide asistido por computadora CASA (por sus siglas en inglés

CASA = Computer Assisted Sperm Analysis), se toman tanto en las evaluaciones de semen de la industria como en la práctica de la investigación (*Boe-Hansen y Satake, 2019*).

Las dosis de IA deben ser de calidad, tener una alta bioseguridad, tener un alto valor genético y mantener una alta viabilidad durante varios días de almacenamiento. Además, con el aumento de la intensidad de la producción de semen en los CTG, han aumentado las exigencias higiénicas para evitar la entrada de bacterias multirresistentes en las dosis de inseminación artificial durante el procesamiento (*Riesenbeck et al., 2015*).

Evaluación de semen por Sistema CASA

El principio del CASA consiste en la visualización y digitalización de imágenes sucesivas de espermatozoides mediante una configuración de microscopía con un equipo informático, seguida de un procesamiento y análisis de imágenes para identificar y contar los espermatozoides mediante un programa informático. Como se conoce el área de las imágenes, se puede calcular el volumen evaluado y la concentración de espermatozoides. Se utiliza una platina mecánica manual o automatizada para posicionar la muestra en la coordenada X/Y deseada y para ajustar el foco en el eje Z. La mayoría de los sistemas utilizan una iluminación de banda ancha dentro del espectro visible con objetivos de contraste de fase negativo (o positivo) de 10X o 20X combinados con condensadores correspondientes, mientras que otros sistemas también están equipados con otros tipos de iluminación y filtros especiales para la detección de la fluorescencia. Las imágenes se capturan con una cámara digital, generalmente durante un período de 0,5 segundos, utilizando una velocidad de adquisición de fotogramas predeterminada (por ejemplo, 60 MHz) controlada por un obturador de cámara o la duración del pulso de la iluminación estroboscópica. La mayoría de los sistemas CASA utilizan programas informáticos patentados para detectar las cabezas de los espermatozoides y establecer un centroide (es decir, un punto central en la cabeza) que se utiliza para seguir las trayectorias de los espermatozoides. Las

fórmulas para el cálculo de la concentración de espermatozoides forman parte del paquete de programas informáticos, y se requieren y/o permiten diferentes niveles de aportación por parte del usuario. El área de evaluación está determinada por el aumento utilizado, mientras que el volumen evaluado también está determinado por la profundidad de la cámara utilizada para el análisis (*Brito et al., 2016*).

Se requieren cámaras de medición desechables (Leja®, MicroCell®, CellVision®, Cell-Vu®) o reutilizables (Makler®) de 10 o 20mm de profundidad para estimar la concentración espermática utilizando CASA. La profundidad de la cámara debe ser suficiente para un movimiento no restringido del espermatozoide y variará dependiendo de la especie animal. Se recomienda la evaluación de al menos 400 espermatozoides para garantizar la precisión (*Brito et al., 2016*).

Los sistemas de análisis de espermatozoides asistido por computadora (CASA) han evolucionado durante aproximadamente 40 años, a través de avances en dispositivos para capturar la imagen de un microscopio, enormes aumentos en el poder computacional concurrente con una sorprendente reducción en el tamaño de las computadoras, nuevos lenguajes de computadora y actualizaciones. Los conceptos básicos para identificar los espermatozoides y sus patrones de movimiento han cambiado. Se siguen utilizando sistemas más antiguos y lentos. La mayoría de los principales laboratorios de espermatología e instalaciones de procesamiento de semen tienen un sistema CASA, pero el grado de confianza en él varía ampliamente (*Amann y Waberski, 2013*).

El sistema CASA abarca la evaluación de la motilidad/cinética del espermatozoide, y más recientemente los rasgos y características morfológicas del espermatozoide. Hoy en día el sistema CASA proporciona una interpretación objetiva e independiente, con mediciones detalladas de la motilidad del espermatozoide, basadas en la microscopía óptica y la video micrografía 2D. Se están adoptando nombres más apropiados que indican lo que realmente se está evaluando, incluyendo CASA-Conc (concentración), CASA-Mot (motilidad y/o cinemática), y CASA-Morph (morfología y/o morfometría) (*Boe-Hansen y Satake, 2019*).

El parámetro más validado y tradicional medido por el sistema CASA es la motilidad, que es una funcionalidad fundamental de un CASA. Los modernos sistemas CASA se han desarrollado para abarcar algoritmos mejorados para evaluar características adicionales del espermatozoide, como la concentración, la morfología y la viabilidad. La mayoría de los principales laboratorios de andrología tienen un sistema CASA, incluyendo instalaciones más grandes de procesamiento de semen porcino. Hay varios sistemas disponibles, pero los principales implicados en las aplicaciones veterinarias son: Minitube (AndroVision®), Hamilton Thorne (IVOS®, CEROS®), Microptic (SCA®), PROiSER R þ D (ISAS®), Biophos® (Qualisperm), Medical Electronic Vision (SQA Vision®), (CRISMAS®) y DITECT (SMAS®) (Boe-Hansen y Satake, 2019).

En resumen, las líneas y trayectorias se construyen utilizando algoritmos que conectan los centroides de los espermatozoides individuales, que proporcionan su trayectoria real; la trayectoria curvilínea. La velocidad promedio en el tiempo a lo largo de esta trayectoria es la velocidad curvilínea (por sus siglas en inglés VCL; mm/s = Curvilinear velocity). La trayectoria media y la velocidad promediada en el tiempo a lo largo de esta trayectoria es la velocidad media de trayectoria (por sus siglas en inglés VAP; mm/s = Average path velocity). La trayectoria recta desde la primera a la última posición de una cabeza de espermatozoide, y su velocidad a lo largo de esta trayectoria es la velocidad en línea recta (por sus siglas en inglés VSL; mm/s = Straight line velocity). La linealidad (LIN; relación VSL/VCL; %), la rectitud (relación VSL/VAP; %) y la oscilación (WOB; relación VAP/VCL; %) se calcula a menudo en base a estos parámetros de velocidad) (**ver imagen 1**). La descripción estándar por defecto de los ajustes para el espermatozoide del verraco se establece a menudo en VAP >20 mm/s, y VSL 40 mm/s, con un umbral para la motilidad total que puede establecerse en un valor de alrededor del 70% (Boe-Hansen y Satake, 2019).

El procesamiento de imágenes inicial proporciona un centroide para cada espermatozoide en el primer fotograma de una escena, y para cada celda se deduce la ubicación del centroide más probable en fotogramas sucesivos. La

conexión de los centroides de un espermatozoide proporciona su trayectoria real, denominada trayectoria curvilínea. La velocidad promediada en el tiempo a lo largo de esta trayectoria se denomina velocidad curvilínea (VSL; mm/s). Se calcula la trayectoria y la velocidad media en el tiempo a lo largo de esta trayectoria se denomina velocidad de trayectoria media (VAP; mm/s). Se traza una trayectoria en línea recta desde la primera hasta la última posición de la cabeza de un espermatozoide, y la velocidad a lo largo de esta trayectoria se denomina velocidad en línea recta (VSL; mm/s). Para cada ubicación de centroide hay una desviación de la trayectoria promedio, y esto se denomina amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (por sus siglas en inglés ALH; mm = Amplitude of lateral head displacement). De manera similar, hay puntos donde la ruta curvilínea se cruza con la ruta promedio, y el número de tales intersecciones se denomina frecuencia de latido-cruce (por sus siglas en inglés BCF = Beat cross frequency; número por segundo) (Amann y Waberski, 2013).

Algoritmos de trayectoria del espermatozoide

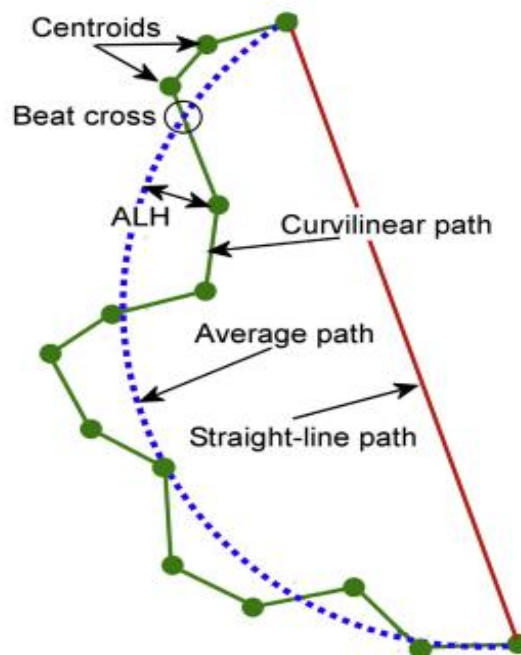


Imagen 1. Descripción de terminología del CASA (Amann y Waberski, 2013). Centroids = Centroides; Beat cross = Punto de intersección entre la trayectoria curvilínea y la ruta promedio; ALH = Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; Curvilinear path = Trayectoria curvilínea; Average path = Trayectoria promedio; Straight-line path = Trayectoria en línea recta

La morfometría espermática se ha convertido en algo común en el conjunto de parámetros medidos por las plataformas del sistema CASA. Los principales parámetros incluyen mediciones de la cabeza del espermatozoide (longitud, anchura, perímetro y área), identificación de las gotas citoplasmáticas, la parte media y la cola (longitud y anormalidades) (*Boe-Hansen y Satake, 2019*).

Los defectos sutiles en la parte media y la cola del espermatozoide, también se asocian con los resultados de la producción, como la presencia de gotas citoplasmáticas que se correlacionan negativamente con la fertilidad y el tamaño de la camada. Los datos morfométricos de la cabeza del espermatozoide varían entre los verracos y las razas. Estas variaciones no parecen estar correlacionadas con la integridad del ADN de los espermatozoides, pero tal vez la presencia de gotas citoplasmáticas sea más indicativa de la alteración de las características morfométricas de la cabeza del espermatozoide del verraco y de la inestabilidad de la cromatina. El CASA utiliza tres tipos de microscopía, la iluminación convencional de campo brillante (que requiere tinción), el contraste de fase (que utiliza monturas húmedas) y la fluorescencia (que requiere una sonda fluorescente) (*Boe-Hansen y Satake, 2019*).

La evaluación de la concentración de espermatozoides es un componente esencial del análisis del semen, y los resultados se utilizan, entre otras cosas, para la certificación de la solidez de la reproducción, el diagnóstico y/o el pronóstico de trastornos reproductivos, el procesamiento de las dosis de inseminación, la caracterización de las muestras de semen para el comercio y la evaluación de los efectos del tratamiento en la producción de espermatozoides (*Brito et al., 2016*).

Un factor primordial que afecta al rendimiento de los sistemas CASA es la capacitación técnica de sus usuarios. Es importante que los técnicos estén capacitados para comprender la teoría que hay detrás de CASA, así como la influencia que los ajustes iniciales pueden tener en la salida de datos y su interpretación. Como ocurre con todos los métodos utilizados para medir la concentración de espermatozoides, el correcto pipeteado, la dilución y la mezcla

minuciosa de la muestra son esenciales para obtener resultados fiables (*Brito et al.*, 2016).

La utilización de la evaluación del semen no sólo se utiliza para determinar cuándo es probable que una muestra sea menos ideal o sub fértil, sino también para predecir la fertilidad o el potencial de fertilización. En la industria de la conservación de semen porcino, los requisitos para un eyaculado normal suelen estipularse como un mínimo del 75% de espermatozoides morfológicamente normales, una motilidad total >70%, y un número total >20x10⁹, con un número total de espermatozoides por dosis de aproximadamente 2,000 millones. Los desarrollos actuales y las reducciones en el costo de la instrumentación de CASA y CF significan que hay sistemas rentables disponibles para los CTG (*Boe-Hansen y Satake*, 2019).

Bacteriospermia

Los eyaculados porcinos suelen contener carga bacteriana. Las bacterias pueden afectar la calidad y la longevidad del semen porcino conservado durante el almacenamiento, lo que resulta en menores tasas de fertilidad y pérdidas económicas para los sementales. El efecto espermicida parece depender de la concentración de bacterias (*Schulze et al.*, 2014). Como las dosis seminales son esencialmente un medio de cultivo celular, resultan ser un ambiente ideal para el crecimiento de bacterias comensales y patógenas, por lo tanto, en algún momento pueden expresar genes de resistencia a los antimicrobianos destinados a su control (*Kuster y Althouse*, 2016). Comenzando con la recolección del semen, la contaminación del eyaculado debe ser lo más baja posible para asegurar una buena base para los siguientes pasos del procesamiento (*Oehler et al.*, 2019). El mayor riesgo de contaminar el semen con bacterias proviene de permitir que el líquido prepucial entre en el recipiente de recolección. La fracción de prepucio contiene niveles bacterianos más altos que las otras fracciones, y se recomienda su desvío del contenedor de recolección (*Kuster y Althouse*, 2016). Dependiendo del tipo de especie de bacteria y del nivel de contaminación del eyaculado, la motilidad y viabilidad de los espermatozoides disminuye y la tasa de aglutinación

de los espermatozoides aumenta. Varios estudios han demostrado que la contaminación del semen en el proceso de producción de dosis seminales en el laboratorio es un problema común que puede incluso llevar a poblaciones de bacterias resistentes a los antimicrobianos en la dosis final (Oehler et al., 2019).

Aunque la bacteriospermia puede reducir la longevidad de almacenamiento mediante la aglutinación de espermatozoides, el deterioro de la movilidad, la integridad de los acrosomas y la pérdida de viabilidad de la membrana, no todos los aislamientos bacterianos tienen el mismo impacto en el espermatozoide, y son múltiples los factores que rigen sus efectos. La bacteriospermia puede dar lugar a un rendimiento reproductivo subóptimo al reducir la capacidad de fecundación de los espermatozoides o inducir un entorno uterino hostil para los espermatozoides y/o la supervivencia embrionaria (Kuster y Althouse, 2016).

Se ha recopilado una lista sustancial de bacterias del semen porcino atribuidas a microorganismos fecales, prepuciales, cutáneos, capilares, y otras bacterias ambientales de las zonas de procesamiento identificadas en dosis preparadas para la IA. Las bacterias Gram negativas se recuperan más comúnmente de dosis seminales, incluyendo contaminantes ambientales (Kuster y Althouse, 2016). La contaminación ambiental proviene del agua, el alimento, el equipo y los sistemas de ventilación de aire contaminados. Se ha observado resistencia a los medicamentos entre los aislados de semen porcino contra los antibióticos comúnmente utilizados como conservantes antimicrobianos en los diluyentes de semen de porcino comerciales (Bresciani et al., 2014).

El semen porcino suele contener unos 10^4 - 10^6 UFC/ml (Oehler et al., 2019). Las bacterias más frecuentemente identificadas son *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia*, y *Stenotrophomonas maltophilia* (Kuster y Althouse, 2016), así como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y *Klebsiella pneumoniae* (Oehler et al., 2019). La mayoría pertenecen a la familia de las Enterobacteriaceae. Dentro de esta familia, se ha demostrado que *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella*

morganii o *Proteus mirabilis* están presentes en un alto porcentaje de muestras y su presencia se asocia con una reducción de la motilidad (López *et al.*, 2017).

El método de procesamiento, distribución y almacenamiento del semen líquido fresco de los verracos antes de la inseminación juega un papel importante en la dinámica del crecimiento bacteriano y en el grado en que las bacterias pueden dañar el espermatozoide o afectar a la cerda. Además de la concentración inicial y el tiempo de almacenamiento, se ha demostrado que hay otros factores que interactúan para modificar el impacto de la bacteriospermia, entre ellos la temperatura de almacenamiento, la composición del medio de dilución y las interacciones antimicrobianas (Kuster y Althouse, 2016). La temperatura de almacenamiento favorece la supervivencia de las bacterias. La contaminación bacteriana del semen porcino se ha asociado con efectos deletéreos en la calidad del semen, que afectan a la motilidad y la estructura del espermatozoide y provocan la aglutinación de los espermatozoides y el acortamiento de su viabilidad. Esto reduce la fertilidad, las tasas de concepción y el tamaño de la camada al nacer y acorta la vida útil de las dosis de semen (Bresciani *et al.*, 2014).

Por ejemplo, los tiempos de generación de bacterias difieren según la temperatura de almacenamiento, lo que altera el tiempo para alcanzar concentraciones críticas. Así mismo, la disponibilidad de los antimicrobianos y el tiempo de eliminación pueden ser modificados por el pH del diluyente y la temperatura de almacenamiento. La incompatibilidad entre los antibióticos incluidos u otros componentes del diluyente o el plasma seminal puede reducir la eficacia antimicrobiana, incluso cuando se pueda demostrar la susceptibilidad al mismo compuesto en circunstancias diferentes (Kuster y Althouse, 2016). La preocupación por la contaminación bacteriana ha aumentado no sólo por su efecto negativo en la calidad del semen sino también por la detección de resistencia a los antimicrobianos utilizados en las dosis de semen. Además, es necesario vigilar los patógenos bacterianos y virales porque afectan a la producción y la calidad del semen y constituyen un riesgo de infección del hato (López *et al.*, 2017).

Debido a la falta de un método más rápido y menos intensivo en mano de obra, el control de cada eyaculación es poco práctico y hasta ahora sólo se analizan muestras aleatorias para controlar los niveles de higiene de la producción. Las muestras son cultivadas en agar sangre a 37° C durante 24-48 horas. Es posible que la mayoría de las dosis de semen ya se hayan vendido para cuando se disponga de los resultados de las pruebas bacteriológicas, un problema que sólo podría resolverse mediante la aplicación de métodos más rápidos para el examen bacteriológico de las muestras de semen (*Oehler et al.*, 2019). Es muy aconsejable realizar exámenes microbiológicos periódicos del semen porcino en la industria porcina para evitar el uso de dosis de baja calidad (*Bresciani et al.*, 2014). Al comprender las consecuencias de la bacteriospermia, corresponde a la industria porcina aplicar estrategias de control y vigilar su eficacia (*Kuster y Althouse*, 2016).

Hoy en día, los programas de bioseguridad y los sistemas de producción segregados continúan evolucionando y adaptándose para eliminar la transmisión de enfermedades en el semen de los centros de IA a las granjas de reproducción. Para que la IA ayude a mantener o mejorar la salud de la granja de cría, el riesgo de transmisión debe ser eliminado del centro de IA (*Knox*, 2016). Entre las perspectivas futuras para seguir controlando el impacto de la bacteriospermia en el rendimiento reproductivo, así como reducir potencialmente la necesidad de antibióticos en las dosis seminales, se incluyen el almacenamiento de la dosis a menor temperatura o la sustitución por productos y sustancias naturales (*Kuster y Althouse*, 2016).

JUSTIFICACIÒN

Actualmente, la inseminación artificial se aplica en casi el 100% de las granjas tecnificadas y ha adquirido una gran importancia en la producción porcina en los últimos veinte años ayudando en la mejora de parámetros reproductivos de las empresas porcinas, así como también, el refuerzo de la bioseguridad bloqueando la transmisión de enfermedades bacterianas y, sobre todo, favoreciendo la transmisión y expansión del material genético de forma rápida, segura y eficiente. Sin embargo, es de vital importancia evaluar las dosis seminales para identificar problemas en la calidad espermática durante el procesamiento de la dosis, la temperatura de transporte (estrés térmico), la evaluación del efecto del diluyente sobre la calidad espermática, los días de almacenamiento y el crecimiento bacteriano.

El presente estudio tuvo como finalidad determinar la importancia de llevar a cabo una evaluación completa de las dosis seminales de verracos utilizadas en la inseminación artificial al someterse a factores que pueden alterar sus parámetros y eficacia, como el estrés térmico.

HIPÒTESIS

El estrés térmico provocará la disminución de la calidad espermática favoreciendo el crecimiento bacteriano a través de los días que permanecen las dosis seminales en almacenamiento.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar dosis seminales de verraco con diluyente de larga duración sometidas a estrés térmico para determinar la calidad espermática y el desarrollo bacteriano mediante el análisis del Sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) AndroVision[®], cultivo, aislamiento y tipificación bacteriológica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Monitorear y medir las temperaturas de transporte de las dosis seminales mediante un registrador de temperatura digital (data logger®).
2. Evaluar la calidad espermática de las dosis seminales mediante los parámetros establecidos de concentración, motilidad total, motilidad progresiva, anormalidades espermáticas y grado de aglutinación con el análisis del Sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) AndroVision®.
3. Evaluar la calidad espermática de las dosis seminales mediante tinciones fluorescentes para determinar la integridad de membrana, integridad de acrosoma y actividad mitocondrial del espermatozoide con el análisis del Sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) AndroVision®.
4. Determinar el crecimiento bacteriano en unidades formadoras de colonia (UFC) a través de los días de almacenamiento de las dosis seminales mediante el cultivo, aislamiento y tipificación bacteriológica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recepción de dosis seminales

Las muestras seminales se obtuvieron de un Centro de Transferencia Genética (CTG) ubicado en Tangancícuaro, Michoacán, las cuales fueron enviadas por medio de una empresa de mensajería hacia su destino Querétaro, Qro.

Las muestras fueron empacadas en hieleras selladas con refrigerantes (150g o 250g) para mantener una temperatura de conservación adecuada de 17°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) amortiguadas con material de relleno, así como una placa de división de unicel. Desde su salida se resguardaron con un empaquetado estándar, se colocó un registrador de temperatura digital Data Logger® para medir la temperatura de transporte cada 5 minutos (*ver Imagen 2*).



Imagen 2. A) Registrador de temperatura digital Data Logger®. B) Dosis seminales (2 controles, 2 experimentales).

Una vez que se recibieron las dosis, se descargó el registro de temperaturas de transporte de las dosis registradas en el Data Logger®. Se recibieron 4 dosis seminales por semana durante 16 semanas, las cuales se desinfectaron superficialmente por medio de aspersión con un desinfectante a base de Troclosenol de Sodio (Taharsept®) de uso en el área agropecuaria para cumplir con los protocolos de bioseguridad de recepción de muestras, dejando actuar el producto por 5 minutos.

Se realizó el registro de temperaturas de recepción con un termómetro digital (Raytek® Raynger ST). Posteriormente, fueron llevadas al conservador de dosis seminales Minitube® atemperado a 17° C controlado por una unidad de control para sistemas de calefacción Minitube HT 200® (**ver Imagen 3**).



Imagen 3. **A)** Área de desinfección designada. **B)** Dosis seminales empacadas en contacto con el registrador de temperatura digital Data Logger®. **C)** Termómetro digital. **D)** Conservador de dosis seminales atemperado a 17° C y unidad de control.

El total de muestras para los grupos controles fueron 32 dosis y para el grupo experimental 32 dosis para obtener un total de 64 dosis seminales evaluadas. Las muestras fueron distribuidas para el análisis y evaluación de la calidad espermática mediante el Sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) AndroVision® y para el análisis bacteriológico (**ver Imagen 4**).

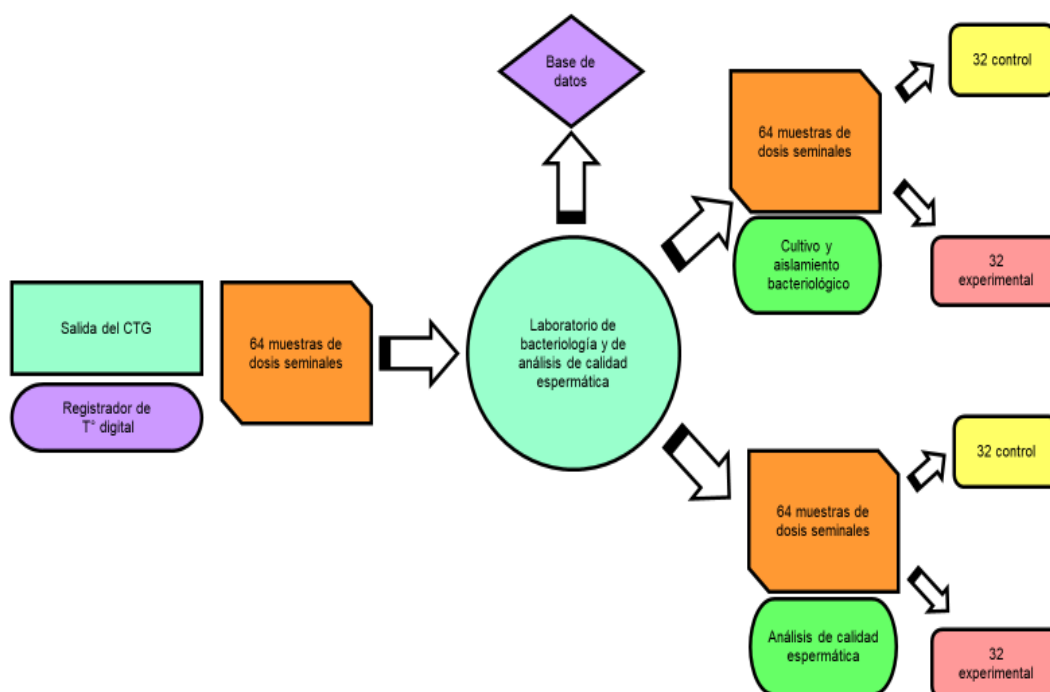


Imagen 4. Esquema general del flujo de recepción de las dosis seminales.

Metodología semanal

Registro de las dosis seminales

Se llevó a cabo el registro de las dosis seminales de manera manual en bitácoras de recepción y en la base de datos del Sistema CASA AndroVision®, en donde se reporta la identificación del semental o lote, especie, raza, fecha de elaboración, volumen de la dosis (pesado con báscula Ohaus® YS Series), temperatura (tomado con termómetro digital Raytek® Raynger ST), CTG de donde provienen y la opción de “eyaculados múltiples” para poder evaluar las dosis seminales las veces que sean necesarias (**ver Imagen 5**).

Nombre donante *	
ID donante *	
Especie *	
Raza *	
Centro *	
Establo	0 ▲ ▼
No. animal	
Código	
Fecha de nacimiento	📅
Fecha de ingreso	📅
Estado donante	Producción
Eyaculados múltiples	☐
Marca para eliminar	☐

Imagen 5. Registro en la base de datos del Sistema CASA AndroVision®.

Preparación de las muestras

Cada una de las 4 dosis seminales recibidas por semana fue homogenizada de forma suave con ayuda de un agitador rotatorio multitubo Thermo Scientific® con movimientos en ocho para ser abiertas en una campana bacteriológica de acrílico y 3 mecheros de alcohol en su interior y así poder ser divididas en 18 partes cada dosis seminal en microtubos para centrifuga Sarstedt® SafeSeal Reagiergef 2ml, para evitar el riesgo de contaminación. En cada uno de los 18 microtubos, se colocaron 1.5 ml de dosis seminal, para ser distribuidas de la siguiente manera: 3 muestras destinadas al análisis de calidad espermática y 9 muestras destinadas a realizar las tinciones de fluorescencia por medio del sistema CASA, así como 6 muestras destinadas para el cultivo y aislamiento bacteriológico.

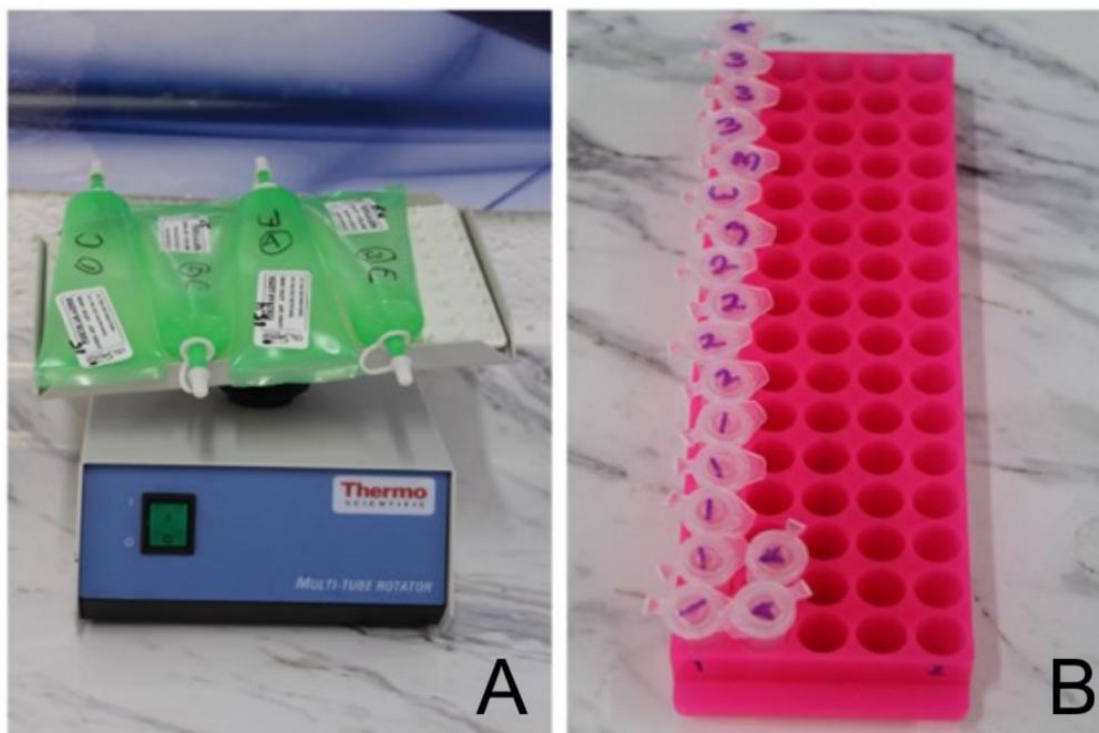


Imagen 6. A) Agitador rotatorio multitubo. **B)** Dosis seminal dividida en 18 partes en microtubos para centrifuga.

Grupos experimentales

El grupo control estuvo conformado por 32 muestras de dosis seminales totales con 3 evaluaciones realizadas a las 24, 48 y 96 horas de conservación permaneciendo a una temperatura de 17° C.

El grupo experimental estuvo conformado por 32 muestras de dosis seminales totales con 3 evaluaciones realizadas: la primera evaluación a las 24 horas cuando las dosis permanecieron a 17° C, la segunda evaluación a las 48 horas donde se sometieron a un estrés térmico de 25° C con una unidad de calefacción Mofa® Global y posteriormente a las 96 horas una vez que las dosis volvieron a conservarse a 17° C (**ver Imagen 7**).

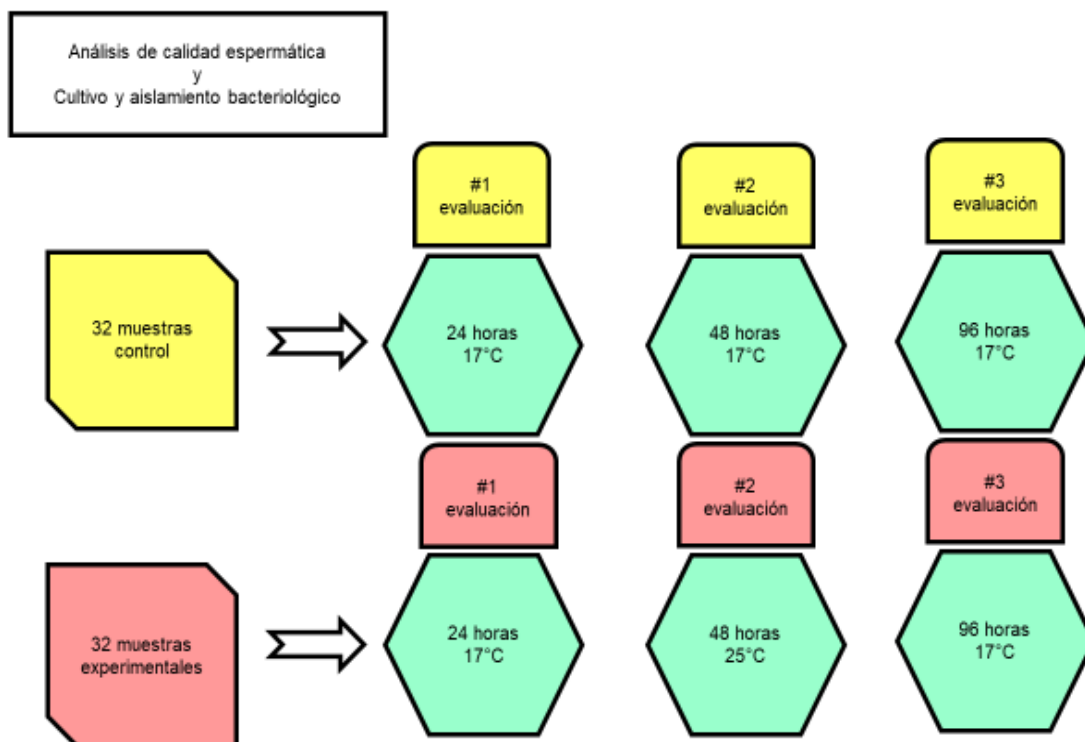


Imagen 7. Esquema de metodología a seguir en el análisis de calidad espermática y el cultivo y aislamiento bacteriológico.

Análisis y evaluación de calidad espermática (Sistema CASA AndroVision® y tinciones de fluorescencia)

Módulo de “Morfología y Morfometría” y “Motilidad y Concentración”

La muestra se incubó a 37° C/20min en una unidad de control para sistemas de calefacción Minitube HT 300® con bloque de calefacción para viales. Terminado el tiempo de incubación, se procedió a tomar la muestra de 1.5ml y se homogeneizó en un vórtex Biosan® MiniSpin MSC-6000 a 2000rpm/3seg. Después, se obtuvieron 3µl con una micropipeta Rainin® Pipet-Lite XLS de 0.5-10µl para colocar en la cámara de conteo Leja® con la punta previamente atemperada a 37° C en una mini-incubadora Minitube®, y se colocaron en una de las cuatro partes en que se divide la cámara Leja®, la cual estaba también previamente atemperada en la misma mini-incubadora Minitube® **(ver Imagen 8)**.

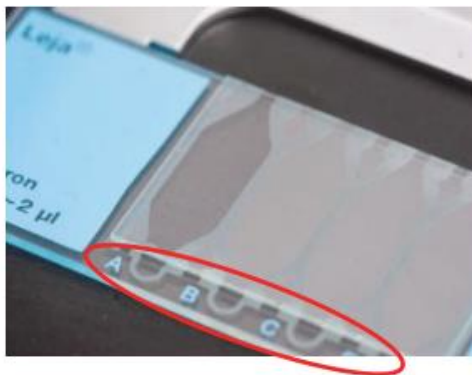


Imagen 8. Llenado correcto de la cámara Leja® y sus divisiones.

Se colocó la cámara de conteo Leja® en el microscopio Zeiss® AxioLab A1 con contraste de fases y mesa robotizada ScanStage® atemperada a 37° C, objetivo 10x sin fluorescencia, adaptador 1x y se procedió a realizar el análisis de calidad espermática con el software Sistema CASA AndroVision® por medio de los módulos de “Morfología y Morfometría” y “Motilidad y Concentración” para la obtención de los datos siguientes: % motilidad total, % motilidad progresiva, concentración espermática de la muestra [$10^6/\text{ml}$], células espermáticas inmóviles, anormalidades (cabeza, cola, gota proximal, gota distal), total de células espermáticas por dosis, espermatozoides viables por dosis y grado de aglutinación *(ver Imagen 9, 10 y 11)*.

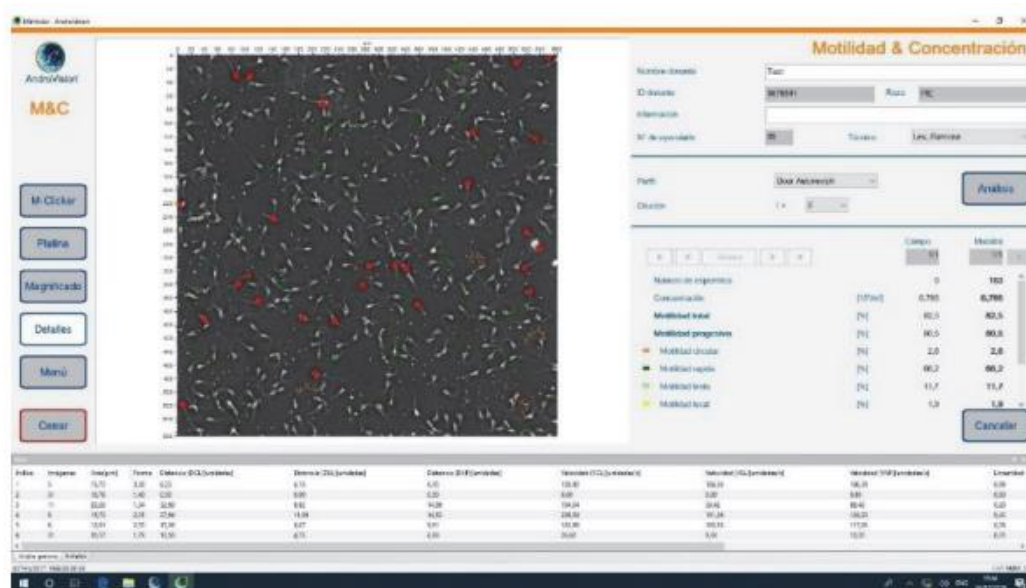


Imagen 9. Campo de video y campo de análisis del Sistema CASA AndroVision®.

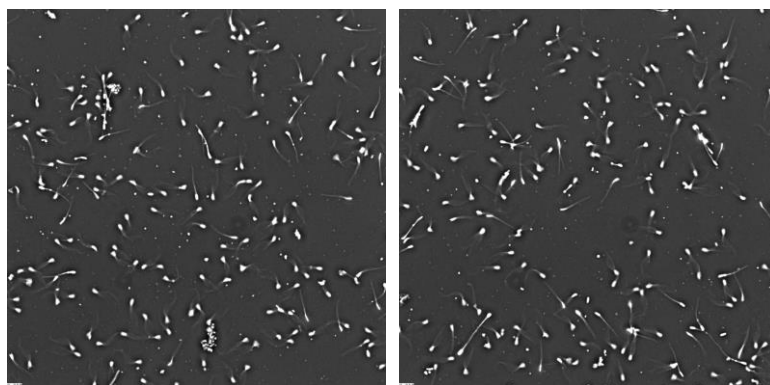


Imagen 10. Imágenes tomadas de los vídeos obtenidos de la evaluación del Sistema CASA AndroVision® y módulos de “Morfología y Morfometría” y “Motilidad y Concentración”.

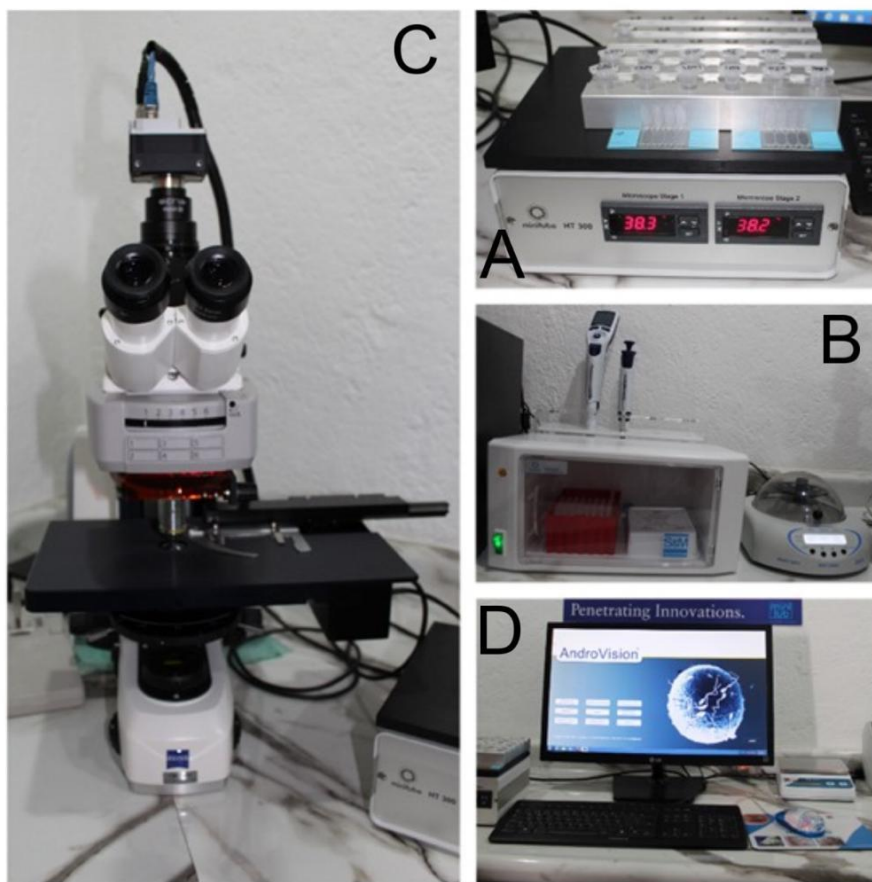


Imagen 11. **A)** Unidad de control para sistemas de calefacción atemperado a 37° C con bloque de calefacción para viales. **B)** Mini-incubadora atemperada a 37° C con puntas para pipeta y cámaras Leja® en su interior; vórtex y pipetas manual y electrónica. **C)** Microscopio Zeiss® AxioLab A1 con contraste de fases y mesa robotizada atemperada a 37 °C, objetivo 10x sin fluorescencia y adaptador 1x. **D)** Sistema CASA AndroVision® y módulos de “Morfología y Morfometría” y “Motilidad y Concentración”.

Módulo de “Análisis Avanzados” (tinciones de fluorescencia)

Las muestras teñidas con los tintes fluorescentes específicos emiten luz de una longitud de onda o de un color en específico. Los colorantes también son activados por la luz de una longitud de onda específica. Las tinciones fluorescentes tiñen estructuras específicas de los espermatozoides, dependiendo de la integridad y el estado funcional de estas estructuras. Estos diferentes colores son detectados y evaluados por el software AndroVision®. Debido a la alta velocidad de análisis, varios cientos de espermatozoides pueden ser analizados en muy poco tiempo (**ver Imagen 12**).



Imagen 12. Módulo de “Análisis Avanzados” del Sistema CASA AndroVision®.

Integridad de membrana (viabilidad)

Para el ensayo de la integridad de la membrana plasmática, se utilizó una doble fluorescencia con Hoechst 33342/PI. La Bisbenzimidaz (Hoechst 33342) es utilizada como una contra tinción nuclear que penetra la membrana celular en la

célula viva y emite una fluorescencia azul cuando se une al ADN por lo que se utiliza como un sistema de etiquetado del mismo. Por esta razón el ADN de todos los espermatozoides con membrana integra se etiquetaron en azul. Por su parte el Yoduro de Propidio (PI) es una contra tinción nuclear que no puede penetrar membranas celulares funcionales por lo que se utiliza para etiquetar células con membranas dañadas, anulando la tinción azul de Hoechst. Los espermatozoides con membranas dañadas se marcaron en rojo/violeta. Sobre esta base, AndroVision® determino el porcentaje de espermatozoides con membranas dañadas e intactas.

La muestra se incubó a 37° C/20min en una unidad de control para sistemas de calefacción Minitube HT 300® con bloque de calefacción para viales. Terminado el tiempo de incubación, se procedió a tomar la muestra de 1.5ml y se centrifugó en un vórtex marca Multispin MSC-6000® a 2000rpm/3seg. Después, se obtuvieron 500µl de dosis seminal con una pipeta electrónica (E4 XLS+®) y se colocaron en un microtubo para centrífuga SafeSeal Reagiergef®, el cual estaba previamente atemperado en el bloque de calefacción para viales a 37° C.

Posteriormente, se centrifugó la tinción en un vórtex marca Multispin MSC-6000® a 2000rpm/3seg, se tomó una muestra de 1.5µl de tinción Hoechst 33342/PI con una pipeta de 0.5-10 µl Pipet-Lite XLS® y se adicionó al microtubo que contenía la muestra de dosis seminal. La mezcla se centrifugó a 2000rpm/3seg y se incubó a 37° C/15 min.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a centrifugar nuevamente la muestra y se tomaron 5µl con una pipeta de 0.5-10µl Pipet-Lite XLS® para llenar cámara de conteo y análisis de motilidad del esperma marca Leja® con la punta previamente atemperada a 37° C en una mini-incubadora marca Minitube®, y se colocaron en una de las 4 partes en que se divide la cámara Leja®, la cual estaba también previamente atemperada en la misma mini-incubadora Minitube®.

Se colocó la cámara de conteo Leja® en el microscopio Zeiss AxioLab A1® con contraste de fases y mesa robotizada ScanStage® atemperada a 37° C, objetivo 10x con fluorescencia, adaptador 1x y se procedió a realizar el análisis de

integridad de membrana (viabilidad) con el Sistema CASA AndroVision® por medio de los módulos de “Análisis Avanzados” en el apartado “Viabilidad” (**ver Imagen 13**).

Doble tinción fluorescente Hoechst 33342/PI	
Tinción: Hoechst 33342	Tinción: PI (Yoduro de propidio)
Función: Penetra las membranas plasmáticas y se adhiere al ADN	Función: Penetra únicamente membranas plasmáticas dañadas
Color: Azul	Color: Rojo/Violeta
AndroVision® determina el % de espermatozoides con membranas dañadas o intactas Vivos/Muertos	

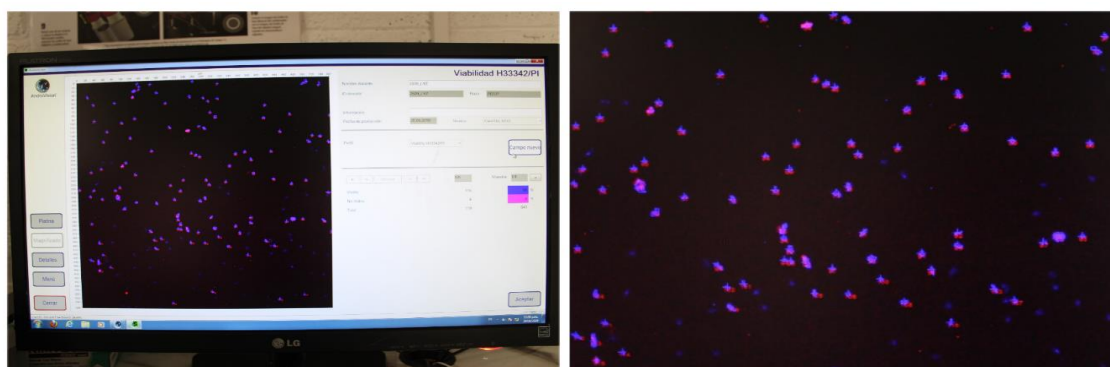


Imagen 13. Análisis de integridad de membrana (viabilidad) por medio de los módulos de “Análisis Avanzados” en el apartado “Viabilidad”.

Viable:	110	30 %
No-viable:	257	70 %
Total:	367	367

Integridad de acrosomas

Para el ensayo de la integridad del acrosoma, se utilizó una tinción de doble fluorescencia con H33342/FITC-PNA (isotiocianato de fluoresceína-aglutinina de maní). Esta molécula pertenece al grupo de los colorantes de xanteo (compuesto orgánico de color amarillo), también considerado un fluorocromo derivado de la fluoresceína. Los fluorocromos son moléculas capaces de emitir fluorescencia al ser excitadas a ciertas longitudes de onda. Por lo tanto, todos los espermatozoides

se marcaron en azul gracias a la tinción de H33342. Los acrosomas dañados de estas células se marcaron en verde cuando se aplicó la tinción FITC-PNA. Sobre esta base, AndroVision® determinó el porcentaje de espermatozoides con acrosomas dañados e intactos.

La muestra se incubó a 37° C/20 min en una unidad de control para sistemas de calefacción Minitube HT 300® con bloque de calefacción para viales. Terminado el tiempo de incubación, se procedió a tomar la muestra de 1.5ml y se centrifugó en un vórtex marca Multispin MSC-6000® a 2000rpm/3seg. Después, se obtuvieron 500µl de dosis seminal con una pipeta electrónica E4 XLS+® y se colocaron en un microtubo para centrífuga SafeSeal Reagiergef®, el cual estaba previamente atemperado en el bloque de calefacción para viales a 37° C.

Posteriormente, se centrifugó la tinción en un vórtex marca Multispin MSC-6000® a 2000rpm/3seg, se tomó una muestra de 270µl de tinción Hoechst 33342/FITC-PNA con una pipeta electrónica E4 XLS+® y se adicionó al microtubo que contenía la muestra de dosis seminal. La mezcla se centrifugó a 2000rpm/3seg y se incubó a 37° C/20min.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a centrifugar nuevamente la muestra y se tomaron 5µl con una pipeta de 0.5-10µl Pipet-Lite XLS® para llenar cámara de conteo y análisis de motilidad del espermatozoide marca Leja® con la punta previamente atemperada a 37° C en una mini-incubadora marca Minitube®, y se colocaron en una de las 4 partes en que se divide la cámara Leja®, la cual estaba también previamente atemperada en la misma mini-incubadora Minitube®.

Doble tinción fluorescente Hoechst 33342/FITC-PNA	
Tinción: Hoechst 33342	Tinción: FITC-PNA
Función: Penetra únicamente acrosomas intactos	Función: Penetra únicamente acrosomas dañados
Color: Azul	Color: Verde
AndroVision® determina el % de espermatozoides con acrosomas dañadas o intactos	
Importante para una fecundación exitosa	

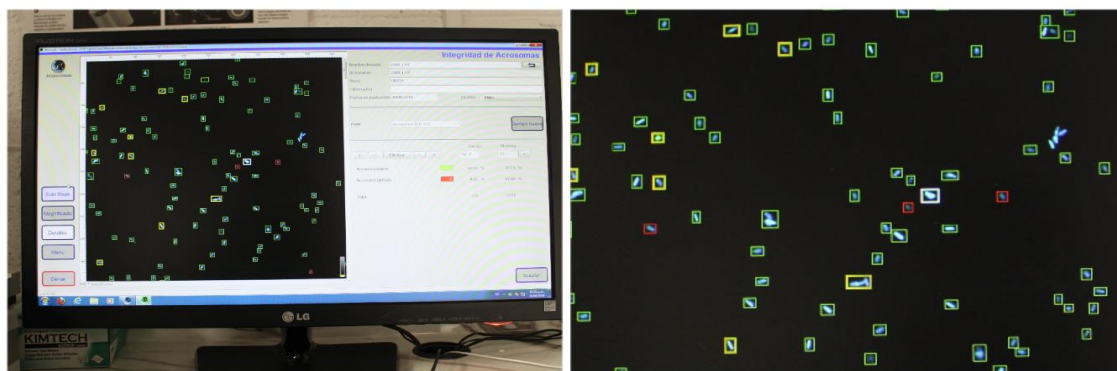


Imagen 14. *Análisis de integridad de acrosomas por medio de los módulos de “Análisis Avanzados” en el apartado “Acrosoma”.*

Se colocó la cámara de conteo Leja® en el microscopio Zeiss AxioLab A1® con contraste de fases y mesa robotizada ScanStage® atemperada a 37° C, objetivo 10x con fluorescencia, adaptador 1x y se procedió a realizar el análisis de integridad de acrosomas con el Sistema CASA AndroVision® por medio de los módulos de “Análisis Avanzados” en el apartado “Acrosoma” (**ver Imagen 14**).

Actividad mitocondrial

Para la evaluación de la actividad mitocondrial, se utilizó una doble tinción de fluorescencia con H33342/Rhodamin123. Todos los espermatozoides se marcaron en azul (H33342). Además, la pieza media del espermatozoide con mitocondrias activas se marcó en verde (Rodamina123). Sobre esta base, AndroVision® determinó el porcentaje de espermatozoides con alta actividad mitocondrial.

La muestra se incubó a 37° C/20 min en una unidad de control para sistemas de calefacción Minitube HT 300® con bloque de calefacción para viales. Terminado el tiempo de incubación, se procedió a tomar la muestra de 1.5ml y se centrifugó en un vórtex marca Multispin MSC-6000® a 2000rpm/3 seg. Después, se obtuvieron 500µl de dosis seminal con una pipeta electrónica E4 XLS+® y se colocaron en un microtubo para centrífuga SafeSeal Reagiergef®, el cual estaba previamente atemperado en el bloque de calefacción para viales a 37° C.

Posteriormente, se centrifugó la tinción en un vórtex marca Multispin MSC-6000® a 2000rpm/3 seg, se tomó una muestra de 40µl de tinción Hoechst



Imagen 16. Procedimiento de preparación de la muestra para llevar a cabo la evaluación de “actividad mitocondrial” por medio del módulo de “Análisis Avanzados”.

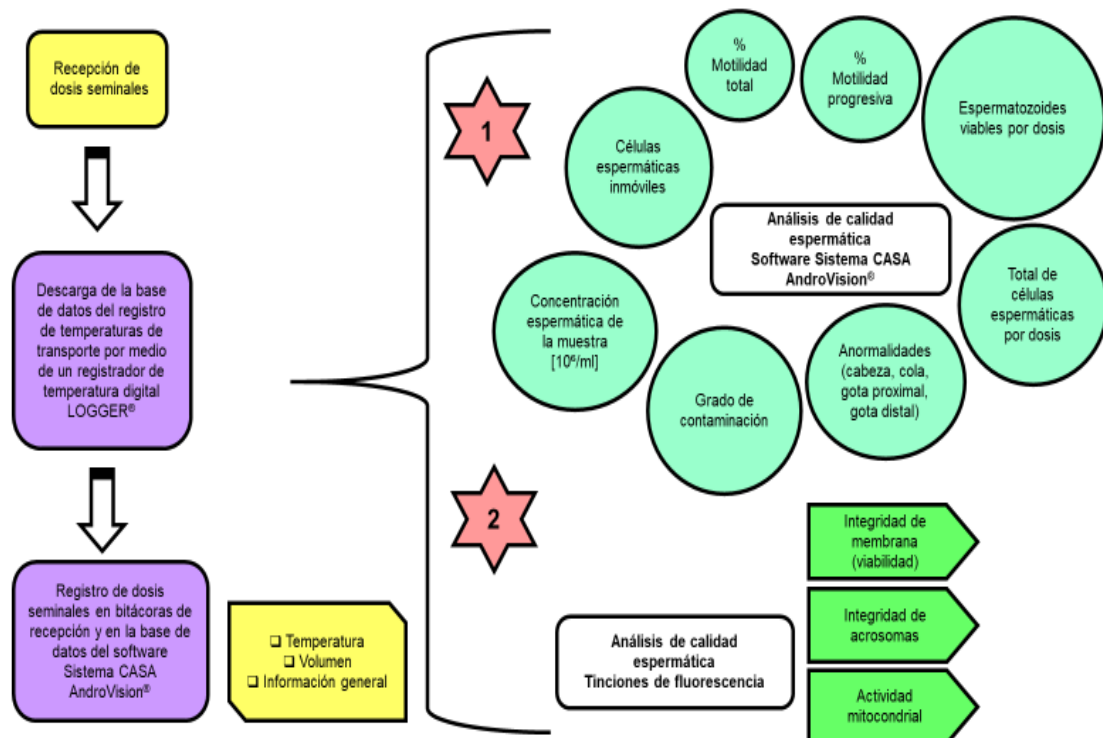


Imagen 17. Esquema general de metodología a seguir en el análisis de calidad espermática.

Análisis Bacteriológico

Preparación de medios de cultivo

Agar tripticasa soya (TSA)

Para el análisis bacteriológico, primero se realizó el medio de cultivo de Agar tripticasa soya (TSA), MCD LAB®, medio de cultivo para microorganismos no exigentes según las instrucciones del proveedor, se rehidrataron 50 g del medio en un litro de agua destilada, se dejó reposar de 10-15 minutos y posteriormente se calentó hasta el punto de ebullición hasta su disolución por completo del medio, se tapó el matraz con tapa de baquelita para esterilizar en autoclave a 121 °C/15-20 min. Posteriormente se dejó enfriar aproximadamente a 45-55 °C para realizar el vaciado en cajas Petri con una cantidad aproximada de 25 a 30 ml en el área de vaciado, hasta que gelificó. Se procedió a realizar la prueba de esterilidad incubando los medios a 37° C/24 horas. Pasado el tiempo, se identificaron y se pasaron al área de conservación y almacenamiento de medios.

Agar MacConkey (McC)

Para el análisis bacteriológico, primero se realizó con el medio de cultivo de Agar MCD LAB® que es un medio de cultivo selectivo y diferencial para el aislamiento de bacterias entéricas Gramnegativas, según las instrucciones del proveedor, se rehidrataron 50g del medio en un litro de agua destilada. Se dejó reposar de 10-15 minutos y posteriormente se calentó hasta el punto de ebullición hasta su disolución por completo del medio, se esterilizó en autoclave a 121° C/15-20min. Posteriormente se dejó enfriar aproximadamente a 43° C para realizar el vaciado en cajas Petri, todo esto en un área de vaciado con medidas de esterilidad. Una vez preparado el medio MacConkey (McC) se procedió a realizar la prueba de esterilidad incubando los medios a 37° C/24 horas. Pasado el tiempo, se identificaron y se pasaron al área de conservación y almacenamiento de medios.

Agar Sangre (AS) y agar chocolate (Ach)

Se realizó con el medio de cultivo de la MCD LAB[®]. Se rehidrataron 40g del medio TSA (agar soya tripticaseína) en un litro de agua destilada. Se dejó reposar 10-15 minutos y posteriormente se calentó hasta el punto de ebullición hasta su disolución por completo. Se esterilizó en autoclave a 121° C/15-20min. Se dejó enfriar aproximadamente a 43° C para realizar el vaciado de la sangre de bovino estéril al 5% en cajas Petri para hacer agar sangre (AS) y a 56° C para hacer agar chocolate (Ach). Una vez preparado el medio AS y Ach se procedió a realizar la prueba de esterilidad incubando los medios a 37° C/24 horas. Pasado el tiempo, se identificaron y se pasaron al área de conservación y almacenamiento de medios.

Cultivo bacteriológico

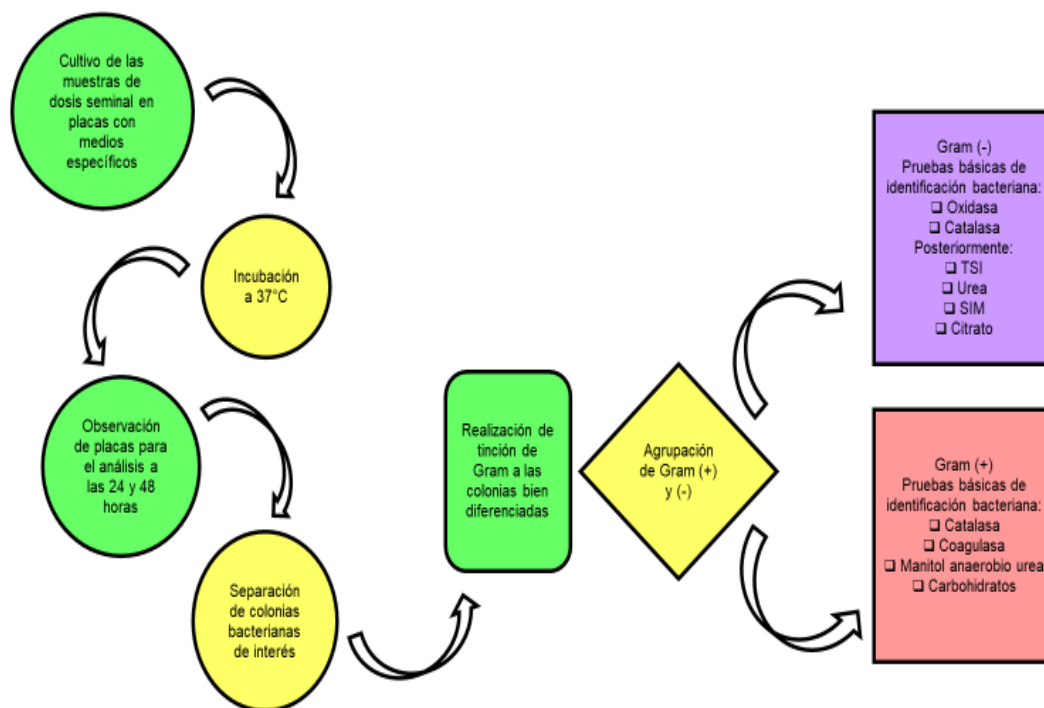


Imagen 18. Esquema general de metodología a seguir en el cultivo y aislamiento bacteriológico.

Se llevó a cabo el cultivo bacteriológico en medios específicos agar MacConkey, agar sangre y agar chocolate bajo una campana y 3 mecheros de alcohol para evitar cualquier riesgo de contaminación.

Las muestras destinadas para análisis bacteriológicos fueron sembradas en las placas bacteriológicas agregando 1ml de dosis seminal distribuidos por todo el agar y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente fueron llevadas al conservador de dosis seminales Minitube® atemperado a 37° C controlado por una unidad de control para sistemas de calefacción Minitube HT 200®. La lectura se realizó a las 24 y 48 horas (**ver Imagen 18 y 19**).

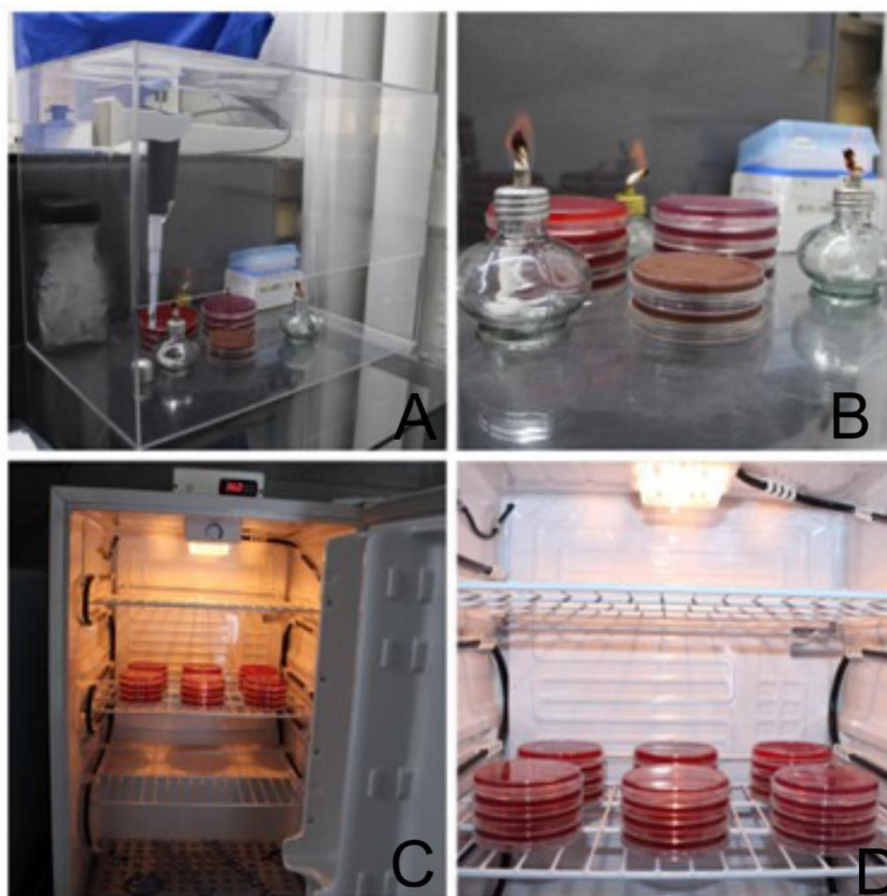


Imagen 19. A y B) Campana y mecheros de alcohol para evitar contaminación de los agares bacteriológicos. **C y D)** Conservador de dosis seminales atemperado a 37° C para la incubación de las placas bacteriológicas y unidad de control para sistemas de calefacción.

Aislamiento bacteriológico

En el caso del desarrollo bacteriano se realizó la tipificación bacteriana según la literatura, donde se menciona que el primer paso para la identificación bacteriana es realizar una Tinción de Gram para determinar morfología, afinidad tintorial y agrupación, para que posteriormente se desarrolle un protocolo según el resultado de dicha tinción.

Tinción de Gram

El primer paso que se realizó a las muestras que mostraron crecimiento bacteriano fue un frotis fijo en un portaobjetos limpio, marcando con lápiz graso el área donde se colocó una gota de muestra de cultivo con ayuda del asa microbiológica previamente esterilizada con calor al rojo vivo, dejando secar a temperatura ambiente la laminilla y se pasó tres veces por la llama del mechero con el frotis extendido hacia arriba para realizar la tinción de Gram. Posteriormente, se agregó el colorante primario (cristal violeta) y el catalizador de la reacción (bicarbonato de sodio) durante 15 segundos; se lavó con agua destilada para después agregar la solución mordente (yodo) durante 15 segundos más, se volvió a lavar con agua destilada y se agregó el decolorante (alcohol acetona) durante 3 segundos, se realizó otro lavado con agua destilada para finalmente agregar el colorante secundario y de contraste (fucsina básica) y se realizó el último lavado con agua destilada. Se secó con papel absorbente y se observó al microscopio con el objetivo de inmersión 100x para determinar la morfología y afinidad tintorial de las colonias en cuestión **(ver Imagen 20)**.

TINCIÓN DE GRAM

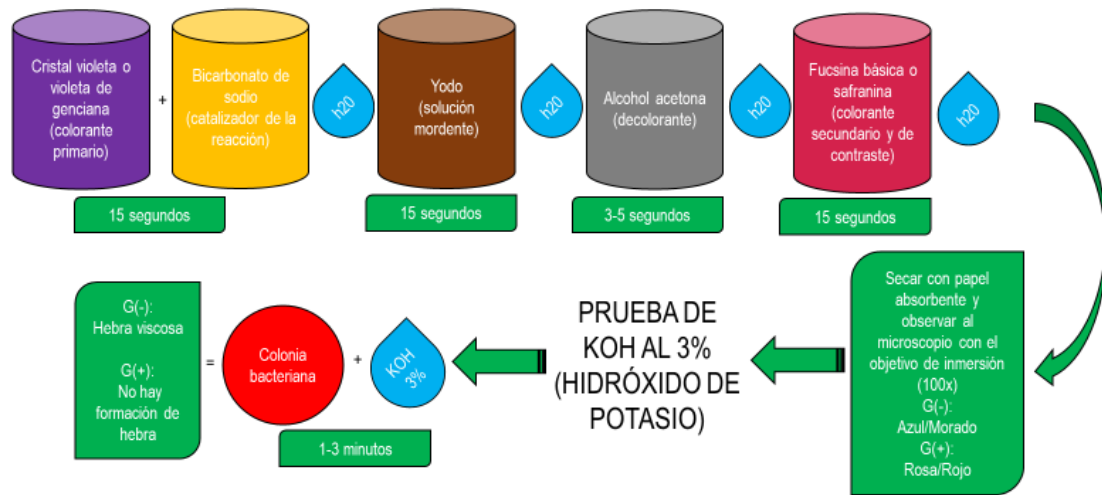


Imagen 20. Metodología “Tinción de Gram”.

Bacilos G (-)

Para los microorganismos Gram negativos se procedió a realizar la prueba de Oxidasa con ayuda de un asa de vidrio tomando una colonia bacteriana y frotándola sobre la superficie del papel filtro. La aparición de un color púrpura intenso en los primeros 10 segundos, indicaba una prueba positiva. Una prueba negativa estuvo indicada por cualquier otro color o ausencia de color. Las reacciones tardías fueron ignoradas. Posteriormente, se realizaron las pruebas bioquímicas triple azúcar hierro (por sus siglas en inglés TSI = Triple Sugar Iron), ácido sulfhídrico, indol, motilidad (por sus siglas en inglés SIM = Sulfide Indole Motility), Urea y Citrato para llegar al diagnóstico bacteriano (**ver Imagen 21 y 22**).

BACILOS G(-)

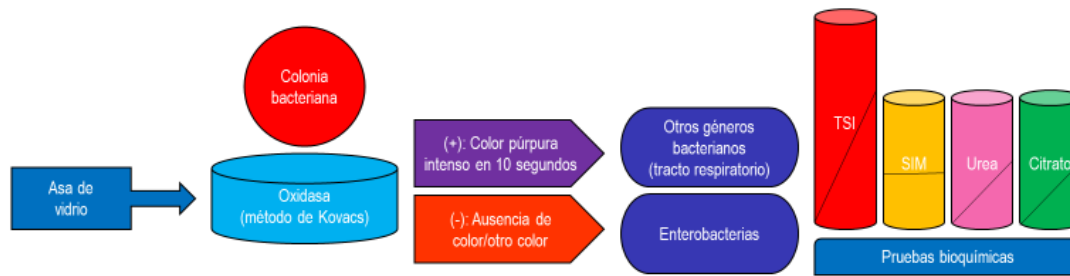


Imagen 21. Metodología “Bacilos G (-): parte 1.

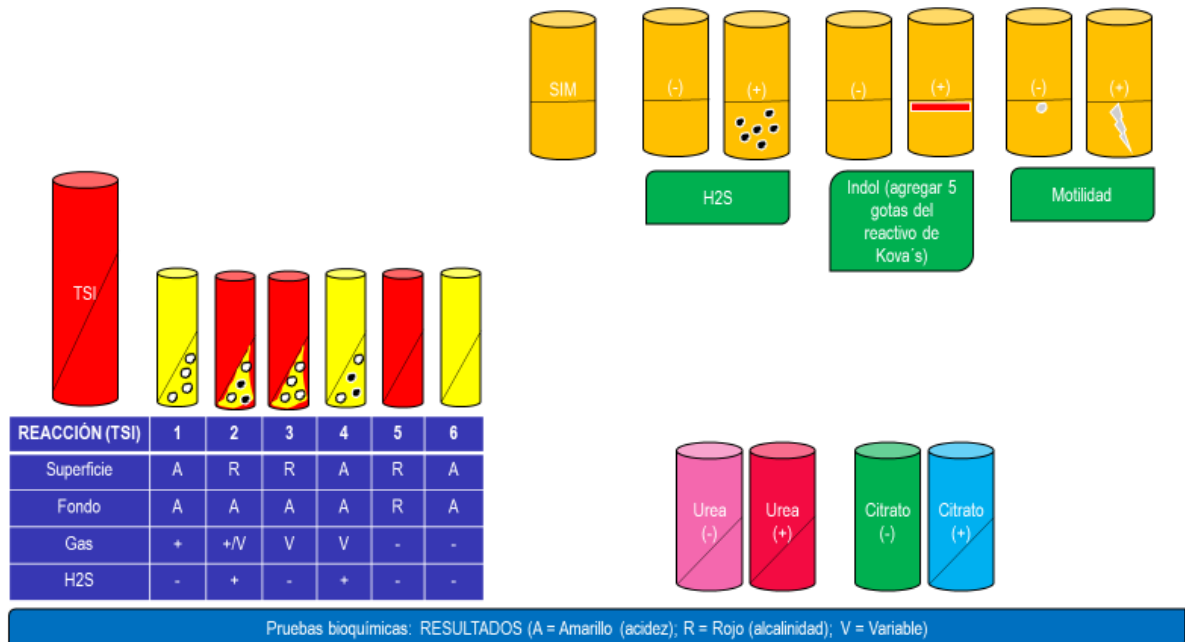


Imagen 22. Metodología “Bacilos G (-): parte 2.

Cocos G (+)

Para los cocos Gram positivos se procedió a tomar una colonia bacteriana con ayuda de un asa microbiológica previamente esterilizada y se realizó la prueba primaria catalasa, mediante la aplicación de una gota de peróxido de hidrógeno en una laminilla y posteriormente se agregó con el asa microbiológica la colonia bacteriana en estudio. Si presentaban una reacción positiva, que se observó con

la producción de burbujas, se consideró positiva y si no presentaba producción de burbujas se consideró negativo. Para el caso de los microorganismos positivos se realizó, crecimiento en agar “P”, manitol anaerobio y urea; en el caso de los catalasa negativos se inoculó un caldo sangre para observar la producción de hemolisinas solubles y también para inocular diferentes carbohidratos (glucosa, trealosa, sucrosa etc.) o alguna otra prueba requerida por las diferentes tablas de identificación que se utilizaron (**ver Imagen 23**).

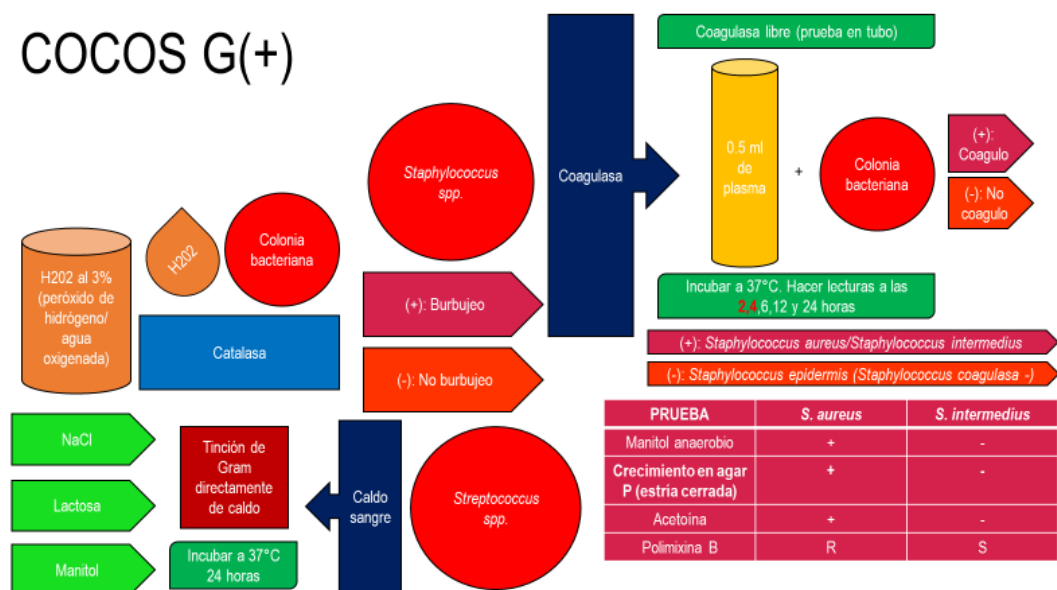


Imagen 23. Metodología “Cocos G (+)”.



Imagen 24. Procedimiento de cultivo y aislamiento bacteriológico.

Análisis estadísticos

Temperaturas de transporte

La temperatura de transporte (tt) para cada semana se dividió en 6 tratamientos: **T1:** 6pm-8:59pm, **T2:** 9:pm-11:59pm, **T3:** 12am-2:59am, **T4:** 3am-5:59am, **T5:** 6am-8:59am y **T6:** 9am-11:59am. Las temperaturas de los diferentes tratamientos no presentaron normalidad por la prueba de Kolmorov-Smirnov, no presentaron una homogeneidad de varianzas por la prueba de Levene. Por lo tanto, los tratamientos se evaluaron mediante la prueba de Kruskal Wallis para saber si existía una variación significativa de temperatura de transporte en cada semana; además, se realizó una comparación entre los tratamientos mediante la prueba de

Bonferroni para determinar qué tratamientos difirieron en cada semana con un nivel de significancia de 0.05.

Parámetros de calidad espermática

Se aplicaron modelos univariantes de medidas repetidas a los datos de 32 muestras experimentales, con el tiempo como factor intra sujeto, para realizar comparaciones entre las diferentes mediciones de un mismo atributo.

El modelo empleado fue el siguiente:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij},$$

Donde y_{ij} representó la respuesta promedio de cada variable analizada en el i -ésimo tiempo observado; μ es el efecto de la media general, α_i es el efecto del i -ésimo tiempo y ε_{ij} es el efecto del error aleatorio de la j -ésima observación en el i -ésimo tiempo.

Las variables que demostraron tener una distribución Normal fueron analizadas mediante un Análisis de Varianza (ANOVA/ANDEVA) de medidas repetidas mediante el procedimiento GLM del software IBM SPSS® Statistics 28; las variables que no demostraron una distribución Normal (*% de cabezas*, *% de gota proximal* y *grado de aglutinación*) se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Friedman de medidas repetidas, a través del procedimiento NPAR TEST.

Las comparaciones entre las medias estimadas de aquellas variables donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre sus mediciones en el tiempo se realizaron por el método de Bonferroni. Para todos los análisis se estipuló una significancia de 0.05.

El supuesto de normalidad se corroboró mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov, y el supuesto de esfericidad mediante la prueba de Mauchly. El tamaño del efecto relativo al factor tiempo fue evaluado mediante el estimador Eta parcial al cuadrado (η_p^2).

RESULTADOS

Temperatura de transporte

Las temperaturas de transporte (tt) identificadas por los loggers durante el periodo de estudio fueron de 28.5° C como máxima y mínima los 11° C. El tiempo de recorrido por paquetería en promedio fue de 16 horas 8 minutos (**ver Imagen 25**).

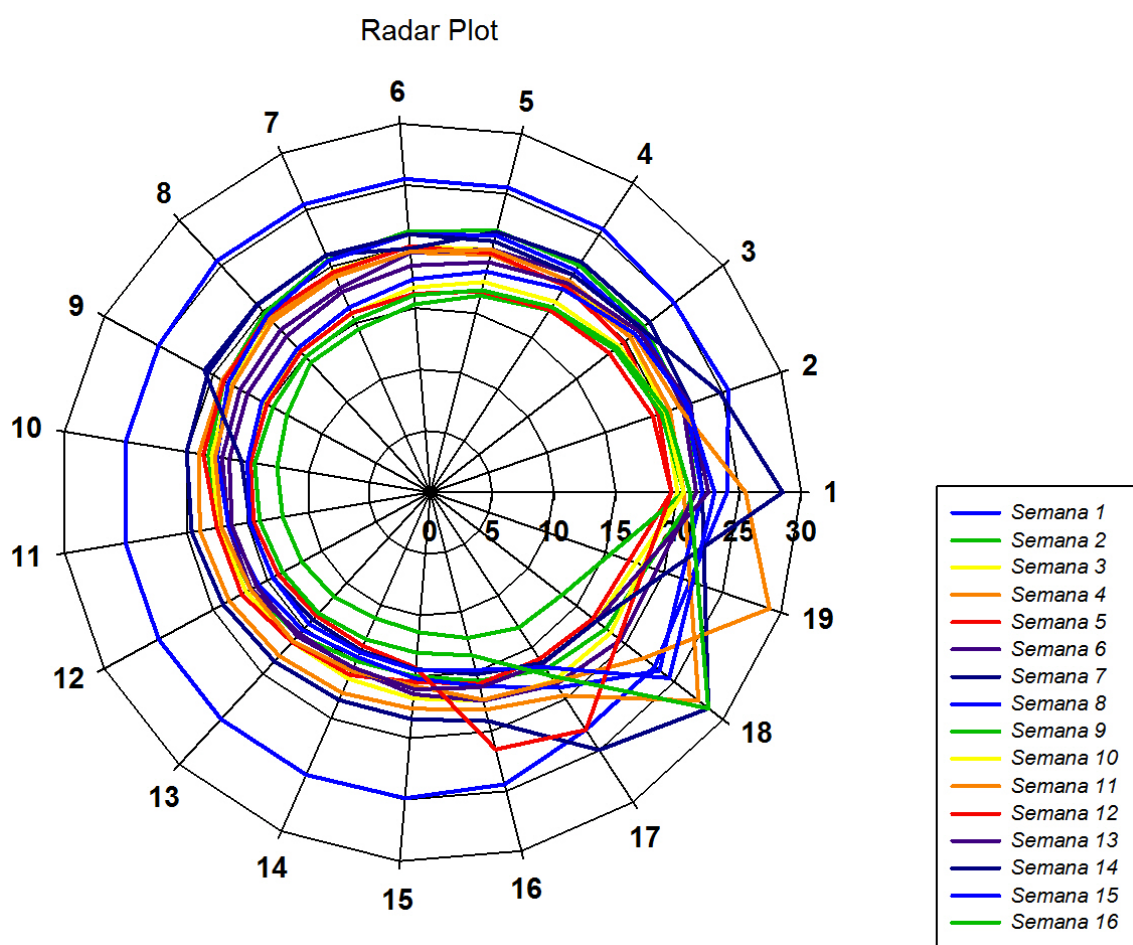


Imagen 25. Gráfica de monitoreo de temperatura de transporte.

El monitoreo de las tt demostró una variación estadísticamente significativa entre los tratamientos, por lo menos en uno de ellos durante las 16 semanas evaluadas (**ver Imagen 26**).

Imagen 26

MONITOREO DE LAS TEMPERATURAS DE TRANSPORTE POR SEMANA

TRATAMIENTO	SEMANAS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	25 ^c	22 ^d	20.5 ^d	20.5 ^e	20 ^c	21.5 ^e	22.5 ^e	22 ^d
2	25.5 ^b	22 ^d	20.5 ^d	20 ^d	20 ^c	20.5 ^d	22 ^e	21.5 ^d
3	25.5 ^b	20 ^c	19 ^c	19 ^c	19.5 ^b	18 ^c	20.5 ^c	19.5 ^c
4	25 ^b	17.5 ^b	17.5 ^b	19 ^b	17.5 ^a	16.5 ^b	19.5 ^b	16.5 ^a
5	25 ^b	15 ^a	16.5 ^a	18 ^a	15.5 ^a	15.75 ^a	18.5 ^a	15 ^b
6	23.5 ^a	16.5 ^b	18 ^b	18.5 ^b	16.5 ^a	18 ^c	19.5 ^c	16.5 ^{ac}
TRATAMIENTO	SEMANAS							
	9	10	11	12	13	14	15	16
1	19.5 ^e	19.5 ^e	21 ^d	19 ^d	22 ^e	21.5 ^d	21.5 ^e	19.5 ^e
2	16.5 ^d	17.5 ^d	19.5 ^c	17.5 ^d	19.25 ^d	21 ^c	18.5 ^d	17 ^d
3	14 ^c	15.5 ^b	18 ^b	16 ^c	17 ^c	20.5 ^b	16 ^c	15 ^c
4	12 ^b	15 ^c	16.5 ^a	14.75 ^b	16.5 ^b	14.5 ^a	15 ^b	14 ^b
5	11.5 ^a	14 ^a	16 ^a	13.75 ^a	16 ^a	14.5 ^a	14.5 ^a	13 ^a
6	12.5 ^b	16 ^c	18.6 ^c	14.5 ^b	16.5 ^b	16.5 ^b	15.5 ^c	14 ^c

Imagen 26. ^a – ^e Literales diferentes refieren diferencias significativas entre los tratamientos por semana ($P < 0.05$). Colores en naranja indican aumento de temperatura por arriba de la recomendación. Colores en azul indican disminución de temperatura por debajo de la recomendación.

Parámetros de calidad espermática

Los resultados de las metodologías aplicadas se muestran en el **Cuadro 4, 5, 6 y 7**, donde se aprecian las medias y sus desviaciones estándar, entre paréntesis se muestran los intervalos de confianza al 95% para cada media estimada; también, en aquellas variables donde se encontraron efectos significativos del tiempo, se

muestran las diferencias entre las medias mediante literales, y cuál fue el tamaño del efecto del tiempo sobre estas diferencias. En los mismos cuadros se reportan las variables que se analizaron con la prueba no paramétrica.

Cuadro 4
RESULTADO DE LAS METODOLOGÍAS APLICADAS EN LAS VARIABLES
CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA, MOTILIDAD TOTAL, MOTILIDAD
PROGRESIVA Y CÉLULAS POR CAMPO

<i>Tiempo</i>	<i>Concentración espermática</i>	<i>Motilidad total</i>	<i>Motilidad progresiva*</i>	<i>Células por campo</i>
24 h	0.042±0.001 (0.040 - 0.043)	86.959±0.569 (85.799 - 88.120)	82.041±0.683 (80.647 - 83.434) ^a	204.219±5.647 (192.702 - 215.735)
48 h	0.042±0.001 (0.040 - 0.044)	85.603±0.512 (84.559 - 86.647)	78.978±0.62 (77.714 - 80.243) ^b	207.094±5.606 (195.66 - 218.527)
96 h	0.042±0.001 (0.040 - 0.043)	86.65±0.473 (85.686 - 87.614)	80.794±0.621 (79.527 - 82.061) ^a	204.563±5.610 (193.121 - 216.004)

a, b, c Diferentes literales refieren diferencias significativas entre las medias ($p < 0.05$).

** $\eta p^2 = 0.53$.*

Los resultados de las variables concentración espermática, motilidad total y células por campo, no refieren diferencias significativas ($P > 0.05$). La variable motilidad progresiva, si presento diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las 24 y 48 horas, así como entre las 48 y 96 horas; entre las 24 y 96 horas no existió diferencia.

Cuadro 5

RESULTADO DE LAS METODOLOGÍAS APLICADAS EN LAS VARIABLES % DE CABEZAS, % DE COLAS, % DE GOTA PROXIMAL Y % DE GOTA DISTAL

<i>Tiempo</i>	<i>% de cabezas¹</i>	<i>% de colas</i>	<i>% de gota proximal¹</i>	<i>% gota distal*</i>
24 h	0.568±0.024 (0.521 - 0.615)	1.607±0.156 (1.289 - 1.925)	1.291±0.074 (1.144 - 1.439)	1.701±0.173 (1.349 - 2.053) ^a
48 h	0.537±0.022 (0.492 - 0.581)	1.412±0.097 (1.215 - 2.61)	0.985±0.065 (0.856 - 1.114)	1.398±0.142 (1.109 - 1.688) ^{ab}
96 h	0.611±0.032 (0.547 - 0.675)	1.601±0.158 (1.279 - 3.924)	1.148±0.071 (1.007 - 1.29)	1.174±0.106 (0.957 - 1.391) ^b

a, b Diferentes literales refieren diferencias significativas entre las medias (p<0.05).

1 Variable analizada con prueba de Friedman.

** $\eta p^2 = 0.11$.*

Los resultados de las variables % de cabezas, % de colas y % de gota proximal, no refieren diferencias significativas ($P>0.05$). La variable % de gota distal, si presento diferencias significativas ($P<0.05$) entre las 24 y 96 horas; entre las 24 y 48 horas no existió diferencia, así como tampoco entre las entre las 48 y 96.

Cuadro 6

RESULTADO DE LAS METODOLOGÍAS APLICADAS EN LAS VARIABLES % ANORMALIDADES, AGLUTINACIÓN, % DE CÉLULAS VIABLES Y % DE CÉLULAS NO VIABLES

<i>Tiempo</i>	<i>% de anormalidades</i>	<i>Aglutinación¹</i>	<i>% de células viables</i>	<i>% de células no viables</i>
24 h	5.044±0.259 (4.514 - 5.573)	0.328±0.059 (0.210 - 0.446)	94.639±0.218 (94.196 - 95.083)	5.361±0.218 (4.917 - 5.804)
48 h	4.337±0.195 (3.939 - 4.736)	0.391±0.061 (0.268 - 0.513)	94.651±0.251 (94.139 - 95.164)	5.349±0.251 (4.836 - 5.861)
96 h	4.468±0.235 (3.989 - 4.947)	0.391±0.061 (0.268 - 0.513)	94.849±0.251 (94.338 - 95.361)	5.151±0.251 (4.639 - 5.662)

1 variable analizada con prueba de Friedman.

Los resultados de las variables % de anormalidades, aglutinación, % de células viables y % de células no viables no refieren diferencias significativas ($P>0.05$).

Cuadro 7

RESULTADO DE LAS METODOLOGÍAS APLICADAS EN LAS VARIABLES % DE ACROSOMA INTACTO, % DE ACROSOMA DAÑADO, % DE MITOCONDRIA ACTIVA Y % DE MITOCONDRIA INACTIVA

<i>Tiempo</i>	<i>% de acrosoma intacto</i>	<i>% de acrosoma dañado</i>	<i>% de mitocondria activa</i>	<i>% de mitocondria inactiva</i>
24 h	93.711±0.216 (93.27 - 94.153)	6.289±0.216 (5.847 - 6.73)	93.828±0.262 (93.294 - 94.361)	6.172±0.262 (5.639 - 6.706)
48 h	93.659±0.236 (93.177 - 94.142)	6.341±0.236 (5.858 - 6.823)	94.109±0.262 (93.575 - 94.643)	5.891±0.262 (5.357 - 6.425)
96 h	93.57±0.244 (93.072 - 94.068)	6.43±0.244 (5.932 - 6.928)	94.336±0.296 (93.732 - 94.939)	5.664±0.296 (5.061 - 6.268)

Los resultados de las variables % de acrosoma intacto, % de acrosoma dañado, % de mitocondria activa y % de mitocondria inactiva no refieren diferencias significativas ($P>0.05$).

Recuento bacteriano total y aislamiento de bacterias

El 5.62% del total de evaluaciones realizadas (11 de 192), dio positivo por contaminación bacteriana. Los recuentos de células bacterianas en las dosis seminales variaron de 1 a 20 UFC/ml después de 48 horas de almacenamiento en los rangos de temperatura de 17°- 25°C (tomando en cuenta las dosis control y las dosis experimentales). A continuación, se enumeran las bacterias aisladas de las muestras de dosis seminal y su frecuencia de aparición (**ver Cuadro 8**).

Cuadro 8

**RESULTADOS DE LA TIPIFICACIÓN DE BACTERIAS DE DOSIS SEMINALES
EN EL GRUPO CONTROL Y EXPERIMENTAL**

Semana	Grupo	Tiempo (hr)	Microorganismo	UFC/ml
1	Experimental	24	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
1	Experimental	48	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
1	Experimental	96	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20
3	Control	96	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	5
3	Control	96	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	9
3	Experimental	96	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
3	Experimental	96	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8
4	Control	96	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
4	Control	96	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
4	Experimental	96	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
4	Experimental	96	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5

Del 100% de bacterias aisladas (11 de 11), resultaron Gram negativas, dando como resultado el aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* en un 81.81% y *Acinetobacter iwoffii* en un 18.18%.

DISCUSIÓN

La evaluación de los parámetros espermáticos en el análisis del semen es un componente esencial para medir la calidad o viabilidad de las células espermáticas de las dosis seminales, ya que los resultados de la evaluación pueden interpretarse para el diagnóstico y el pronóstico de trastornos reproductivos (*Brito et al.*, 2016).

La inseminación artificial con semen líquido conservado es la técnica de reproducción asistida más eficaz y ampliamente utilizada en la cría de cerdos. En la gestión de la producción de las dosis de semen, es particularmente importante monitorear la temperatura durante el transporte, así como también la temperatura de almacenamiento de las dosis seminales (*Henning et al.*, 2022)

Investigaciones recientes demuestran el impacto negativo que ejercen los cambios de temperatura sobre la calidad del espermatozoides durante el envío a temperaturas ambientales cálidas. El espermatozoides de verraco es susceptible a los cambios de temperatura, lo que podría atribuirse al contenido de ácidos grasos insaturados en la membrana plasmática. Cuando los espermatozoides sufren cambios de temperatura, su arquitectura lipídica y fluidez de la membrana plasmática se altera, provocando una pérdida en la calidad y funcionalidad del espermatozoides. Se ha observado que la motilidad de los espermatozoides puede reducirse notablemente después de alcanzar los 30° C, por consiguiente, implica la pérdida de motilidad de los espermatozoides causada por los cambios de temperatura permanente.

Aunado a esto, se ha observado una disminución de la viabilidad del espermatozoides y de la integridad del acrosoma. El almacenamiento de semen de verraco a temperaturas >20° C o <15° C produce pérdida de la calidad. Por lo tanto, se recomienda una temperatura de almacenamiento de 17 a 25° C, para no inducir un shock de frío ni un consumo excesivo de energía (*Henning et. al*, 2022). La temperatura elevada durante el transporte promueve la apoptosis de los espermatozoides, lo que resulta en pérdida de calidad del espermatozoides (*Li et. al*, 2023).

Existen investigaciones donde el objetivo es simular el movimiento de transporte de las dosis seminales mediante agitación encontrando que la motilidad total se redujo en promedio entre 3.4% y 6.3% y la motilidad progresiva se redujo en un rango similar en las dosis sometidas a temperatura de 22° C (*Paschoal et. al*, 2021)

Por otra parte, *Schulze et al.*, 2013, sugieren que el descenso de la temperatura perjudica gravemente la función de los espermatozoides en cuanto a motilidad e integridad de la membrana durante los primeros tres días de almacenamiento. Esto sugiere que el estrés térmico por frío da como resultado una menor calidad del semen almacenado en comparación con el aumento de temperatura y conservación de las dosis por arriba de los 17° C.

Henning et. al, 2022, renueva la percepción actual sobre el almacenamiento y los límites de temperatura para el semen de verraco. Señala que el choque por temperatura alta aumenta las concentraciones de iones de calcio intracelulares libres y cambios similares a la capacitación en las células viables, por lo que existe la necesidad de evaluar urgentemente dosis seminales conservadas o estresadas a 20-25° C debido a la falta de sustento o evidencia científica de un agotamiento metabólico de los espermatozoides. Los resultados de su estudio demuestran que la temperatura de almacenamiento óptima determinada empíricamente de 15-20° C, se puede ampliar a 15-25° C sin afectar el estado energético, motilidad y viabilidad de los espermatozoides del verraco. El objetivo de su trabajo principalmente fue entender la alteración del metabolismo energético inducido por el almacenamiento a largo plazo en diferentes temperaturas y posibles efectos sobre la supervivencia y la motilidad de los espermatozoides. El almacenamiento a 17° C, que se utiliza habitualmente para el semen de verraco, dio como resultado una calidad de esperma estable y mantuvo altos niveles de ATP, sin embargo, el contenido de ATP de las muestras de semen a 5 °C fue inferior.

González et. al, 2023, encontraron variaciones en temperaturas de las cajas de envío de 16-25.5° C y de las dosis de 14.3-26.4° C, lo cual reflejaba notables cambios de las condiciones ambientales durante el tiempo de transporte entre 27 y

28 horas. Dichas variaciones se vieron correlacionadas con la mayoría de los parámetros de motilidad y morfología aceptables en los espermatozoides; de manera más específica, observaron parámetros de motilidad más altos en muestras que se mantuvieron a temperaturas entre 15-20° C. Los resultados en la temperatura de transporte por este autor difieren a nuestros resultados obtenidos durante las 16 semanas de la presente tesis donde los resultados de nuestro monitoreo de la temperatura de transporte presento un rango de 11° C a 28.5° C de temperaturas mínima y máxima durante 16 horas en promedio de transporte por mensajería. Nuestros resultados fueron temperaturas más drásticas y no presentaron cambios en la motilidad y morfología. Sin embargo, nuestros resultados presentan una similitud con *Barna et. al*, 2021, en sus variaciones de temperatura en las cajas de envío de dosis, durante su transporte en avión desde Dinamarca hasta Serbia de hasta 11-15° C; por debajo de las recomendadas para su transporte (16-18° C) y variaciones de temperatura durante su transporte por automóvil hasta el laboratorio de evaluación. Observaron mejores parámetros de motilidad en las dosis transportadas dentro de su margen de seguridad establecido.

En la industria de la conservación del semen de verraco, los requisitos para un eyaculado normal según varios autores, se estipulan a menudo como un mínimo de 75% de espermatozoides morfológicamente normales y una motilidad total >70% con un número total de espermatozoides por dosis de aproximadamente 2,000 millones (*Boe-Hansen y Satake*, 2019). Las casas genéticas porcinas han definido umbrales individuales para el semen viable en un 60-80% para la motilidad total (*Waberski et al.*, 2019). Otros autores sugieren los estándares mínimos para el semen en cuanto a motilidad total, 70% y morfología de los espermatozoides únicamente 20-30% de formas anormales (*Brito et al.*, 2016). Las comparaciones entre casas genéticas pueden ser limitadas debido a los diferentes métodos de evaluación del semen y la ausencia de comparaciones entre laboratorios de andrología. Los valores de distintas casas genéticas para el porcentaje mínimo permitido de motilidad total varían entre 60-80%; en cuanto a motilidad progresiva, el rango va de 50-70%; anomalías espermáticas, el

máximo permitido es de 30%, días de almacenamiento únicamente son 4 y la contaminación bacteriana tiene un valor permitido de los 0-300 UFC/ml. Medidas de calidad menos estrictas raramente se utilizan en la industria (*Waberski et al., 2019*).

En cuanto a la innovación en la evaluación complementaria mediante el módulo de tinciones de fluorescencia por el sistema CASA® los valores permitidos de células viables, acrosomas intactos y mitocondrias activas debían ser mayores al 80%. Es importante señalar que en la práctica diaria de los servicios de evaluación de un laboratorio de andrología veterinaria raramente son ofertados estos servicios al público en general.

Los hallazgos de este estudio muestran que la motilidad del espermatozoide del verraco, integridad de la membrana plasmática (viabilidad), integridad de acrosomas y actividad mitocondrial que fueron evaluados mediante las tinciones de fluorescencia, no se deterioran aplicando un estrés térmico de 25° C, ni con los días de almacenamiento (96 horas). Estos resultados difieren lo previamente informado sobre efectos negativos del tiempo en el espermatozoide de verraco durante la conservación a largo plazo a temperaturas superiores a 15 °C (*Gaczarzewicz et al., 2015*).

Las diferencias en la motilidad observadas por la temperatura y el tiempo de almacenamiento no estuvieron acompañadas por diferencias en los parámetros que caracterizan la integridad de la membrana plasmática (viabilidad), integridad de acrosomas y actividad mitocondrial respectivamente. A pesar del estrés térmico aplicado a las dosis seminales, la proporción de espermatozoides con las membranas plasmáticas intactas, la integridad de acrosoma y la actividad mitocondrial, se mantuvieron en un nivel alto hasta el final de nuestro proyecto.

Esto concuerda con otros autores que demostraron que la membrana plasmática de espermatozoides de verraco puede mantener su integridad y funcionalidad incluso bajo condiciones de 25° C donde fueron evaluados con una tinción diferente a la de nuestro protocolo, mediante la tinción SYBR-14/PI apuntando a un nivel relativamente alto de integridad y función de la membrana espermática

durante 10 días. De lo contrario, los mismos autores indican la respuesta funcional de los espermatozoides mediante su actividad mitocondrial a la temperatura y al período de almacenamiento, donde disminuyó durante el tiempo de almacenamiento; sin embargo, la conservación a 5° C resultó en una mayor disminución en porcentaje de espermatozoides con mitocondrias activas que almacenamiento a 16° C, concluyendo que la exposición a 25 °C provocó un envejecimiento prematuro en el esperma almacenado causado por una inhibición insuficiente del metabolismo. Esto puede explicar el ligero impacto negativo del estrés asociado con la pérdida de la función mitocondrial. causado por el almacenamiento prolongado a 16° C (*Gaczarzewicz et al.*, 2015).

A diferencia de esta investigación, *Schulze et al.*, 2013, utilizó el diluyente Androstar® Plus. Una desventaja de estos diluyentes consiste ciertamente en la temperatura de almacenamiento requerida, por regla general, entre 15°-18° C. Esta temperatura de almacenamiento representa un problema logístico no sólo para el transporte sino también para el almacenamiento en la granja. Lo anterior indica que el tipo de diluyente de semen utilizado sí afecta los resultados obtenidos, ya que pueden tener el potencial de atenuar al impacto negativo de un descenso o ascenso acelerado de la temperatura durante el procesamiento o transporte del semen.

En el presente trabajo, el diluyente utilizado fue el Androstar® Premium en donde las células espermáticas son amortiguadas de manera muy eficiente y en un rango de temperatura muy amplio entre +5° C y +25° C. El semen porcino se puede almacenar por un tiempo muy prolongado y en un estado óptimo gracias a este medio, así como ofrecer una protección excepcional contra fluctuaciones no intencionales de temperatura.

Sin embargo, el almacenamiento prolongado por encima de 25° C requiere considerar un mayor riesgo de crecimiento bacteriano a menos que sea efectivo el control antimicrobiano (*Henning et. al*, 2022). Se sabe que la contaminación bacteriana es perjudicial para la calidad del semen, ya que provoca la aglutinación de los espermatozoides y reduce la motilidad (*Althouse y Lu*, 2005). También

puede disminuir la longevidad de los espermatozoides durante su almacenamiento y su fertilidad (Maroto et al., 2010; Sepúlveda et al., 2014).

Se han aislado muchas bacterias diferentes tanto del semen crudo como de dosis de semen ya procesadas (Kuster y Althouse, 2016; Althouse et al., 2000). La mayoría pertenecen a la familia Enterobacteriaceae (Ubeda et al., 2013). Dentro de esta familia, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, o *Proteus mirabilis* han demostrado estar presentes en un alto porcentaje de muestras y su presencia se asocia con una motilidad reducida (Ubeda et al., 2013)

Enterobacter cloacae en una proporción de espermatozoides: bacterias de 1:5 y 1:10 redujo la motilidad y la integridad de la membrana de los espermatozoides y provocó su aglutinación en dosis de semen almacenadas a 15-17°C (Prieto et al., 2014). *Clostridium perfringens* redujo la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides tras la inoculación de 10^8 UFC/ml en dosis de semen y 24 horas de incubación a 37° C o en almacenamiento a 15° C. Del mismo modo, la contaminación experimental con 2×10^7 o 2×10^8 UFC/ml de *Pseudomonas aeruginosa* en el semen de verraco dio lugar a una disminución significativa de los porcentajes de motilidad espermática total y progresiva, de la viabilidad espermática y de la integridad del acrosoma (Sepúlveda et al., 2014).

Las interacciones exactas de las diferentes bacterias con los espermatozoides aún no se han investigado del todo. Se descubrió que las especies cultivadas a partir del semen diluido eran diferentes de las aisladas a partir del eyaculado crudo, lo que indica que una gran parte de la contaminación de la dosis de semen se origina en el entorno del laboratorio y no del verraco, es decir puede existir contaminación bacteriana por el manejo del semen en los CTG o material contaminado (Kuster y Althouse, 2016).

Por tal motivo, la contaminación del semen de verraco al tener factores de riesgo extrínsecos e intrínsecos requiere el uso de diluyentes que puedan garantizar una protección eficaz contra varias especies de bacterias aisladas en este vehículo potencialmente contaminado. Además, al utilizar el mismo número de antibióticos a lo largo de los años, las bacterias pueden desarrollar resistencia. Ya que, como

indica la bibliografía (Althouse, 2008), la presencia de bacterias en las dosis de semen durante el almacenamiento provoca efectos nocivos en la motilidad del semen y, por consiguiente, en la eficiencia reproductiva del hato. Según diferentes estudios (Althouse, 2005) el semen de cerdo suele contener unas 10^4 - 10^6 UFC/ml de bacterias provocando la pérdida de calidad espermática debido a su abundancia bacteriana. Aunque no existe un valor de corte general de UFC permitidas en un ml para definirlo como perjudicial para los espermatozoides, hay algunos estudios que informan de concentraciones de 10^7 - 10^8 UFC/ml como problemáticas para la calidad del esperma (Bussalleu et al., 2011; Pinart et al., 2017; Sepúlveda et al., 2014). De acuerdo con el Código Zoosanitario Internacional de la OIE (2019), “se pueden evitar contaminaciones excesivas del semen” y el “recuento no debe exceder 5×10^3 UFC por ml” (Nitsche-Melkus et al., 2019).

El presente estudio informó que las especies bacterianas contaminantes aisladas de las dosis seminales son diferentes de las reportadas en la literatura a excepción de Althouse y Lu en año 2005, quienes también aislaron las mismas bacterias que el presente estudio dando como resultado una alta incidencia de aglutinación de espermatozoides, acrosomas dañados, escasa motilidad de los espermatozoides y la reducción de la vida útil (es decir, la disminución de la longevidad del esperma) del producto del semen diluido. Las bacterias aisladas resultaron ser *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter iwoffii*, mientras que otros autores han contado otras 18 especies bacterianas en Norteamérica, pero a diferencia de estos 2 estudios, fueron aisladas en semen sin diluir (Althouse et al., 2000).

La mayoría de los contaminantes identificados en las dosis seminales son bacterias Gram negativas, casi todas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Se ha demostrado científicamente que la presencia de contaminantes daña la viabilidad y la fertilidad del semen (Althouse, 2008). Un estudio informó de que los controles microbiológicos en las explotaciones de verracos que se quejaban de problemas de gestión reproductiva (aglutinación de

esperma, disminución de la longevidad del esperma, aumento de los retornos regulares al celo), mostraron presencia de bacterias en el 66% de las dosis seminales (*Bresciani et al.*, 2014).

De acuerdo con la hipótesis establecida en nuestro estudio, se demostró que las dosis sometidas a estrés térmico, presentaron diferencias estadísticamente significativas en la motilidad progresiva y anormalidades como gota distal, sin embargo, el crecimiento bacteriano identificado en dosis del grupo control se atribuye a una contaminación desde la producción de las dosis seminales y no al efecto del estrés térmico sometido al grupo experimental.

CONCLUSIONES

El monitoreo de las tt es importante para identificar los cambios bruscos de temperatura que pueden afectar la calidad de las células espermáticas y el efecto del diluyente para preservar las dosis seminales. El monitoreo de las tt de las dosis seminales resultó significativo al momento de su evaluación, determinando un estrés térmico; por lo que es necesario evaluar las variables tradicionales de calidad espermática por métodos convencionales o avanzados para determinar la viabilidad espermática y el efecto protector de los diluyentes de máxima protección.

El Sistema CASA AV® permitió la evaluación con exactitud y precisión de la calidad espermática en dosis seminales, analizando la biología básica del espermatozoide porcino reduciendo el tiempo de evaluación por muestra, además, los módulos complementarios proporcionaron una evaluación de la membrana espermática, el acrosoma y la actividad mitocondrial.

Las variables analizadas mediante el Sistema CASA AV® no presentaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo control. En cuanto al grupo experimental, si existieron diferencias estadísticamente significativas en las variables % motilidad progresiva y % gota distal.

Es importante evaluar la calidad de las dosis seminales por medio del módulo básico y el módulo de análisis avanzado del Sistema CASA AV®, así como también analizar los resultados de los algoritmos de trayectoria que normalmente no son parámetros considerados a evaluar para garantizar la calidad de las células espermáticas.

Los parámetros de calidad espermática evaluados por el Sistema CASA no presentaron cambios por el crecimiento bacteriano de las muestras analizadas, el crecimiento bacteriano fue inhibido por el diluyente utilizado en la preparación de las dosis seminales, así como tampoco existió proliferación bacteriana significativa por el aumento de temperatura debido al estrés térmico aplicado, además el porcentaje de crecimiento bacteriano observado se considera aceptable.

REFERENCIAS

- ✚ Althouse G. C. (2008). Sanitary procedures for the production of extended semen. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 43 Suppl 2, 374–378. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01187.x>
- ✚ Althouse, G. C., & Lu, K. G. (2005). Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*, 63(2), 573–584. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.031>
- ✚ Althouse, G. C., Kuster, C. E., Clark, S. G., & Weisiger, R. M. (2000). Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*, 53(5), 1167–1176. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00261-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00261-2)
- ✚ Amann, R. P., & Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 5–17.e173. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004>
- ✚ Barna T, Apić J, Milovanović A, et al. (2021). Quality and fertility of extended boar semen after prolonged transport. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2021. 45:920-929. <https://doi:10.3906/vet-2012-63>.
- ✚ Boe-Hansen, G. B., & Satake, N. (2019). An update on boar semen assessments by flow cytometry and CASA. *Theriogenology*, 137, 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.043>
- ✚ Bresciani, C., Cabassi, C. S, Morini, G., Taddei, S., Bettini, R., Bigliardi, E., Ianni, F. Di, Sabbioni, A., & Parmigiani, E. (2014). Boar Semen Bacterial Contamination in Italy and Antibiotic Efficacy in a Modified Extender. *Italian journal of animal science*, 13, doi: [10.4081/ijas.2014.3082](https://doi.org/10.4081/ijas.2014.3082)
- ✚ Brito, L., Althouse, G. C., Aurich, C., Chenoweth, P. J., Eilts, B. E., Love, C. C., Luvoni, G. C., Mitchell, J. R., Peter, A. T., Pugh, D. G., & Waberski, D. (2016). Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology*, 85(9), 1507–1527. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.002>

- ✚ Bussalleu, E., Yeste, M., Sepúlveda, L., Torner, E., Pinart, E., & Bonet, S. (2011). Effects of different concentrations of enterotoxigenic and verotoxigenic *E. coli* on boar sperm quality. *Animal reproduction science*, 127(3-4), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.07.018>
- ✚ E. Nitsche-Melkus, R. Bortfeldt, M. Jung, M. Schulze (2019). Impact of hygiene on bacterial contamination in extended boar semen: An eight-year retrospective study of 28 European AI centers. *Institute for Reproduction of Farm Animals Schönnow, Bernau, Germany*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.031>
- ✚ GACZARZEWICZ, D; UDALA, J; PIASECKA, M; BLASZCZYK, B; and STANKIEWICZ, T (2015). Storage temperature of boar semen and its relationship to changes in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidoreductive capability. *Turkish Journal of Biology: Vol. 39: No. 4, Article 9*. <https://doi.org/10.3906/biy-1412-76>
- ✚ González R, Peña F, Herickhoff L. (2023). Spermatozoa cooled to 5°C one day after collection from porcine commercial semen doses retain sperm functionality with reduced bacterial load. *Andrology*. 2023. 1-12. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1111/andr.13441>.
- ✚ Henning H, Nguyen QT, Wallner U and Waberski D (2022). Temperature limits for storage of extended boar semen from the perspective of the sperm's energy status. *Front. Vet. Sci*. 9:953021. doi: [10.3389/fvets.2022.953021](https://doi.org/10.3389/fvets.2022.953021)
- ✚ Knox R. V. (2016). Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*, 85(1), 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.009>
- ✚ Kuster, C. E., & Althouse, G. C. (2016). The impact of bacteriospermia on boar sperm storage and reproductive performance. *Theriogenology*, 85(1), 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.049>
- ✚ Li, Junwei, Wenming Zhao, Jiaqiao Zhu, Shuaibiao Wang, Huiming Ju, Shufang Chen, Athina Basioura, Graça Ferreira-Dias, and Zongping Liu.

- (2023). "Temperature Elevation during Semen Delivery Deteriorates Boar Sperm Quality by Promoting Apoptosis" *Animals* 13, no. 20: 3203. <https://doi.org/10.3390/ani13203203>
- ✚ Lopez Rodriguez, A., Van Soom, A., Arsenakis, I., & Maes, D. (2017). Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extended semen. *Porcine health management*, 3, 15. <https://doi.org/10.1186/s40813-017-0062-5>
 - ✚ Maroto Martín, L. O., Muñoz, E. C., De Cupere, F., Van Driessche, E., Echemendia-Blanco, D., Rodríguez, J. M., & Beeckmans, S. (2010). Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Animal reproduction science*, 120(1-4), 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.03.008>
 - ✚ Oehler, C., Janett, F., Schmitt, S., Malama, E., & Bollwein, H. (2019). Development of a flow cytometric assay to assess the bacterial count in boar semen. *Theriogenology*, 133, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.04.036>
 - ✚ Paschoal A. Luther A, Jakop U. (2021). Factors influencing the response of spermatozoa to agitation stress: Implications for transport of extended boar semen. *Theriogenology*. 2021. 175:54-60. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.08.033>.
 - ✚ Pinart, E., Domènech, E., Bussalleu, E., Yeste, M., & Bonet, S. (2017). A comparative study of the effects of *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* upon boar semen preserved in liquid storage. *Animal reproduction science*, 177, 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.12.007>
 - ✚ Prieto-Martínez, N., Bussalleu, E., Garcia-Bonavila, E., Bonet, S., & Yeste, M. (2014). Effects of *Enterobacter cloacae* on boar sperm quality during liquid storage at 17°C. *Animal reproduction science*, 148(1-2), 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.05.008>

- ✚ Riesenbeck A. (2011). Review on international trade with boar semen. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 46 Suppl 2, 1–3. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01869.x>
- ✚ Riesenbeck, A., Schulze, M., Rüdiger, K., Henning, H., & Waberski, D. (2015). Quality Control of Boar Sperm Processing: Implications from European AI Centres and Two Spermatology Reference Laboratories. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 50 Suppl 2, 1–4. <https://doi.org/10.1111/rda.12573>
- ✚ Schulze, M., Ammon, C., Rüdiger, K., Jung, M., & Grobbel, M. (2015). Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. *Theriogenology*, 83(3), 430–437. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.004>
- ✚ Schulze, M., Henning, H., Rüdiger, K., Wallner, U., & Waberski, D. (2013). Temperature management during semen processing: Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. *Theriogenology*, 80(9), 990–998. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.026>
- ✚ Sepúlveda, L., Bussalleu, E., Yeste, M., & Bonet, S. (2014). Effects of different concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* on boar sperm quality. *Animal reproduction science*, 150(3-4), 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.001>
- ✚ Ubeda, J. L., Ausejo, R., Dahmani, Y., Falceto, M. V., Usan, A., Malo, C., & Perez-Martinez, F. C. (2013). Adverse effects of members of the Enterobacteriaceae family on boar sperm quality. *Theriogenology*, 80(6), 565–570. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.05.022>
- ✚ Waberski, D., Riesenbeck, A., Schulze, M., Weitze, K. F., & Johnson, L. (2019). Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. *Theriogenology*, 137, 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.030>