



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Alternativas al uso de antibióticos en las dosis seminales
de conejo.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Sánchez Díaz, Tania

Tutor/a: Marco Jiménez, Francisco

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica
i del Medi Natural

Trabajo Final de Grado

Alternativas al uso de antibióticos en las dosis seminales de conejo

Grado en Biotecnología

Curso 2022/2023

Alumna: Tania Sánchez Díaz

Tutor académico: Francisco Marco-Jiménez

Valencia, Julio 2023

Título: Alternativas al uso de antibióticos en las dosis seminales de conejo.

Resumen TFG: El uso indiscriminado de antibióticos ha dado lugar a la aparición de bacterias multirresistentes, consideradas una de las principales amenazas para la salud pública por la OMS. En inseminación artificial (IA) en ganadería es obligatorio la adición de antibióticos a los diluyentes seminales para prevenir la propagación de enfermedades. La IA presenta numerosas ventajas, ya que el semen es mucho más fácil de transportar que los animales y un semental puede engendrar un número casi ilimitado de crías en muchas hembras que se encuentran a distancia. En más del 99 % de los casos se usa semen fresco y no congelado en IA. Sin embargo, el semen refrigerado requiere de la incorporación de agentes antimicrobianos para el control del crecimiento. Los gobiernos han manifestado que pronto el uso de antibióticos en este ámbito será prohibido. Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo determinar la capacidad antimicrobiana de varios aceites esenciales de origen vegetal: *Syzygium aromaticum* (carvacrol), *Origanum vulgare* (eugenol) y dos derivados de la paja del arroz (ácido felúrico y metil ferulato) y evaluar su efecto sobre la calidad seminal en dosis refrigeradas durante 48 horas en el modelo conejo. Para ello, se realizaron 2 experimentos: (i) adición de sustancias de origen vegetal con actividad antimicrobiana y (ii) evaluación de concentraciones decrecientes de carvacrol. En el primer experimento se determinó el efecto de 4 sustancias con actividad antibacteriana de origen vegetal sobre *E. coli* a una concentración de 10^4 UFC/mL: (i) ácido felúrico a concentraciones 0,2 mg/mL y 0,4 mg/mL, (ii) metil ferulato a concentraciones 0,2 mg/mL y 0,4 mg/mL, (iii) eugenol a concentración 0,25 mg/mL y (iv) carvacrol a concentración 0,25 mg/mL; y su influencia en la calidad seminal *in vitro*. En el experimento 2 se determinó el efecto de 3 concentraciones de carvacrol (0,125, 0,100 y 0,050 mg/mL) tanto sobre *E. coli* como sobre la calidad seminal *in vitro*. Los resultados demostraron que el eugenol, ácido felúrico y metil ferulato fueron ineficaces para controlar el crecimiento de *E. coli*, pero no afectaron la calidad seminal durante el período de refrigeración. En cambio, el carvacrol a una concentración de 0,250 mg/mL inhibió el crecimiento de *E. coli* durante 48 horas, pero afecta a la calidad seminal *in vitro*. Sin embargo, una concentración reducida de carvacrol (0,125 mg/mL) logró controlar el crecimiento bacteriano a las 24 horas sin afectar la viabilidad espermática. Aunque se observó una disminución en la movilidad y los parámetros cinéticos de los espermatozoides, concentraciones más bajas de carvacrol no tuvieron un efecto inhibitorio en el crecimiento de *E. coli*. En base a estos resultados es necesario llevar a cabo un nuevo estudio para determinar el efecto del carvacrol en condiciones de campo (*in vivo*) con la finalidad de evaluar su impacto biológico en términos de fertilidad y prolificidad para determinar su potencial de uso. El presente trabajo se relaciona con el tercer (salud y bienestar) y el décimo quinto (vida de ecosistemas terrestres) objetivos para el desarrollo sostenible (ODS).

Palabras clave: Antimicrobiano; Aceites esenciales; Espermiograma; Inseminación artificial; Orégano; Clavo; Ácido felúrico; Metil ferulato

Autora TFG: Dña. Tania Sánchez Díaz.

Localidad y fecha: Valencia, 3 julio 2023.

Tutor Académico: Prof. D. Francisco Marco Jiménez.

Title: Alternatives to the use of antibiotics in rabbit seminal doses.

Summary of bachelor's Thesis: The indiscriminate use of antibiotics has led to the emergence of multidrug-resistant bacteria, considered one of the major threats to public health by the WHO. In livestock artificial insemination (AI), the addition of antibiotics to semen extenders is mandatory to prevent the spread of diseases. AI offers numerous advantages, as semen is much easier to transport than animals, and a single male can father an almost unlimited number of offspring in many distant females. In over 99% of cases, fresh semen is used for AI rather than frozen semen. However, refrigerated semen requires the incorporation of antimicrobial agents for growth control. Governments have expressed that the use of antibiotics in this context will soon be prohibited. Therefore, this study aims to determine the antimicrobial capacity of various essential oils of plant origin: *Syzygium aromaticum* (carvacrol), *Origanum vulgare* (eugenol), and two derivatives from rice straw (ferulic acid and methyl ferulate) and evaluate their effect on the seminal quality of refrigerated doses for 48 hours using a rabbit model. Two experiments were conducted: (i) addition of plant-origin substances with antimicrobial activity, and (ii) evaluation of decreasing concentrations of carvacrol. In the first experiment, the effect of four plant-origin substances with antibacterial activity on *E. coli* at a concentration of 10^4 CFU/mL was determined: (i) ferulic acid at concentrations of 0.2 mg/mL and 0.4 mg/mL, (ii) methyl ferulate at concentrations of 0.2 mg/mL and 0.4 mg/mL, (iii) eugenol at a concentration of 0.25 mg/mL, and (iv) carvacrol at a concentration of 0.25 mg/mL; and their influence on seminal quality *in vitro*. In the second experiment, the effect of three concentrations of carvacrol (0.125, 0.100, and 0.050 mg/mL) on both *E. coli* and seminal quality *in vitro* was determined. The results demonstrated that eugenol, ferulic acid, and methyl ferulate were ineffective in controlling the growth of *E. coli* but did not affect seminal quality during the refrigeration period. On the other hand, carvacrol at a concentration of 0.250 mg/mL inhibited the growth of *E. coli* for 48 hours but affected seminal quality *in vitro*. However, a reduced concentration of carvacrol (0.125 mg/mL) was able to control bacterial growth at 24 hours without affecting sperm viability. Although a decrease in sperm motility and kinetic parameters was observed, lower concentrations of carvacrol did not have an inhibitory effect on the growth of *E. coli*. Based on these results, further studies are needed to determine the effect of carvacrol under field conditions (*in vivo*) to evaluate its biological impact in terms of fertility and prolificacy, thus determining its potential use. This study relates to the third (good health and well-being) and fifteenth (life on land) Sustainable Development Goals (SDGs).

Keywords: Antimicrobial; Essential oils; Semen analysis; Artificial insemination; Oregano; Clove; Ferulic acid; Methyl ferulate

Author of bachelor's Thesis: Tania Sánchez Díaz

Location and Date: Valencia, July 3, 2023

Academic Supervisor: Prof. Francisco Marco Jiménez

Títol: Alternatives a l'ús d'antibiòtics en les dosis seminals de conill.

Resum TFG: L'ús indiscriminat d'antibiòtics ha donat lloc a l'aparició de bacteris multiresistents, considerades una de les principals amenaces per a la salut pública per l'OMS. En inseminació artificial (IA) en ramaderia és obligatori l'addició d'antibiòtics als diluents seminals per a previndre la propagació de malalties. La IA presenta nombrosos avantatges, ja que el semen és molt més fàcil de transportar que els animals i un semental pot engendrar un número quasi il·limitat de cries en moltes femelles que es troben a distància. En més del 99% dels casos s'usa semen fresc i no congelat en IA. No obstant això, el semen refrigerat requereix de la incorporació d'agents antimicrobians per al control del creixement. Els governs han manifestat que prompte l'ús d'antibiòtics en aquest àmbit serà prohibit. Per tant, aquest estudi té com a objectiu determinar la capacitat antimicrobiana de diversos olis essencials d'origen vegetal: *Syzygium aromaticum* (carvacrol), *Origanum vulgare* (eugenol) i dos derivats de la palla de l'arròs (àcid felúric i metil ferulat) i avaluar el seu efecte sobre la qualitat seminal en dosis refrigerades durant 48 hores en el model conill. Per a això, es van realitzar 2 experiments: (i) addició de substàncies d'origen vegetal amb activitat antimicrobiana i (ii) avaluació de concentracions decreixents de carvacrol. En el primer experiment es va determinar l'efecte de 4 substàncies amb activitat antibacteriana d'origen vegetal sobre *E. coli* a una concentració de 10^4 UFC/ml: (i) àcid felúric a concentracions 0,2 mg/ml i 0,4 mg/ml, (ii) metil ferulat a concentracions 0,2 mg/ml i 0,4 mg/ml, (iii) eugenol a concentració 0,25 mg/ml i (iv) carvacrol a concentració 0,25 mg/ml; i la seua influència en la qualitat seminal *in vitro*. En l'experiment 2 es va determinar l'efecte de 3 concentracions de carvacrol (0,125, 0,100 i 0,050 mg/ml) tant com *E. coli* com la qualitat seminal *in vitro*. Els resultats van demostrar que el eugenol, àcid felúric i metil ferulat van ser ineficaços per a controlar el creixement d'*E. coli*, però no van afectar la qualitat seminal durant el període de refrigeració. En canvi, el carvacrol a una concentració de 0,250 mg/ml va inhibir el creixement d'*E. coli* durant 48 hores, però afecta a la qualitat seminal *in vitro*. No obstant això, una concentració reduïda de carvacrol (0,125 mg/ml) va aconseguir controlar el creixement bacterià a les 24 hores sense afectar la viabilitat espermàtica. Encara que es va observar una disminució en la mobilitat i els paràmetres cinètics dels espermatozoides, concentracions més baixes de carvacrol no van tindre un efecte inhibitori en el creixement d'*E. coli*. En base a aquests resultats és necessari dur a terme un nou estudi per a determinar l'efecte del carvacrol en condicions de camp (*in vivo*) amb la finalitat d'avaluar el seu impacte biològic en termes de fertilitat i prolificitat per a determinar el seu potencial d'ús. El present treball es relaciona amb el tercer (salut i benestar) i el quinzé (vida d'ecosistemes terrestres) objectius per al desenvolupament sostenible (ODS).

Paraules clau: Antimicrobià; Olis essencials; Espermiograma; Inseminació artificial; Oregana; Clau; Àcid felúric; Èster metílic

Autora TFG: Sra. Tania Sánchez Díaz.

Localitat i data: València, 3 juliol 2023.

Tutor Acadèmic: Prof. Sr. Francisco Marco Jiménez.

*En memoria de mis abuelos,
por su amor incondicional y adoración más absoluta,
siempre estarán en mi corazón.*

AGRADECIMIENTOS

Primero de todo, quiero expresar mi más sentido agradecimiento a mi tutor, Francisco Marco, por depositar plena confianza en mí y brindarme la maravillosa oportunidad de combinar lo que más me apasiona. Ha sido un verdadero privilegio aprender de alguien que domina la materia y que transmite con tanta seguridad todo aquello que sabe. Gracias por todo el tiempo dedicado a mi formación y por tu paciencia infinita al resolver mis interminables dudas y preguntas.

A Laura Lorenzo, por enseñarme mucha microbiología y por sus amables palabras en todo momento. Agradecerle también, todos los consejos tanto dentro del mundo académico como fuera de él, has sido toda una fuente de inspiración. A José Vicente, por estar siempre dispuesto a ayudarme y resolver todas las dudas que me surgían, incluso cuando no era su responsabilidad.

Agradecer a la Dras. Amparo Chiralt y María Vargas por sus recomendaciones en el uso del ácido felúrico y su derivado el metil ferulato, así como por la donación desinteresadas de los mismos para el desarrollo del presente estudio.

Me gustaría agradecer a mis chicas, Ana, Lucía, Marina y Marta, porque a pesar de los 300 km que nos han separado siempre os he sentido cerca. Gracias por acompañarme en esta etapa, por escucharme y consolarme siempre que lo he necesitado. En especial agradecer a Lucía, por empezar y acabar una etapa más juntas, por no dejarme nunca tirar la toalla y por tener siempre palabras de ánimo y un abrazo para mí. Sin duda, has convertido Valencia en hogar.

A todas las personas extraordinarias que me han acompañado en estos cuatro años de carrera, gracias por hacerme el día a día más ameno. A Adrián, Alberto, Alejandro B, Alejandro F, Ángela, Carla, Carlos, Carol, Claudia, Elisa, Gloria, Lucía, Manuel, Marc, Maria y Miriam, os habéis llevado un pedacito de mi corazón. Estoy enormemente agradecida a la vida de que nos hayamos cruzado en el camino.

A mi pareja, Alejandro, gracias por no haber dudado ni un instante de mí, por animarme a seguir, por escucharme en todo momento y por acompañarme de la mano en cada una de mis decisiones.

A mi tita Pili, por estar siempre pendiente de mí y cuidarme en todo momento. A mis hermanos, Mónica y Héctor, gracias por hacerme reír, por vuestro apoyo y cariño que han sido fundamentales en todo momento. En especial a Mónica, por ser mi mayor confidente. Eres todo un ejemplo para seguir. A mi abuela Vicenta, por animarme siempre a estudiar con su mítica frase “te quiero ver hincando los codos” y por acompañarme en todos mis logros.

En último lugar, a mis padres por todo lo que a una persona se le puede dar las gracias. Gracias por ofrecerme lo que hoy en día más aprecio: una educación. A pesar de no comprender de lo que va la carrera, han estado a mi lado en todo momento, animándome a perseguir mis sueños y ofreciéndome su amor a pesar de la distancia.

Gracias de corazón a todos vosotros por haberme acompañado en este camino de autodescubrimiento.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.....	2
1.2. CONSERVACIÓN SEMINAL.....	4
1.2.1. Diluyentes seminales	4
1.2.2. Uso de antibióticos en dosis seminales.....	5
1.2.3. Sustancias con actividad antibacteriana de origen vegetal: clavo, orégano y ácido felúrico.....	6
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1. ANIMALES.....	8
3.2. EXPERIMENTO 1: ADICIÓN DE SUSTANCIAS DE ORIGEN VEGETAL CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	9
3.2.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	9
3.2.1.1. Preparación del inóculo bacteriano	9
3.2.1.2. Preparación de las muestras.....	10
3.2.1.3. Cultivo y recuento microbiológico.....	11
3.2.2. Efecto sobre la calidad seminal.....	12
3.2.2.1. Obtención de eyaculados.....	12
3.2.2.2. Preparación muestras	13
3.2.2.3. Análisis espermático	13
3.2.2.3.1. Preparación muestras análisis espermático	13
3.2.2.3.2. Motilidad espermática	13
3.2.2.3.3. Viabilidad espermática	14
3.3. EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN DE CONCENTRACIONES DECRECIENTES DE CARVACROL	15
3.3.1. Evaluación actividad antimicrobiana.....	15
3.3.2. Efecto sobre la calidad seminal.....	15
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	16
4.1. EXPERIMENTO 1: ADICIÓN DE SUSTANCIAS DE ORIGEN VEGETAL CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	16
4.1.1. Actividad antimicrobiana	16
4.1.2. Motilidad y parámetros cinéticos	17
4.1.3. Viabilidad espermática	20

4.2. EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN DE CONCENTRACIONES DECRECIENTES DE CARVACROL	20
4.2.1. Actividad antimicrobiana	20
4.2.2. Motilidad y parámetros cinéticos	22
4.2.3. Viabilidad espermática	25
5. DISCUSIÓN	25
6. CONCLUSIONES.....	27
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
8. ANEXOS	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de los diferentes sustancias con actividad antibacteriana en un medio compuesto por tampón fosfato sódico (PBS*) empleadas en el experimento 1.	9
Tabla 2. Concentración de los diferentes sustancias con actividad antibacteriana en un medio compuesto por Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) empleadas en el experimento 1.	12
Tabla 3. Concentración de los diferentes sustancias con actividad antibacteriana en un medio compuesto por tampón fosfato sódico (PBS*) empleadas en el experimento 2.	15
Tabla 4. Relación del trabajo con los Objetivos del Desarrollo Sostenible (ODS) de la agenda 2030.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras químicas 2D de las distintas sustancias con actividad antimicrobiana de origen vegetal. (A) carvacrol, (B) eugenol, (C) ácido felúrico y (D) metil ferulato. Obtenido de: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/	8
Figura 2. Procedimiento experimental para la obtención de 10^4 UFC/mL de <i>E. coli</i> . Creado con BioRender.com	10
Figura 3. Protocolo de verificación de la concentración de la dilución origen y el recuento de colonias de <i>E. coli</i> en agar MacConkey. Creado con BioRender.com	10
Figura 4. Protocolo para la preparación de muestras y controles para el ensayo microbiológico. Creado con BioRender.com.....	11
Figura 5. Procedimiento experimental para el cultivo microbiológico de sustancias con actividad antibacteriana, control positivo y control negativo. Creado con BioRender.com	11
Figura 6. Procedimiento experimental para la recogida de muestras seminales y su posterior preparación para valoración seminal. Creado con BioRender.com	13
Figura 7. Protocolo de preparación de muestras para el análisis espermático. Creado con BioRender.com	13
Figura 8. Procedimiento experimental para el estudio de la motilidad espermática. Creado con BioRender.com	14
Figura 9. Detalle de viabilidad espermática. (A) Espermatozoides visualizados en contraste de fases a 400X. (B) Espermatozoides visualizados en fluorescencia a 400X, donde verde: SYBR-14 – viable; rojo: IP - no viable.....	14
Figura 10. Procedimiento experimental para el estudio de la viabilidad espermática. Creado con BioRender.com	15

Figura 11. Placas agar MacConkey incubadas con distintas sustancias con actividad antibacteriana mostrando crecimiento de *E. coli* después de 24 horas de incubación a 37°. Donde (A) grupo sin antibióticos, (B) grupo con antibióticos, (C) carvacrol a concentración 0,25 mg/mL, (D) ácido felúrico a concentración 0,2 mg/mL, (E) ácido felúrico a concentración 0,4 mg/mL, (F) eugenol a concentración 0,25 mg/mL, (G) metil ferulato a concentración 0,2 mg/mL, (H) metil ferulato a concentración 0,4 mg/mL e (I) control diluido.....16

Figura 12. Actividad antimicrobiana de diferentes sustancias con actividad antibacteriana frente a *E. coli* en un medio compuesto por solución salina tamponada (PBS*). Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. Los valores con superíndices distintos (a, b) son significativamente diferentes ($p < 0,0500$). *PBS (fosfato monopotásico 0,20 g/L, fosfato disódico 1,15 g/L, cloruro sódico 8 g/L, potasio cloruro 0,20 g/L).....17

Figura 13. Motilidad espermática del experimento 1 de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en un medio compuesto por Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48 horas). El análisis se llevó a cabo con 10 mezclas heterospérmicas. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. Los valores con superíndices distintos (a, b, c) son significativamente diferentes ($p < 0,0500$). *TCG (250 mM tris-hidroximetilaminometano, ácido cítrico 83 mM, 50 mM glucosa, pH 6,8-7,0).....18

Figura 14. Parámetros cinéticos del experimento 1 de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48 horas). VCL: velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$); VSL: velocidad en línea recta ($\mu\text{m/s}$); VAP: velocidad promedio de trayectoria ($\mu\text{m/s}$); LIN: coeficiente de linealidad (%); STR: coeficiente de rectitud (%); WOB: coeficiente de oscilación (%); ALH: amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (μm); BCF: frecuencia de cruzamiento del latido (Hz). Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. Los valores con superíndices distintos (a, b, c) son significativamente diferentes ($p < 0,0500$). *TCG (250 mM tris-hidroximetilaminometano, ácido cítrico 83 mM, 50 mM glucosa, pH 6,8-7,0).....19

Figura 15. Viabilidad espermática del experimento 1 de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en un medio compuesto por Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48 horas). El análisis se llevó a cabo con 10 mezclas heterospérmicas. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. Los valores con superíndices distintos (a, b) son significativamente diferentes ($p < 0,0500$). *TCG (250 mM tris-hidroximetilaminometano, ácido cítrico 83 mM, 50 mM glucosa, pH 6,8-7,0)...20

Figura 16. Placas agar MacConkey incubadas con distintas sustancias con actividad antibacteriana mostrando crecimiento de *E. coli* después de 24 horas (A) y 48 horas (B) de incubación a 37°. Donde (i) grupo sin antibióticos, (ii) grupo con antibióticos, (iii) carvacrol a concentración 0,1000 mg/mL, (iv) control diluido, (v) carvacrol a concentración 0,05000 mg/mL y (vi) carvacrol a concentración 0,125 mg/mL.21

Figura 17. Actividad antimicrobiana de diferentes sustancias con actividad antibacteriana frente a *E. coli* en un medio compuesto por solución salina tamponada (PBS*) en el experimento 2. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. Los valores con superíndices distintos (a, b, c) son significativamente diferentes ($p < 0,0500$). *PBS (fosfato monopotásico 0,20 g/L, fosfato disódico 1,15 g/L, cloruro sódico 8 g/L, potasio cloruro 0,20 g/L).....22

Figura 18. Motilidad espermática del experimento 2 de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en un medio compuesto por Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48 horas). El análisis se llevó a cabo con 10 mezclas heterospérmicas. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. Los

valores con superíndices distintos (a, b) son significativamente diferentes ($p < 0,0500$). *TCG (250 mM tris-hidroximetilaminometano, ácido cítrico 83 mM, 50 mM glucosa, pH 6,8-7,0)...23

Figura 19. Parámetros cinéticos del experimento 2 de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48 horas). VCL: velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$); VSL: velocidad en línea recta ($\mu\text{m/s}$); VAP: velocidad promedio de trayectoria ($\mu\text{m/s}$); LIN: coeficiente de linealidad (%); STR: coeficiente de rectitud (%); WOB: coeficiente de oscilación (%); ALH: amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (μm); BCF: frecuencia de cruzamiento del latido (Hz). Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. Los valores con superíndices distintos (a, b, c) son significativamente diferentes ($p < 0,0500$). *TCG (250 mM tris-hidroximetilaminometano, ácido cítrico 83 mM, 50 mM glucosa, pH 6,8-7,0).....24

Figura 20. Viabilidad espermática del experimento 2 de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en un medio compuesto por Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48 horas). El análisis se llevó a cabo con 10 mezclas heterospérmicas. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. Los valores con superíndices distintos (a, b) son significativamente diferentes ($p < 0,0500$). *TCG (250 mM tris-hidroximetilaminometano, ácido cítrico 83 mM, 50 mM glucosa, pH 6,8-7,0)...25

ABREVIATURAS

OMS: Organización mundial de la Salud

AI: inseminación artificial

TRA: técnicas de reproducción asistida

ATP: adenosín trifosfato

ROS: especies reactivas de oxígeno

GnRH: hormona liberadora de gonadotropina

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

PS: plasma seminal

TES: Tris-EDTA-SDS

EU: eugenol

DNA: ácido desoxirribonucleico

CA: carvacrol

O. vulgare: Origanum vulgare

FA: ácido felúrico

MF: metil ferulato

TGC: tris-cítrico-glucosa

E. coli: Escherichia coli

PBS: solución salina tamponada / Phosphate Buffered Saline

Vol/vol: volumen a volume

OD: densidad óptica

UFC: unidades formadoras de colonias

UFC/mL: unidades formadoras de colonias por mililitro

MK: agar MacConkey

TCG: tris cítrico glucosa

VCL: velocidad curvilínea

VSL: velocidad en línea recta

VAP: velocidad promedio de trayectoria

LIN: coeficiente de linealidad

STR: coeficiente de rectitud

WOB: coeficiente de oscilación

ALH: amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza

BCF: frecuencia de cruzamiento del latido

ISAS: Integrated Semen Analysis Software

IP: ioduro de propidio

ANOVA: análisis de la varianza

1. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son medicamentos que se usan para combatir infecciones causadas por bacterias tanto en seres humanos, como en animales, actúan mediante la muerte de las bacterias (acción bactericida) o bien dificultando su crecimiento y multiplicación (acción bacteriostática) (Nemeth *et al.*, 2015). A pesar de que son una herramienta elemental para el tratamiento y la prevención de diseminación de enfermedades, su uso desmesurado e indiscriminado ha dado lugar a la aparición y propagación de bacterias farmacorresistentes lo que supone un alto riesgo para la salud pública. Esto ha llevado a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a declarar esta emergencia como uno de los diez principales desafíos a los que se enfrenta la salud pública (World Health Organization: WHO, 2021).

En este sentido, la resistencia a los antibióticos se ha convertido en uno de los grandes retos del siglo XXI, lo que ha sumado a la escasez de antimicrobianos eficaces, siendo, una preocupación generalizada a lo largo de la comunidad científica. La comprensión de la base científica de la resistencia antimicrobiana es crucial para combatir esta amenaza. Dicha comprensión debe abarcar, por una parte, los mecanismos de resistencia, permitiendo así el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos y terapéuticos y, por otra, entender los factores que provocan dicha resistencia, lo cual es fundamental para el desarrollo de políticas de intervención adecuadas (Holmes *et al.*, 2016). Por lo tanto, ante esta situación resulta pertinente abordar la resistencia antimicrobiana teniendo en cuenta la complejidad y la naturaleza ecológica de fenómeno, a través de un enfoque coordinado y multisectorial, como es el caso de “*One Health*” (una salud). *One Health* se define como “el esfuerzo cooperativo de diversos profesionales del área de la salud, junto con otras áreas de conocimiento relacionadas, que intervienen a nivel local, nacional y global con la finalidad de lograr una salud óptima para los seres humanos, fauna, flora y, en general, el entorno” (McEwen & Collignon, 2018).

Las infecciones provocadas por patógenos farmacorresistentes como, por ejemplo, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* o *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, conllevan estancias hospitalarias mayores, lo que implica una mayor carga económica para los sistemas nacionales de salud y tasas incrementadas de morbilidad y mortalidad (Christaki *et al.*, 2020). Esto se ve aún más agravado debido a la escasez de investigación y desarrollo de antibióticos, lo que ha resultado en la aparición de infecciones prácticamente intratables. Es importante comprender la naturaleza de la resistencia antimicrobiana, que surge de la interacción de los organismos con su propio nicho ecológico. Después de todo, la resistencia es una respuesta adaptativa para la supervivencia bacteriana ante la presencia de antibióticos y, como consecuencia de la plasticidad genética que poseen las bacterias, estas adquieren mecanismos de resistencia intrínseca (Munita & Arias, 2016).

Mediante el mecanismo de selección darwiniana, los microorganismos están sujetos a fenómenos de presión de selección antimicrobiana, mejorando su aptitud biológica al adquirir y expresar genes de resistencia, los cuales pueden ser transferidos a otras poblaciones bacterianas. De esta manera, el uso excesivo y no adecuado de los antimicrobianos son factores importantes en el impulso del fenómeno de resistencia, ya que las bacterias se mueven en diferentes entornos, incluyendo humanos, animales y medio ambiente (McEwen & Collignon, 2018).

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos se clasifican según las rutas metabólicas implicadas en la resistencia, de esta manera: (i) modificación de la molécula antimicrobiana, (ii) evitar que el compuesto alcance el objetivo del antibiótico (reducción de la penetración o extrusión activa del compuesto), (iii) cambios y/o elusión del sitio diana y (iv) resistencia debida a procesos globales de adaptación celular (Munita & Arias, 2016).

La aparición de la resistencia a los antibióticos ha llevado a la restricción de algunas clases de antimicrobianos, reservándolas exclusivamente en el ámbito humano, como es el caso de la isoniazida para el tratamiento de la tuberculosis. Por otro lado, otros antimicrobianos están limitados únicamente al uso en veterinaria, como es el caso de los flavofosfolípidos o ionóforos, debido a su efecto tóxico en humanos. A pesar de esto, la mayoría de los antimicrobianos se usan indistintamente en seres humanos y animales (McEwen & Collignon, 2018).

Un ejemplo del uso exclusivo y no terapéutico de antibióticos en animales es su adición a diluyentes seminales. Dado que la recolección de eyaculados no es un proceso estéril, al trabajar con muestras seminales es imprescindible la adicción de agentes antimicrobianos con el fin de evitar una posible degradación de la muestra de semen y prevenir una posible aparición de contaminación bacteriana, pues las muestras pueden llegar a ser refrigeradas hasta tres días a temperaturas de 15-18°C en el caso de conejos. Dado que la eficacia de los antimicrobianos que se emplean de forma habitual en dosis seminales se ha visto cuestionada debido al auge de resistencia microbiana, es de gran relevancia el estudio de moléculas bioactivas naturales con propiedades antibacterianas y antioxidantes como alternativa al uso de antibióticos (Duracka *et al.*, 2019).

Un ejemplo del uso exclusivo y no terapéutico de antibióticos en animales es su incorporación a los medios diluyentes para la preparación de las dosis seminales. Actualmente, las dosis seminales son tratadas con antibióticos, el uso y adición de los cuales están regulados por la Directiva 90/429/EEC de la Comisión Europea y por la legislación estatal (RD 1148/1992; 106/2010 y 176/2012). El microbioma reproductivo es dinámico y exhibe variaciones en diferentes secciones del tracto reproductivo, así como diferencias entre especies. Además, el microbioma va variando a lo largo de la vida del organismo. En mamíferos la exposición al microbioma materno es un momento crucial, pues determina el microbioma de la descendencia (Contreras *et al.*, 2023). La presencia de bacterias en estas dosis seminales presenta diversos efectos perjudiciales que afectan no sólo a la calidad seminal, sino que también ejercen un efecto negativo sobre la hembra y sobre los parámetros reproductivos. Los componentes de los diluyentes y la temperatura a la cual son almacenadas las dosis refrigeradas favorecen el crecimiento bacteriano, de ahí que sea necesario el empleo de antibióticos. No obstante, el uso de los antibióticos es cada día más cuestionado debido al auge de resistencia microbiana, lo que implica la necesidad imperiosa de la búsqueda de moléculas bioactivas con propiedades antibacterianas como alternativa al uso de antibióticos (Duracka *et al.*, 2019).

1.1. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

En la década de 1920, la inseminación artificial (IA) se convirtió en la primera técnica de reproducción asistida (TRA) aplicada en ganado bovino. El desarrollo de la IA fue un hito científico, en especial en la industria ganadera ya que permitió el aumento de la tasa de mejora genética al utilizar sementales de alto valor genético. Hoy en día, a nivel internacional se

someten aproximadamente 130 millones de bovinos a IA (Moore & Hasler, 2017), por lo que se trata de una tecnología fundamental e indispensable en el área de la reproducción animal (Wiebke *et al.*, 2022).

La IA se puede realizar utilizando semen refrigerado o criopreservado. Cada uno requiere diferentes condiciones y, por ende, la composición del diluyente varía en función de la forma de conservación del semen utilizado (Viudes-de-Castro & Vicente, 2023b). Uno de los aspectos más importantes en IA es la preservación a largo plazo del eyaculado. La criopreservación depende de la tolerancia a los crioprotectores, lo cual varía de una especie a otra. Actualmente, la refrigeración del eyaculado es una tendencia a nivel global en la IA, pero son necesarias medidas específicas para prevenir el envejecimiento prematuro de los espermatozoides. Entre estas medidas se incluyen la reducción del metabolismo, el agotamiento del adenosín trifosfato (ATP) y el uso de inhibidores químicos que minimicen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Wiebke *et al.*, 2022). Los principios de la preservación seminal serán discutidos más adelante.

En el caso de conejos, el uso de IA es una práctica común en la Unión Europea, especialmente en la producción de carne de conejo (Viudes-de-Castro *et al.*, 2014). Esto se debe a que la IA desempeña un papel fundamental en la implementación de programas de crías eficientes, contribuyendo en la estabilidad de ciclos de producción estables y facilitando un control de manejo más sencillo (Sakr *et al.*, 2019). Además, la IA limita la necesidad de machos reproductores en la explotación ganadera. En comparación con la monta natural, mediante un solo eyaculado se puede llegar a inseminar hasta a 20 hembras en función de la dosis de inseminación requerida y la cantidad de eyaculado recuperada. Entre otros beneficios, la IA permite el control de la diversidad genética, la posibilidad de un rápido aumento de la población, la capacidad de lograr embarazos en hembras que no permiten la cópula y evitan la diseminación de enfermedades infecciosas (Morrell, 1995).

El conejo es una especie de ovulación inducida, lo que significa que la liberación de óvulos se produce como respuesta a la estimulación física durante la cópula. En el contexto de la IA en conejos, se requiere del uso de análogos a la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) con la finalidad de desencadenar la ovulación. Estos análogos pueden ser administrados de forma intramuscular, subcutánea, intravenosa o intravaginal (Viudes-de-Castro *et al.*, 2023a; Viudes-de-Castro & Vicente, 2023b). Aunque, la administración por vía intramuscular es el método más comúnmente empleado, se considera la vía intravaginal como una alternativa menos estresante, pues al no ser una vía invasiva garantiza de esta forma el bienestar animal.

Sin embargo, la absorción vaginal de análogos sintéticos de GnRH es significativamente menos eficiente que la administración por vía parental. Esto puede atribuirse a que el 50% de las proteínas identificadas del proteoma del plasma seminal (PS) del conejo poseen actividad catalítica, como la aminopeptidasa B. Por lo tanto, la absorción de los análogos a la GnRH a través de la mucosa vaginal se ve influenciada por la presencia de inhibidores de proteasas del PS, la composición del diluyente empleado, el estado de la mucosa vaginal y el análogo de GnRH utilizado (Viudes-de-Castro *et al.*, 2023a; Viudes-de-Castro & Vicente, 2023b). Es posible proteger a la hormona de la degradación enzimática mediante la suplementación del diluyente con bestatina (un inhibidor de la actividad aminopeptidasa) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) sin afectar la calidad seminal y el rendimiento reproductivo (Viudes-de-Castro & Vicente, 2023b). De acuerdo con lo expuesto, la dosis habitual administrada del análogo de GnRH utilizada en los diluyentes seminales es de 15 a 25 veces

mayor que la concentración en la inyección intramuscular, empleando acetato de buserelina y acetato de alarelina, respectivamente.

En la actualidad, se están investigando diversas estrategias que permiten la reducción de la concentración de los análogos de GnRH administrados. Entre estas se incluyen el uso de inhibidores de proteasas, agentes que mejoran la absorción, polímeros mucoadhesivos y sistemas de transporte de GnRH, como las nanopartículas. Con respecto a los sistemas de nanopartículas, el polímero más estudiado es el quitosano, que se usa como sistema de liberación de fármacos ya que es un polisacárido amino compatible, biodegradable y de baja toxicidad. Cuando la inducción de la ovulación mediante IA en conejos se produce por vía vaginal, la encapsulación del análogo a la GnRH podría proteger la hormona de la degradación enzimática, lo que facilitaría una mayor absorción en el organismo (Viudes-de-Castro *et al.*, 2023a).

1.2. CONSERVACIÓN SEMINAL

1.2.1. Diluyentes seminales

El éxito de la IA está estrechamente relacionado con la utilización de diluyentes seminales que preserven la viabilidad espermática. Es importante considerar que las dosis seminales pueden ser almacenadas a temperaturas que oscilan entre los 4°C y 18°C, en función de la especie (Suárez *et al.*, 2020). Así mismo, desde la recolección del eyaculado hasta su inseminación, pueden trascurrir hasta un máximo de 72 horas (Di Iorio *et al.*, 2014).

En mamíferos, el PS es una mezcla de secreciones fisiológicas de múltiples glándulas del tracto reproductivo del macho que contribuyen a la maduración de los espermatozoides mediante eventos hormonales, enzimáticos y la modificación de la superficie. Esta mezcla varía en función de la especie e incluso entre machos de la misma especie (Muiño-Blanco *et al.*, 2008). En carneros, la composición proteica del PS se relaciona con la capacidad de tolerancia a la refrigeración, existiendo variabilidad intraespecie. Se ha observado que ciertas proteínas, originadas a partir de los propios espermatozoides, muestran una correlación positiva con la preservación del PS. Estas proteínas podrían ser rastreadas como biomarcadores (Wiebke *et al.*, 2022).

En conejos, durante la conservación *in vitro* el PS contribuye en el mantenimiento de la motilidad y viabilidad de los espermatozoides. En base a esto, la composición del diluyente es de gran relevancia debido a que debe compensar la dilución de los constituyentes del PS y proporcionar las condiciones necesarias para preservar la capacidad fertilizante del semen.

Existen diversas casas comerciales que suministran diluyentes seminales para el uso de IA en conejos, aunque su composición es desconocida. A pesar de esto, los componentes básicos de un diluyente son: un amortiguador orgánico como Tris, TES (Tris-EDTA-SDS) o citrato de sodio, para mantener el pH entre 6,8-7,2; una fuente de nutricional que mantenga el metabolismo del espermatozoide, normalmente se suelen usar glucosa o fructosa; solutos para el ajuste del pH y presión osmótica en valores de 300 mOsm/kg; y agentes antimicrobianos para prevenir el crecimiento bacteriano (Roca *et al.*, 2000; Viudes-de-Castro & Vicente, 2023).

1.2.2. Uso de antibióticos en dosis seminales

La IA es una TRA que se utiliza ampliamente en la cría de animales a nivel mundial debido a su alta eficiencia (Viudes-De-castro *et al.*, 2021). Una de las ventajas que presenta es que permite la reducción de la diseminación de enfermedades infecciosas al evitar el contacto o transporte de animales con fines reproductivos. Contradictoriamente, los patógenos pueden ser propagados mediante esta técnica, es decir, una muestra seminal contaminada puede ser una fuente potencial de transmisión de enfermedades a hembras susceptibles (Morrell & Wallgren, 2014). Hasta la fecha se ha considerado que, a pesar de extremar las condiciones higiénicas durante la recolección del eyaculado, este proceso no lograba evitar la presencia de microorganismos atribuidos a la flora normal de la piel y al tracto reproductor del macho, lo que requiere obligatoriamente la adición de agentes antimicrobianos en los diluyentes seminales para prevenir posibles contaminaciones bacterianas (Duracka *et al.*, 2019; Morrell & Wallgren, 2014).

Un estudio reciente ha demostrado que presencia de bacterias en el semen, también conocida como bacteriospermia, afecta negativamente a la calidad del esperma al competir las bacterias con los espermatozoides por los nutrientes aportados en los diluyentes seminales (Duracka *et al.*, 2019). Además, se ha comprobado en varios estudios que el PS de diversas especies contiene aminopeptidasas, cuya actividad se relaciona con la estimulación de la proliferación de muchas bacterias al actuar como factores de virulencia y sustento de microorganismos. A pesar de que la mayoría de las bacterias presentes en el semen no son patógenas, si se presentan en grandes cantidades pueden afectar negativamente a calidad espermática (Viudes-De-castro *et al.*, 2021) mediante la producción de endotoxinas y subproductos metabólicos tóxicos, comprometiendo de esta forma a la viabilidad y la motilidad espermática (Duracka *et al.*, 2019; Morrell & Wallgren, 2014). Así pues, es bien conocido el efecto negativo de las bacterias sobre la fisiología, la viabilidad, la movilidad y la fertilidad de los espermatozoides (Reichart *et al.*, 2000; Hosseinzadeh, 2001; Baud *et al.*, 2019). Sin embargo, la presencia de bacterias en el semen también se encuentra en individuos fértiles con parámetros espermáticos normales (Cottell *et al.*, 2000; Rodin *et al.*, 2003). Basándose en estos hallazgos, investigaciones recientes han postulado que la presencia de un medio bacteriano específico podría ser necesaria para el funcionamiento normal de los espermatozoides (Hou *et al.*, 2013; Weng *et al.*, 2014; Altmäe *et al.*, 2019). En este sentido, varios autores han planteado la hipótesis de que un estado simbiótico y disbiótico de la microbiota espermática podría estar relacionado con la calidad del esperma (Baud *et al.*, 2019; Gòdia *et al.*, 2020).

Aparte de los efectos directos que pueden tener las bacterias sobre los espermatozoides hay que tener en cuenta que los microorganismos pueden causar infertilidad en el macho a través de diversos mecanismos. Estos incluyen la aglutinación de espermatozoides, la inmovilización de los espermatozoides mediante una unión directa o mediante la producción de factores inmovilizadores, interacciones entre los microorganismos con el sistema inmunológico del macho y la inducción de inflamación crónica, defectos en la función espermática y disminución de los espermatozoides con morfología normal como consecuencia de que los metabolitos producidos por los microorganismos afectan a la estructura e integridad de los espermatozoides (Nabi *et al.*, 2022).

No debe pasarse por alto que al hacer IA con dosis seminales contaminadas y de baja calidad se produce un impacto negativo en la salud y la fertilidad de hembras receptoras, pues se

puede producir una inflamación sistémica y enfermedades en las hembras que podrían resultar en un menor tamaño de la camada (Rouillon *et al.*, 2022).

En base a todo lo mencionado, para limitar la posible contaminación durante el procesamiento del semen resulta obligatorio la adición de agentes antimicrobianos en dosis seminales, pero la adición de estos y la dosificación empleada en los diluyentes es limitada y está regulada por directivas gubernamentales y regionales. En un esfuerzo para reducir la toxicidad espermática se tiende a la administración de combinaciones de antibacterianos de amplio espectro y alta potencia, en concentraciones más bajas de lo que se requeriría individualmente. No obstante, a pesar de trabajar con cantidades bajas de antimicrobianos puede tener lugar la aparición de resistencia microbiana (Morrell & Wallgren, 2014).

1.2.3. Sustancias con actividad antibacteriana de origen vegetal: clavo, orégano y ácido felúrico

Si bien es cierto que los agentes antimicrobianos son comúnmente empleados como primera opción ante la presencia de especies bacterianas o, incluso como uso no terapéutico como en el caso de su uso en diluyentes seminales, es por esto por lo que resulta necesario explorar alternativas a estas moléculas. El uso de estas alternativas podría retrasar el desarrollo de resistencia antimicrobiana, evitando el efecto tóxico que presentan los agentes antimicrobianos sobre los espermatozoides (Duracka *et al.*, 2019). Además, hallar alternativas a los antibióticos con el fin de controlar el crecimiento bacteriano de las dosis seminales utilizadas en IA sería ventajoso para mejorar la calidad y viabilidad de los espermatozoides (Morrell & Wallgren, 2014).

Actualmente, la mayoría de los antibióticos se obtienen de fuentes microbianas. No obstante, como mecanismo evolutivo las plantas han desarrollado diversas estrategias químicas para protegerse de los ataques de los microorganismos, entre ellas la capacidad de producir compuestos bactericidas (Borges *et al.*, 2013). En la literatura se ha discutido ampliamente la actividad antimicrobiana de los productos de origen vegetal, como los compuestos fenólicos y los aceites esenciales (Efenberger-Szmechtyk *et al.*, 2021).

Por su parte, las especias han sido tradicionalmente empleadas tanto como aditivos alimentarios, como en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades infecciosas debido a sus propiedades antimicrobianas contra hongos y bacterias patogénicas. Además, se ha demostrado que los metabolitos producidos por especias como el clavo, orégano, tomillo, canela, romero y comino son agentes antimicrobianos con insignificantes efectos adversos (Liu *et al.*, 2017). De los productos de origen vegetal se obtienen los aceites esenciales que son complejas combinaciones de compuestos volátiles y semivolátiles que desempeñan un papel importante como mecanismos de defensa contra infecciones causadas por bacterias, virus y hongos (Kachur & Suntres, 2020).

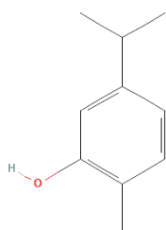
El aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*) presenta una concentración rica en fenoles de aproximadamente el 84-95%. Entre sus componentes principales se encuentran el eugenol (EU, C₁₀H₁₂O₂) (Figura 1b), el acetato de eugenilo y el beta-cariofileno, entre otros. El EU se caracteriza por sus propiedades antioxidantes, mientras que el beta-cariofileno estimula la función del sistema inmunológico y reduce la inflamación. El aceite de clavo muestra diversas actividades biológicas como propiedades antimicrobianas, antifúngicas, insecticidas y antioxidantes (Anandhi *et al.*, 2022). El clavo al penetrar en las membranas celulares de los microorganismos inhibe la síntesis normal de DNA y proteínas, de esta forma se interrumpe

también el metabolismo bacteriano (Mazurova *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017). Por su lado el EU, componente principal del clavo, puede inhibir la producción de amilasa y proteasas en *Bacillus cereus*, además de poseer la capacidad de deteriorar la pared celular, lo que conduce a la lisis celular (Liu *et al.*, 2017). Según un estudio, se observó que el aceite esencial de clavo presenta una mayor actividad antimicrobiana contra bacterias grampositivas en comparación con bacterias gramnegativas (Oyieng Angienda *et al.*, 2010). En la bibliografía se ha discutido el efecto del EU en la calidad espermática en el semen de verraco (Mazurova *et al.*, 2015).

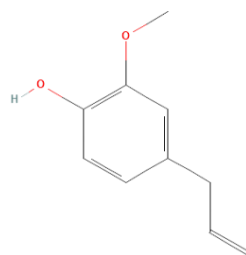
Los componentes principales del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) son los fenoles isómeros carvacrol (CA, C₁₀H₁₄O) (Figura 1a) y timol, así como otros precursores monoterpenos en proporciones más bajas como son el γ -terpineno y p-cimeno. El orégano destaca por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antidiabéticas, antiproliferativas y antimicrobianas (Leyva-López *et al.*, 2017). Diversos estudios han atribuido la actividad antimicrobiana de la especie *O. vulgare* a su componente activo, el CA (Santoyo *et al.*, 2006). Sin embargo, los mecanismos de acción en algunas bacterias aún no se comprenden en su totalidad. Se piensa que el CA podría interactuar con las membranas celulares, alterando su permeabilidad a cationes pequeños (Liu *et al.*, 2017) y como resultado se produce un aumento de la permeabilidad al ATP y liberación de componentes celulares (Kachur & Suntres, 2020). Además, debido a la naturaleza compleja del compuesto, se cree que el CA podría inhibir los microorganismos a través de diferentes dianas moleculares (Liu *et al.*, 2017). Por ejemplo, se ha observado que el CA puede inhibir la actividad ATPasa en *E. coli*, así como funcionar como un intercambiador de protones. Esta alteración en el gradiente de pH eventualmente provocará el colapso de la fuerza motriz de protones y el agotamiento de la reserva de ATP implicando la muerte celular (Kachur & Suntres, 2020). En la bibliografía se ha discutido el efecto del CA en la calidad espermática en el semen de verraco (Frydrychová S *et al.*, 2012; Mazurova *et al.*, 2015; Restrepo *et al.*, 2023).

Los productos fenólicos son metabolitos secundarios producidos por las plantas que se encuentran en numerosos productos dietéticos, como verduras, frutas, chocolate y bebidas (Borges *et al.*, 2013). Un ejemplo de ello es el ácido felúrico (FA, C₁₀H₁₀O₄) (Figura 1c) presente en la paja del arroz (Wei *et al.*, 2022) es un ácido fenólico que tiene diversas actividades biológicas que reducen el riesgo a enfermedades como la diabetes, colesterol, enfermedades cardíacas y el cáncer, además de poseer excelentes propiedades antioxidantes y antibacterianas (Song *et al.*, 2023). El metil ferulato (MF, C₁₁H₁₂O₄) (Figura 1d) es un derivado del ácido felúrico, que presenta baja toxicidad y que se usa en productos para el cuidado de la piel, cosméticos, productos de salud, aditivos alimentarios y como sustancia con actividad antimicrobiana (Li *et al.*, 2021). Entre los mecanismos de acción de los productos fenólicos se encuentran la desestabilización y aumento de la permeabilidad de la membrana citoplasmática, la inhibición enzimática por reacciones de oxidación que implican la interacción con grupos sulfhidrilo o formación de quinonas reactivas. Así mismo, la síntesis de ácidos nucleicos de bacterias gramnegativas y grampositivas podría ser inhibida por los fenoles (Borges *et al.*, 2013).

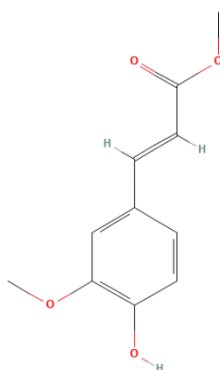
A. Carvacrol



B. Eugenol



C. Ácido felúrico



D. Metil ferulato

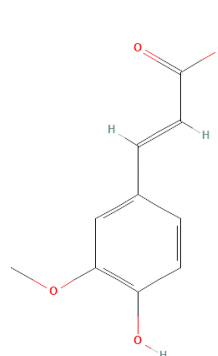


Figura 1. Estructuras químicas 2D de las distintas sustancias con actividad antimicrobiana de origen vegetal. (A) carvacrol, (B) eugenol, (C) ácido felúrico y (D) metil ferulato. Obtenido de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

2. OBJETIVOS

El presente estudio tiene como objetivo determinar la capacidad antimicrobiana de varios aceites esenciales de origen vegetal: *Syzygium aromaticum* (carvacrol), *Origanum vulgare* (eugenol) y dos derivados de la paja del arroz (ácido felúrico y metil ferulato) y evaluar su efecto sobre la calidad seminal en el modelo conejo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES

Este estudio fue realizado en las instalaciones de la Universidad Politécnica de Valencia (ES462500001091) bajo el soporte del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. La obtención de las muestras seminales de conejo se llevó a cabo bajo prácticas zootécnicas, por lo que no se requiere de la aprobación por parte de un comité de ética. Todo el estudio se realizó siguiendo los protocolos específicos que garantizan el bienestar animal.

Las muestras seminales fueron obtenidas de un total de 20 sementales de origen neozelandés en edad adulta fértil (1-2 años). Todos los animales se encontraban alojados en compartimentos individuales, sujetos a un ciclo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad con acceso libre a la comida y al agua. La alimentación que se administró fue un pienso comercial (Nanta, Nutreco S.A).

3.2. EXPERIMENTO 1: ADICIÓN DE SUSTANCIAS DE ORIGEN VEGETAL CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

3.2.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Para llevar a cabo este experimento se empleó la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) la cual fue expuesta a cinco sustancias con actividad antibacteriana: (i) ácido felúrico a concentraciones 0,2 mg/mL y 0,4 mg/mL, (ii) metil ferulato a concentraciones 0,2 mg/mL y 0,4 mg/mL, (iv) eugenol a concentración 0,25 mg/mL y (vi) carvacrol a concentración 0,25 mg/mL. Además, como control se empleó la combinación convencional de antibióticos (100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomicina) y el medio diluyente sin antibióticos (Tabla 1). Todas estas concentraciones fueron elegidas en base a estudios previos con espermatozoides.

Tabla 1. Concentración de los diferentes sustancias con actividad antibacteriana en un medio compuesto por tampón fosfato sódico (PBS*) empleadas en el experimento 1.

Grupo	Concentración (mg/mL)
Carvacrol	0,250
Eugenol	0,250
Ácido felúrico	0,200
	0,400
Metil ferulato	0,200
	0,400
Antibiótico	100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomicina
	0

*PBS (fosfato monopotásico 0,20 g/L, fosfato disódico 1,15 g/L, cloruro sódico 8 g/L, potasio cloruro 0,20 g/L).

3.2.1.1. Preparación del inóculo bacteriano

La cepa de *E. coli* empleada fue obtenida del ciego de conejo de 61 días de edad, conservada a -80 °C hasta su empleo. Para su uso la cepa fue descongelada y revivida en Agar Nutritivo (Scharlau, Barcelona, España), tras su incubación a 37 °C durante 24 horas.

Para la obtención del inóculo se realizó una suspensión bacteriana en solución salina tamponada (PBS por sus siglas en inglés *Phosphate Buffered Saline*, Scharlau, Barcelona, España) con una densidad óptica (OD) de 0,2 (~10⁸ UFC/mL) a 600 nm con el espectrofotómetro (Eppendorf BioPhotometer, Thermofisher Scientific, Madrid, España). Se realizaron diluciones seriadas (1:10 vol/vol) hasta la obtención de la concentración 10⁴ UFC/mL (Figura 2). La concentración final bacteriana empleada en todas las sustancias con actividad antimicrobiana fue de 10³ UFC/mL, concentración que fue elegida en base a estudios previos que muestran que se trata de la concentración de contaminación en muestras seminales (Moreira *et al.*, 2013; Goldberg *et al.*, 2017).

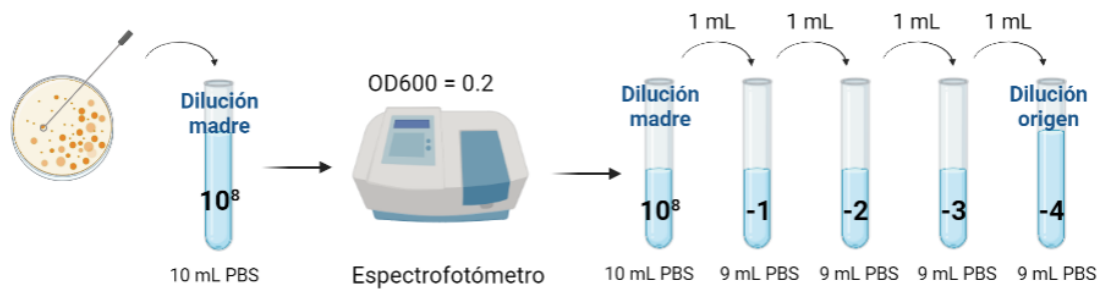


Figura 2. Procedimiento experimental para la obtención de 10^4 UFC/mL de *E. coli*. Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

La comprobación de la concentración bacteriana (10^4 UFC/mL) se llevó a cabo mediante la realización de diluciones seriadas (1:10 vol/vol) tal y como se muestra en la Figura 3. Posteriormente, se sembraron 100 uL de cada dilución en agar MacConkey (MK, Scharlau Microbiology) asegurando su distribución uniformemente mediante un asa de Digralsky. Las muestras fueron sometidas a una incubación a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se realizaron los recuentos de colonias, llevando a cabo únicamente el recuento en aquellas placas en las que el número de bacterias estaba entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (UFC). El cálculo de la concentración de las UFC se llevó a cabo siguiendo la siguiente ecuación (Ecuación 1):

$$\text{Concentración UFC} = n^{\circ} \text{ colonias} \cdot \text{factor dilución} \cdot 10 \quad \text{Ecuación 1}$$

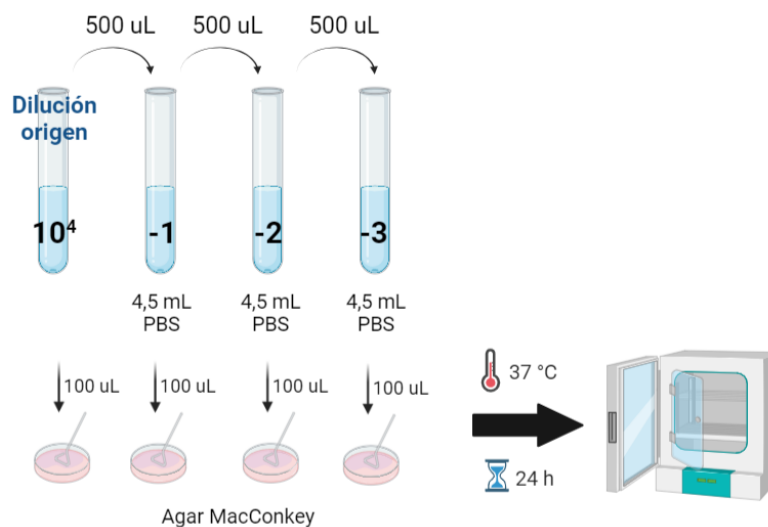


Figura 3. Protocolo de verificación de la concentración de la dilución origen y el recuento de colonias de *E. coli* en agar MacConkey. Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

3.2.1.2. Preparación de las muestras

El estudio de la capacidad antimicrobiana de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana (Tabla 1) se realizó realizando una dilución 1:5 siguiendo la forma de preparación de las dosis seminales (Figura 4).

Así mismo, también se contó con un control positivo con antibióticos y con un control negativo sin la presencia de la bacteria. Una vez preparadas todas las muestras se procedió a su refrigeración a 17°C (Dometic Osaka OK51) durante 48 horas (Figura 4).

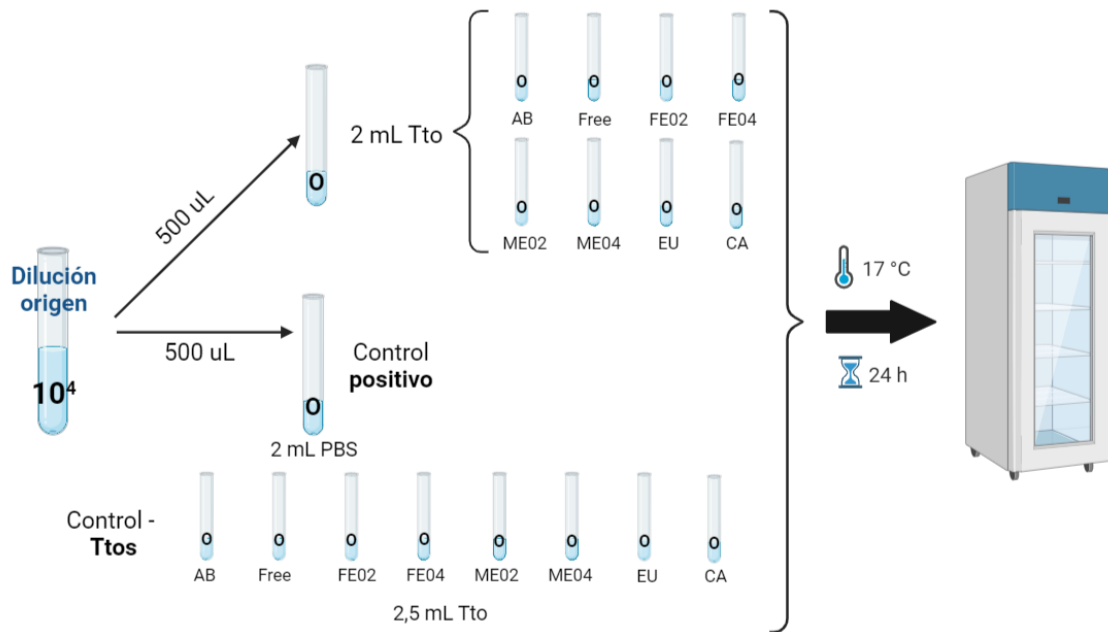


Figura 4. Protocolo para la preparación de muestras y controles para el ensayo microbiológico. Creado con BioRender.com

3.2.1.3. Cultivo y recuento microbiológico

El recuento bacteriano se llevó a cabo a las 24 y 48 horas de refrigeración. Para ello, se realizó una dilución 1:10 vol/vol, sembrando 100 uL de cada una de las muestras y de sus diluciones en Agar MK. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 24 horas, tal y como se ha descrito previamente (Figura 5). Tras el periodo de incubación, se procedió al recuento de las colonias visibles. Los resultados fueron expresados como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

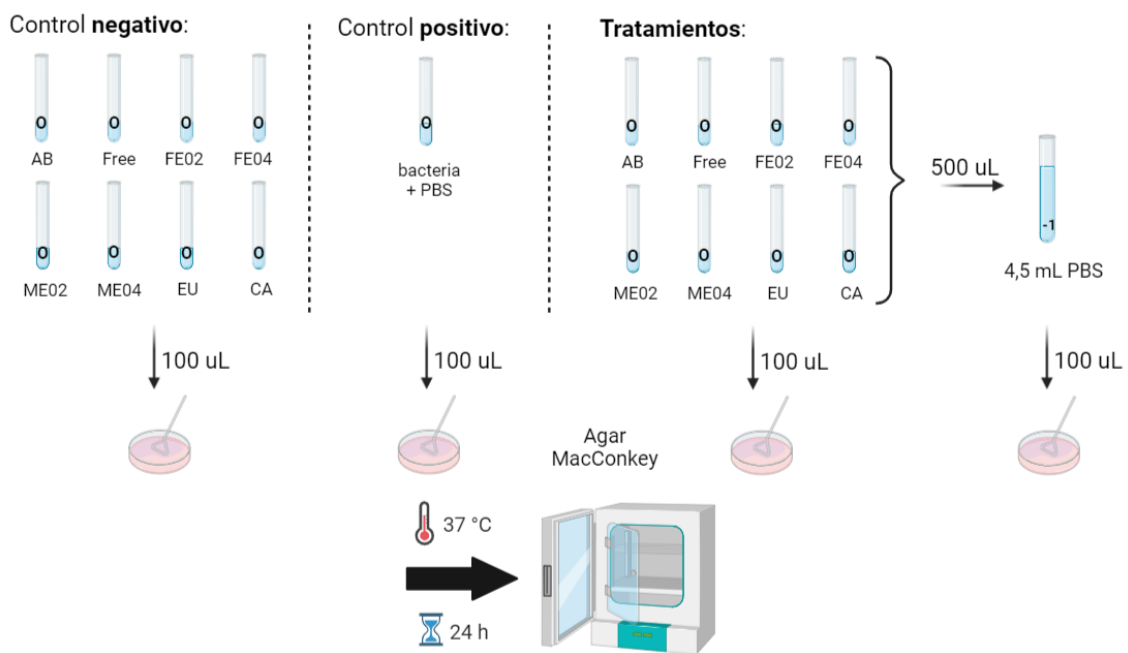


Figura 5. Procedimiento experimental para el cultivo microbiológico de sustancias con actividad antibacteriana, control positivo y control negativo. Creado con BioRender.com

3.2.2. Efecto sobre la calidad seminal

En esta prueba se evaluó el efecto de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana sobre la calidad seminal *in vitro*. Concretamente, esta determinación se basó en el análisis de la motilidad (incluyendo la cinética del movimiento) y viabilidad espermática, siendo estos parámetros importantes en la fertilidad del macho. En este estudio se emplearon un total de 10 grupos diferentes (Tabla 2), utilizando como solvente tris-cítrico-glucosa o TCG (250 mM tris-hidroximetilaminometano, ácido cítrico 83 mM, 50 mM glucosa, (Viudes-De-Castro & Vicente, 1997)). Para descartar el efecto del uso de dimetilsulfóxido (DMSO) se incluyeron 2 grupos control adicionales.

Tabla 2. Concentración de los diferentes sustancias con actividad antibacteriana en un medio compuesto por Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) empleadas en el experimento 1.

Grupo	Concentración (mg/mL)
Carvacrol	0,250
Eugenol	0,250
Ácido felúrico	0,200
	0,400
Metil ferulato	0,200
	0,400
Antibiótico	100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomicina
	0
Controles	100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomicina + 1% DMSO
	1% DMSO

*TCG (250 mM tris-hidroximetilaminometano, ácido cítrico 83 mM, 50 mM glucosa, pH 6,8-7,0).

3.2.2.1. Obtención de eyaculados

El método empleado para la recogida de muestras seminales fue la vagina artificial. Los machos comenzaron a ser entrenados para el uso de la vagina artificial a los cinco meses de edad, coincidiendo con el inicio de la actividad sexual. Una vez obtenido el eyaculado, las muestras fueron observadas descartando aquellas con presencia de orina (color amarillento) o en las que se hubiese producido ruptura de la vagina artificial (incremento en la osmolaridad del agua). Además, en aquellas muestras en las que se observase la presencia de tapón de gel este fue retirado. Tras este proceso, los eyaculados fueron mezclados (mezcla heterospérmica) evitando de esta forma el factor individual.

3.2.2.2. Preparación muestras

Las dosis seminales fueron preparadas mediante una dilución en una proporción 1:5 (vol/vol) con las diferentes sustancias con actividad antimicrobiana. Para la valoración inmediata se obtuvo una alícuota. Las muestras fueron sometidas a su refrigeración a 17° (Dometic Osaka OK51) para su posterior valoración a las 24 y 48 horas (Figura 6).

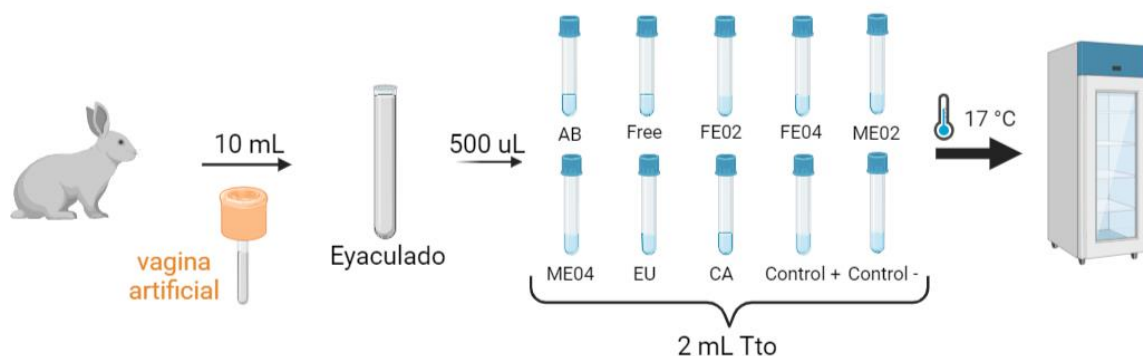


Figura 6. Procedimiento experimental para la recogida de muestras seminales y su posterior preparación para valoración seminal. Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

3.2.2.3. Análisis espermático

3.2.2.3.1. Preparación muestras análisis espermático

Para la valoración de la calidad espermática, las muestras fueron diluidas 1:4 vol/vol con el diluyente previamente atemperado a 37°C, obteniendo una dilución final del eyaculado de 1:20 vol/vol (Figura 7).

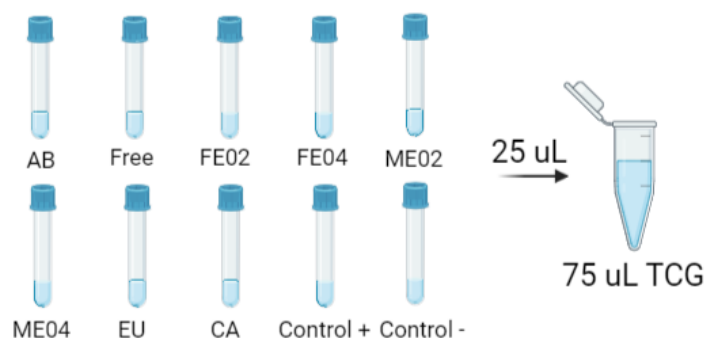


Figura 7. Protocolo de preparación de muestras para el análisis espermático. Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

3.2.2.3.2. Motilidad espermática

La motilidad espermática, referida a la capacidad de los espermatozoides para moverse activamente (Mortimer, 1997), fue evaluada a 37° en microscopía de contraste de fases (Nikon eclipse E200) a 100X utilizando un programa de análisis de imagen (ISAS versión 1.0.17, Integrated Semen Analysis Software). Para ello, se siguió el protocolo descrito en la Figura 8. Para cada muestra se evaluó un mínimo de 400 espermatozoides, estudiando los siguientes parámetros de actividad espermática: motilidad espermática (%), velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidad en línea recta (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidad promedio de trayectoria (VAP, $\mu\text{m/s}$), coeficiente de linealidad (LIN; calculado como $(\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$; %), coeficiente de rectitud

(STR, %), coeficiente de oscilación (WOB; VSL/VAP x 100; %), amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm) y frecuencia de cruzamiento del latido (BCF, Hz) (Marco-Jiménez *et al.*, 2020).

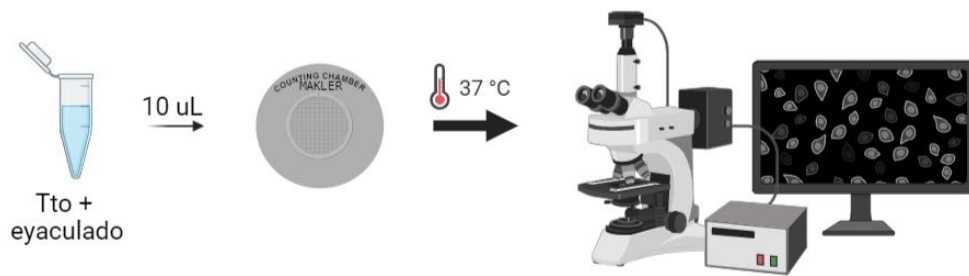


Figura 8. Procedimiento experimental para el estudio de la motilidad espermática. Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

3.2.2.3.3. Viabilidad espermática

La viabilidad espermática se determinó mediante la valoración de la integridad de la membrana de la cabeza de los espermatozoides, clasificándolos como espermatozoides vivos y muertos (Agarwal *et al.*, 2022). Para ello, se empleó el kit comercial LIVE/DEAD® Sperm Viability (L-7011, Invitrogen). Este kit consiste en la combinación de dos tinciones fluorescentes con afinidad de unión al ácido desoxirribonucleico (DNA), una tinción permeable a todas las membranas denominada SYBR-14 (solución 2,4mM en agua) que emite color verde (Figura 9b) y una tinción permeable solo a las membranas celulares no funcionales, yoduro de propidio (IP, solución 1mM en DMSO) que emite color naranja/rojo (Figura 9a) (Marco-Jiménez *et al.*, 2020).

Para llevar a cabo este proceso, se realizó una co-incubación de los fluoróforos en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de la incubación, se agregó glutaraldehído (0,5%) como fijador químico. Seguidamente, se procedió a contabilizar un mínimo de 100 espermatozoides en un microscopio de fluorescencia (ZEISS AxioScope 5) a 400X de aumento (Figura 10). Para concluir, la viabilidad espermática se determinó mediante la ecuación 2, donde se calcula como el cociente del número de espermatozoides viables entre el número total de espermatozoides contabilizados y se multiplicó el resultado por 100 (Ecuación 2). Esto, permitió obtener el porcentaje de espermatozoides en relación con el total de espermatozoides evaluados.

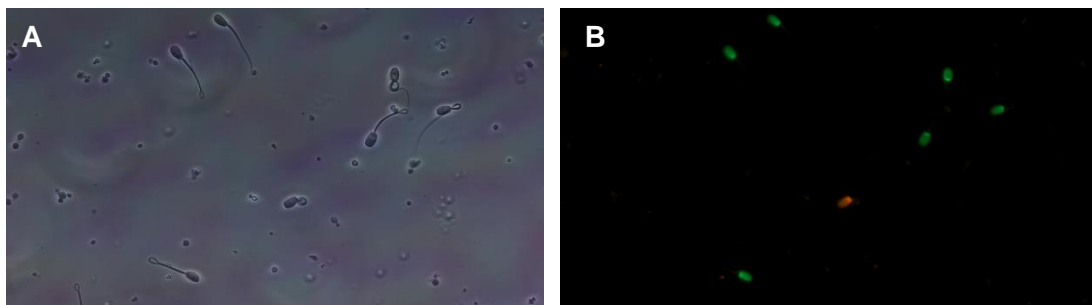


Figura 9. Detalle de viabilidad espermática. (A) Espermatozoides visualizados en contraste de fases a 400X. (B) Espermatozoides visualizados en fluorescencia a 400X, donde verde: SYBR-14 – viable; rojo: IP - no viable.

$$Viabilidad = \frac{viables}{viables+no\ viables} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2}$$



Figura 10. Procedimiento experimental para el estudio de la viabilidad espermática. Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

3.3. EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN DE CONCENTRACIONES DECRECIENTES DE CARVACROL

3.3.1. Evaluación actividad antimicrobiana

Este estudio se basó nuevamente en la valoración de la capacidad antimicrobiana de 3 concentraciones decrecientes de CA frente a *E. coli*. Las concentraciones empleadas fueron; (i) 0,125 mg/mL, (ii) 0,100 mg/mL y (iii) 0,050 mg/mL. Así mismo, a modo control se empleó la combinación de antibióticos convencionales (100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomicina) y diluyente sin antibióticos (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración de los diferentes sustancias con actividad antibacteriana en un medio compuesto por tampón fosfato sódico (PBS*) empleadas en el experimento 2.

Grupo	Concentración (mg/mL)
Carvacrol	0,125
	0,100
	0,050
Antibiótico	100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomicina
	0

*PBS (fosfato monopotásico 0,20 g/L, fosfato disódico 1,15 g/L, cloruro sódico 8 g/L, potasio cloruro 0,20 g/L).

La metodología, así como el procedimiento experimental que se siguió fue similar al descrito en las secciones 3.2.1.1. a 3.2.1.4.

3.3.2. Efecto sobre la calidad seminal

Nuevamente se procedió al estudio del efecto de las diferentes concentraciones de CA sobre la calidad seminal siguiendo la metodología anteriormente descrita en el apartado 3.2.2. empleando las concentraciones descritas en la Tabla 3 en un medio compuesto por TCG.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos relativos al recuento de colonias y a los rasgos espermáticos se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con la sustancia con capacidad antimicrobiana como factor. El número de colonias fueron expresadas como log 10 de unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra. Los datos se expresaron en medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de las medias. El nivel de significación se fijó en $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete informático SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE.UU., 2002).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTO 1: ADICIÓN DE SUSTANCIAS DE ORIGEN VEGETAL CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

4.1.1. Actividad antimicrobiana

En un primer lugar, se llevó a cabo la evaluación de la actividad antimicrobiana de las 5 sustancias con actividad antibacteriana frente a *E. coli*. Para ello se realizaron 5 réplicas. Los resultados mostraron que únicamente el CA fue capaz de inhibir completamente el crecimiento bacteriano tras 24 horas de incubación (Figura 11 y 12). Ninguna de las otras sustancias con actividad antibacteriana (EU, FA y MF) evaluadas fueron capaz de controlar el crecimiento, mostrando todas ellas un número de colonias similar tanto al grupo con y sin antibióticos (Figura 11 y 12).

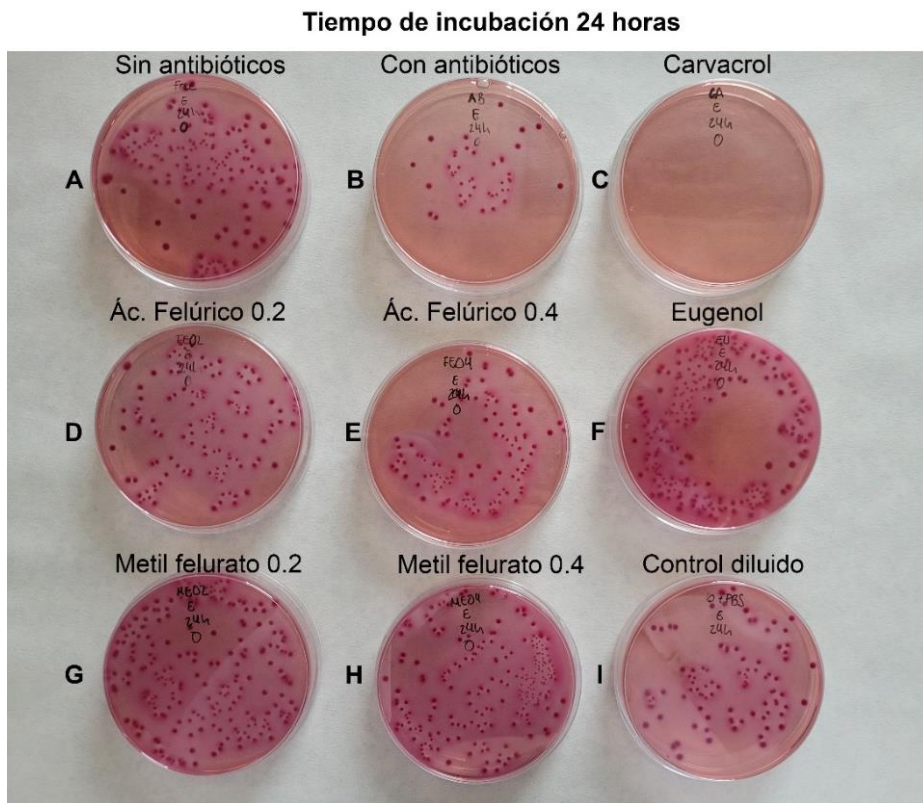


Figura 11. Placas agar MacConkey incubadas con distintas sustancias con actividad antibacteriana mostrando crecimiento de *E. coli* después de 24 horas de incubación a 37°. Donde (A) grupo sin

antibióticos, (B) grupo con antibióticos, (C) carvacrol a concentración 0,25 mg/mL, (D) ácido felúrico a concentración 0,200 mg/mL, (E) ácido felúrico a concentración 0,400 mg/mL, (F) eugenol a concentración 0,250 mg/mL, (G) metil ferulato a concentración 0,200 mg/mL, (H) metil ferulato a concentración 0,400 mg/mL e (I) control diluido.

Estos mismos resultados fueron observados al cabo de las 48 horas de refrigeración. Nuevamente, se observó como la adición de CA lograba inhibir totalmente el crecimiento de *E. coli* (Figura 12). Tanto el EU, el FA y el MF presentaron un número de colonias similar al medio sin antibióticos (Figura 12), con valores significativamente superiores al grupo con presencia de antibióticos (Figura 12).

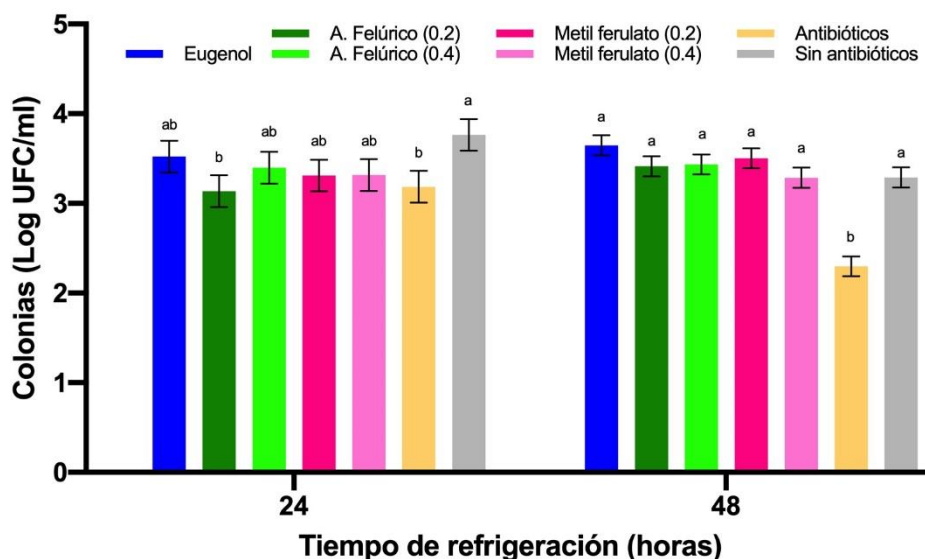


Figura 12. Actividad antimicrobiana de diferentes sustancias con actividad antibacteriana frente a *E. coli* en un medio compuesto por solución salina tamponada (PBS*). Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. Los valores con superíndices distintos (a, b) son significativamente diferentes ($p < 0,050$). *PBS (fosfato monopotásico 0,20 g/L, fosfato disódico 1,15 g/L, cloruro sódico 8 g/L, potasio cloruro 0,20 g/L).

4.1.2. Motilidad y parámetros cinéticos

La valoración de la calidad seminal se realizó empleando 10 réplicas. El estudio de las diferentes sustancias antimicrobianas sobre la calidad seminal demostró que la presencia de CA (inmediata tras su incorporación, tiempo 0) fue la única sustancia que produjo una reducción significativa del porcentaje de espermatozoides motiles (Figura 13). Este mismo efecto se mantuvo después de la refrigeración tanto a 24 como a 48 horas. No se observaron diferencias entre EU y compuestos derivados del FA, presentando estos unos valores similares tanto al grupo con y sin antibióticos (Figura 13).

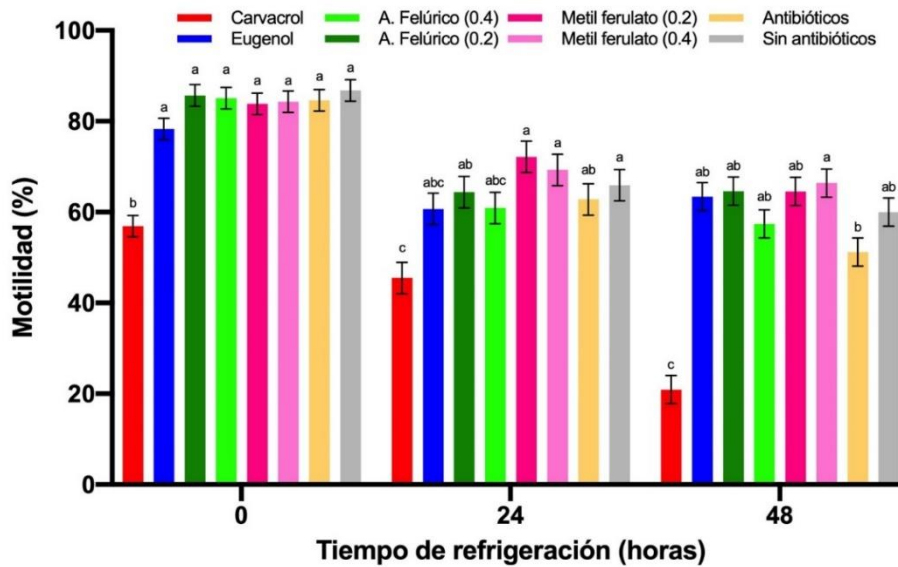


Figura 13. Motilidad espermática del experimento 1 de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en un medio compuesto por Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48 horas). El análisis se llevó a cabo con 10 mezclas heterospérmicas. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. Los valores con superíndices distintos (a, b, c) son significativamente diferentes ($p < 0,05$). *TCG (250 mM tris-hidroximetilaminometano, ácido cítrico 83 mM, 50 mM glucosa, pH 6,8-7,0).

No sólo se observó un efecto sobre la motilidad, sino que el CA generó modificaciones en la mayoría de los parámetros cinéticos. Es resaltable que inmediatamente tras la adición del CA (tiempo 0) se observó un impacto directo con una disminución significativa de los parámetros cinéticos VCL, VSL y VAP. Además, dicha disminución se mantuvo e incluso se intensificó a lo largo del periodo de refrigeración (24 y 48 horas) (Figura 14). Adicionalmente, se observó que otros parámetros cinéticos variaban a lo largo del periodo de refrigeración. Específicamente, los índices LIN, STR y WOB se vieron aumentados, mientras que los parámetros relacionados con el movimiento de la cabeza, ALH y BCF disminuían de manera progresiva (Figura 14). El análisis del impacto de EU y los derivados del FA presentan ligeras variaciones con respecto a los grupos con y sin antibióticos, y estas diferencias no parecen tener relevancia biológica (Figura 14).

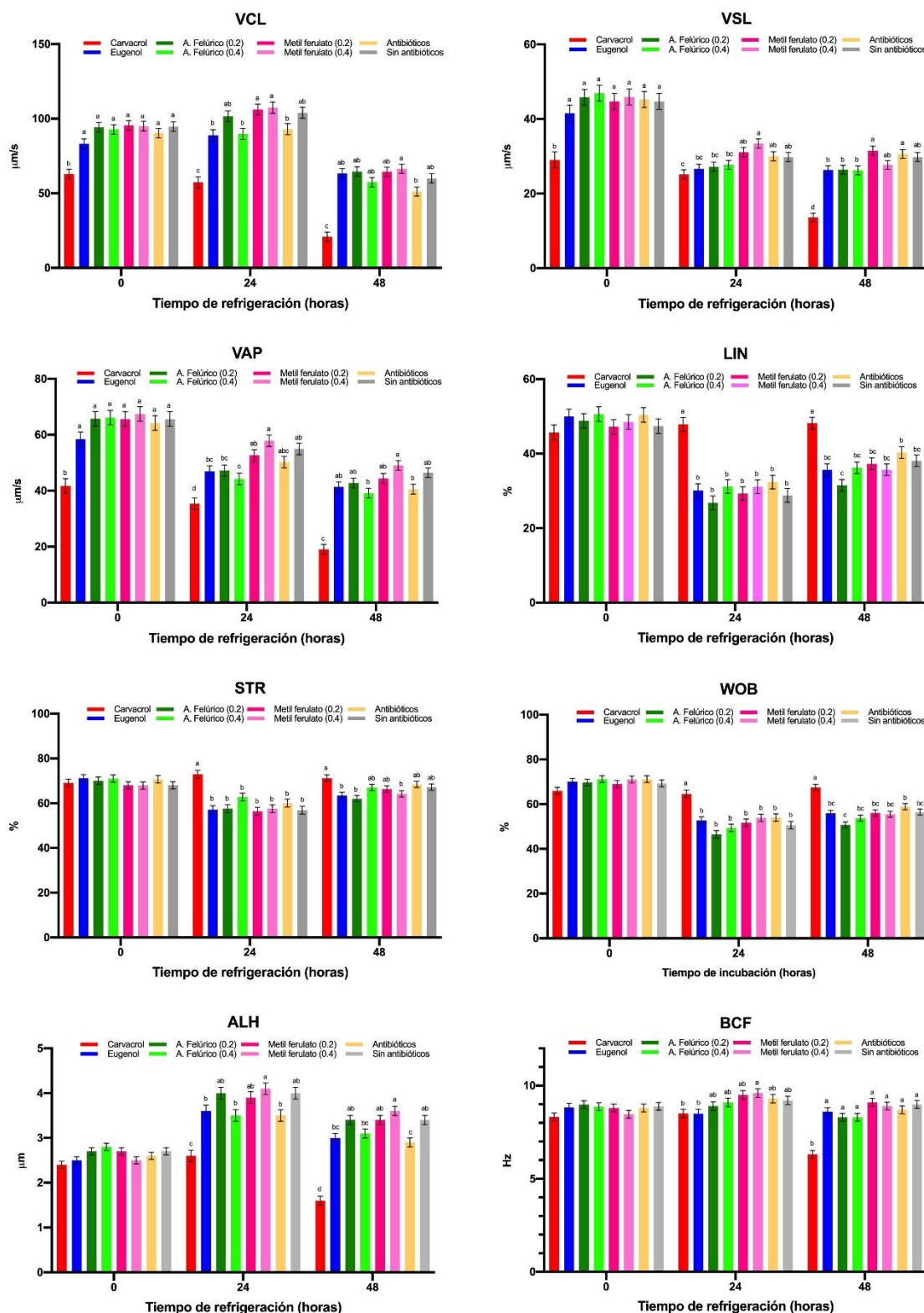


Figura 14. Parámetros cinéticos del experimento 1 de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48 horas). VCL: velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$); VSL: velocidad en línea recta ($\mu\text{m/s}$); VAP: velocidad promedio de trayectoria ($\mu\text{m/s}$); LIN: coeficiente de linealidad (%); STR: coeficiente de rectitud (%); WOB: coeficiente de oscilación (%); ALH: amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (μm); BCF: frecuencia de cruzamiento del latido (Hz). Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. Los

valores con superíndices distintos (a, b, c) son significativamente diferentes ($p < 0,0500$). *TCG (250 mM tris-hidroximetilaminometano, ácido cítrico 83 mM, 50 mM glucosa, pH 6,8-7,0).

4.1.3. Viabilidad espermática

El estudio sobre la viabilidad de los espermatozoides reveló que ninguna de las sustancias antimicrobianas estudiadas presentó efecto alguno tras la inmediata adición o tras 24 horas de refrigeración (Figura 15). Sin embargo, la presencia de CA (0,250 mg/mL) tras 48 horas de refrigeración generó una reducción en la viabilidad de los espermatozoides frente al resto de las sustancias con actividad antibacteriana (EU, FA y MF), las cuales exhibieron un comportamiento similar a los grupos con y sin antibióticos (Figura 15).

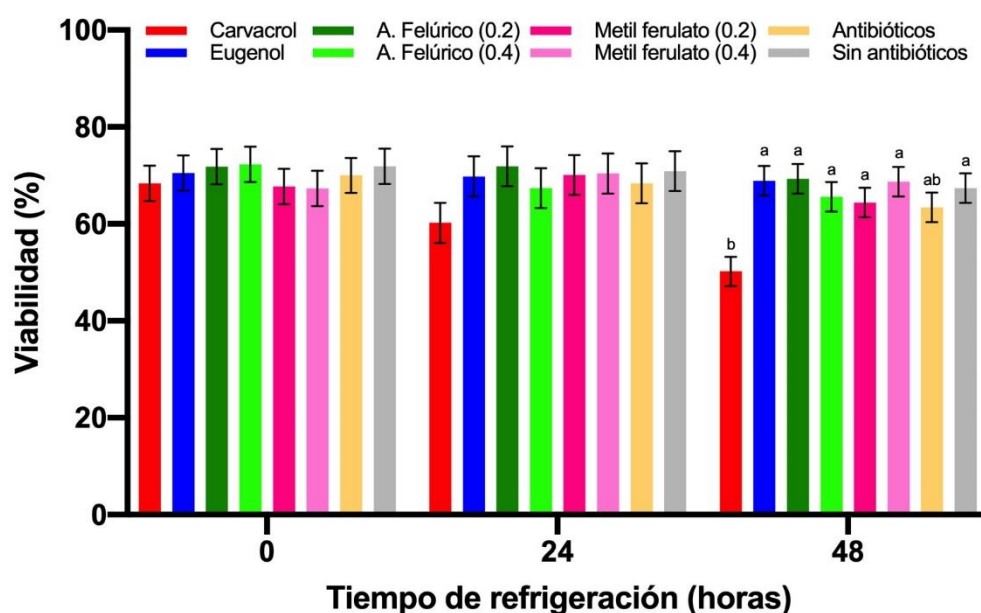


Figura 15. Viabilidad espermática del experimento 1 de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en un medio compuesto por Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48 horas). El análisis se llevó a cabo con 10 mezclas heterospérmicas. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. Los valores con superíndices distintos (a, b) son significativamente diferentes ($p < 0,0500$). *TCG (250 mM tris-hidroximetilaminometano, ácido cítrico 83 mM, 50 mM glucosa, pH 6,8-7,0).

4.2. EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN DE CONCENTRACIONES DECRECIENTES DE CARVACROL

4.2.1. Actividad antimicrobiana

Inicialmente, se procedió a la evaluación de la actividad antibacteriana de 3 concentraciones decrecientes de CA frente a *E. coli*. En este experimento se realizaron 3 réplicas. Los resultados evidenciaron que, tras un periodo de refrigeración de 24 horas, la concentración de 0,125 mg/mL fue la única que logró reducir el crecimiento bacteriano (Figura 16 y 17). La concentración de 0,100 mg/mL presentó un crecimiento bacteriano similar al grupo con y sin antibióticos. Cuando la concentración se redujo a 0,050 mg/mL el crecimiento bacteriano fue significativamente mayor en comparación al grupo con antibióticos (Figura 16 y 17).

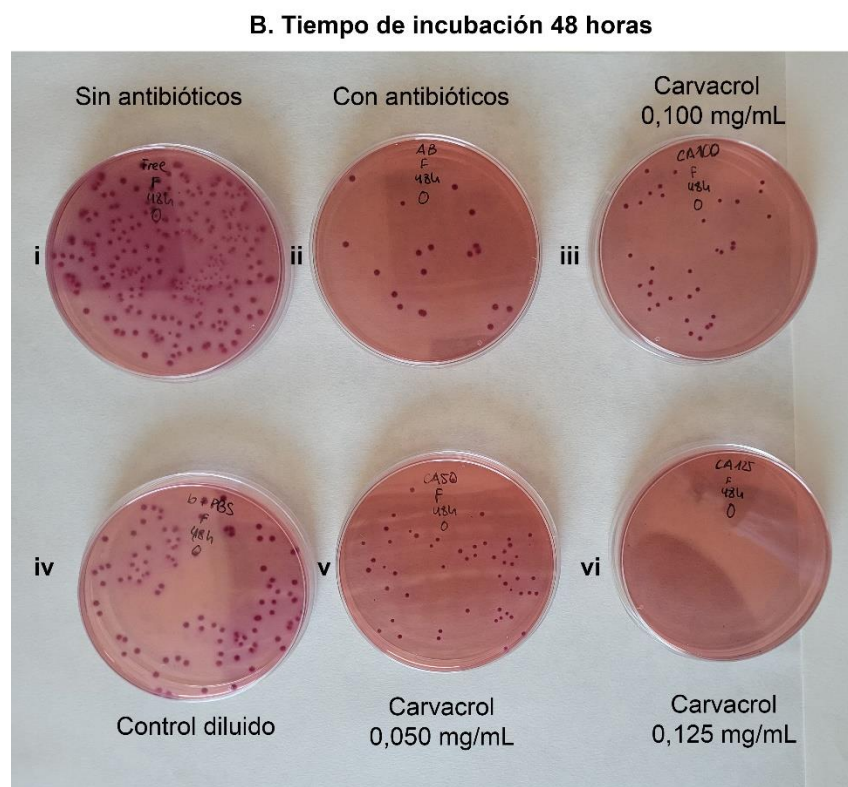
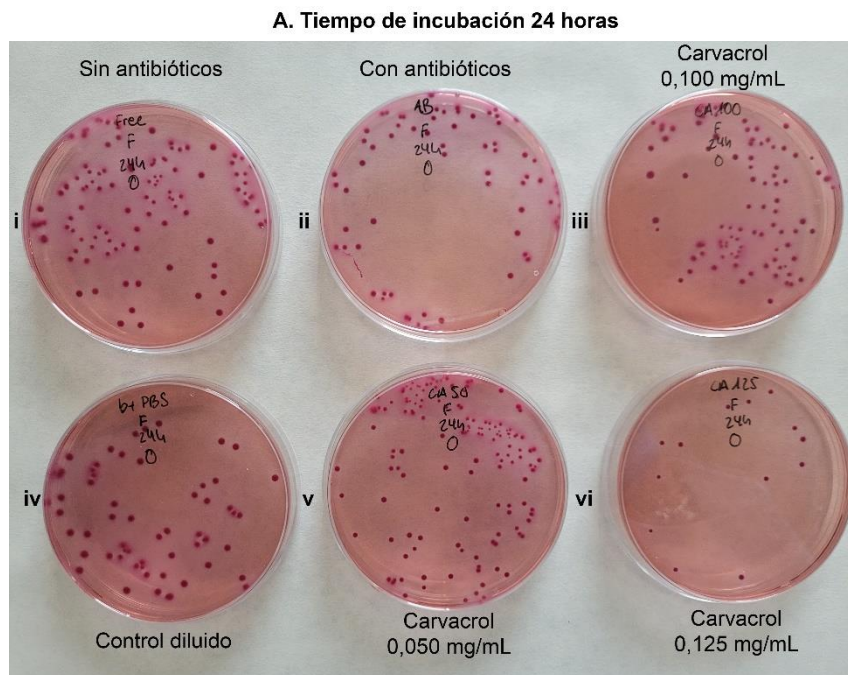


Figura 16. Placas agar MacConkey incubadas con distintas sustancias con actividad antibacteriana mostrando crecimiento de *E. coli* después de 24 horas (A) y 48 horas (B) de incubación a 37°. Donde (i) grupo sin antibióticos, (ii) grupo con antibióticos, (iii) carvacrol a concentración 0,100 mg/mL, (iv) control diluido, (v) carvacrol a concentración 0,050 mg/mL y (vi) carvacrol a concentración 0,125 mg/mL.

Este mismo efecto fue observado tras 48 horas de refrigeración. Cabe destacar que el uso de una concentración de 0,125 mg/mL de CA provocaba una inhibición completa del crecimiento bacteriano (Figura 15 y 16). A diferencia de lo ocurrido previamente, se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos, especialmente en las concentraciones de 0,100

mg/mL y 0,050 mg/mL, donde se observó un mayor crecimiento en comparación con el grupo antibiótico. Nuevamente se confirma que el uso de CA a una concentración de 0,050 mg/mL no controla el crecimiento de *E. coli* (Figura 17).

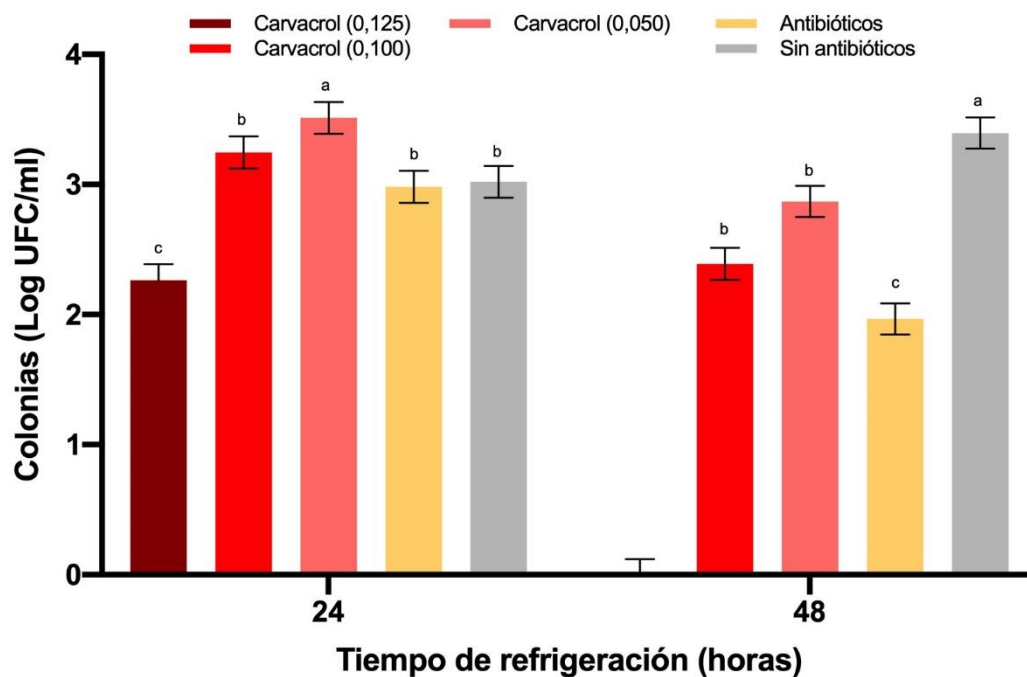


Figura 17. Actividad antimicrobiana de diferentes sustancias con actividad antibacteriana frente a *E. coli* en un medio compuesto por solución salina tamponada (PBS*) en el experimento 2. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. Los valores con superíndices distintos (a, b, c) son significativamente diferentes ($p < 0,05$). *PBS (fosfato monopotásico 0,20 g/L, fosfato disódico 1,15 g/L, cloruro sódico 8 g/L, potasio cloruro 0,20 g/L).

4.2.2. Motilidad y parámetros cinéticos

La valoración de la calidad seminal se realizó empleando 5 réplicas. La evaluación de la calidad espermática a concentraciones decrecientes de CA demostró que, inmediatamente tras su adición (tiempo 0), no hubo ninguna diferencia en la motilidad en comparación con el grupo antibiótico (Figura 18). Sin embargo, tras un periodo de refrigeración de 24 horas, se observó una reducción significativa de la motilidad espermática en aquellas dosis con concentraciones más elevadas (0,125 mg/mL y 0,100 mg/mL) en comparación con el grupo con antibióticos y sin antibióticos. Resultados similares fueron observados tras 48 horas de refrigeración (Figura 18).

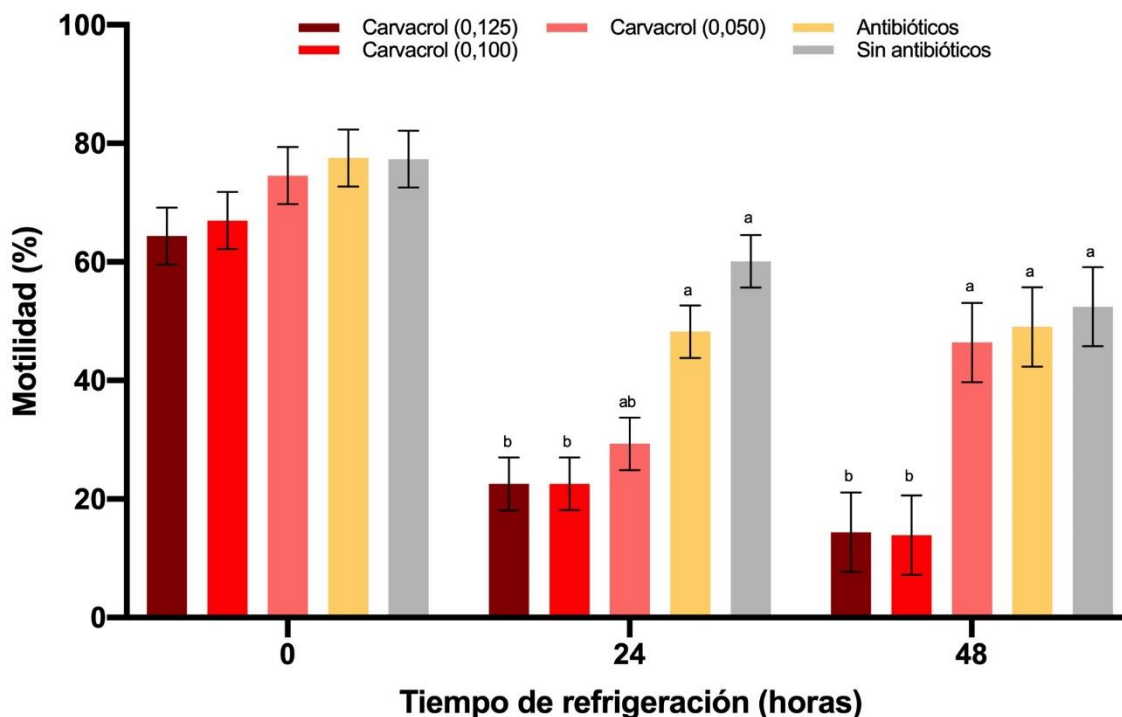


Figura 18. Motilidad espermática del experimento 2 de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en un medio compuesto por Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48 horas). El análisis se llevó a cabo con 10 mezclas heterospérmicas. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. Los valores con superíndices distintos (a, b) son significativamente diferentes ($p < 0,0500$). *TCG (250 mM tris-hidroximetilaminometano, ácido cítrico 83 mM, 50 mM glucosa, pH 6,8-7,0).

En línea con lo observado en motilidad, las concentraciones más elevadas de CA (0,125 mg/mL y 0,100 mg/mL) generaron modificaciones en algunos de los parámetros cinéticos determinados mediante el programa CASA. Tras la inmediata incorporación del CA (tiempo 0) se observó una disminución de las velocidades (VCL, VSL, VAP) y de los diferentes índices (LIN, STR, WOB) en comparación con el grupo con antibióticos. No obstante, no se observaron diferencias en los parámetros que determinan el movimiento de la cabeza (ALH y BCF) en comparación con el grupo antibiótico. Tampoco se observaron diferencias en los parámetros cinéticos con respecto al uso de una concentración de 0,125 y 0,100 mg/mL (Figura 19). A las 24 horas de refrigeración estas diferencias fueron menos evidentes (Figura 19). Sin embargo, a las 48 horas de refrigeración las diferencias fueron nuevamente evidentes (Figura 19). Es resaltable que cuando se empleó una concentración de 0,050 mg/mL de CA, no se observaron diferencias en ninguno de los parámetros con respecto al grupo tratado con antibióticos (Figura 19).

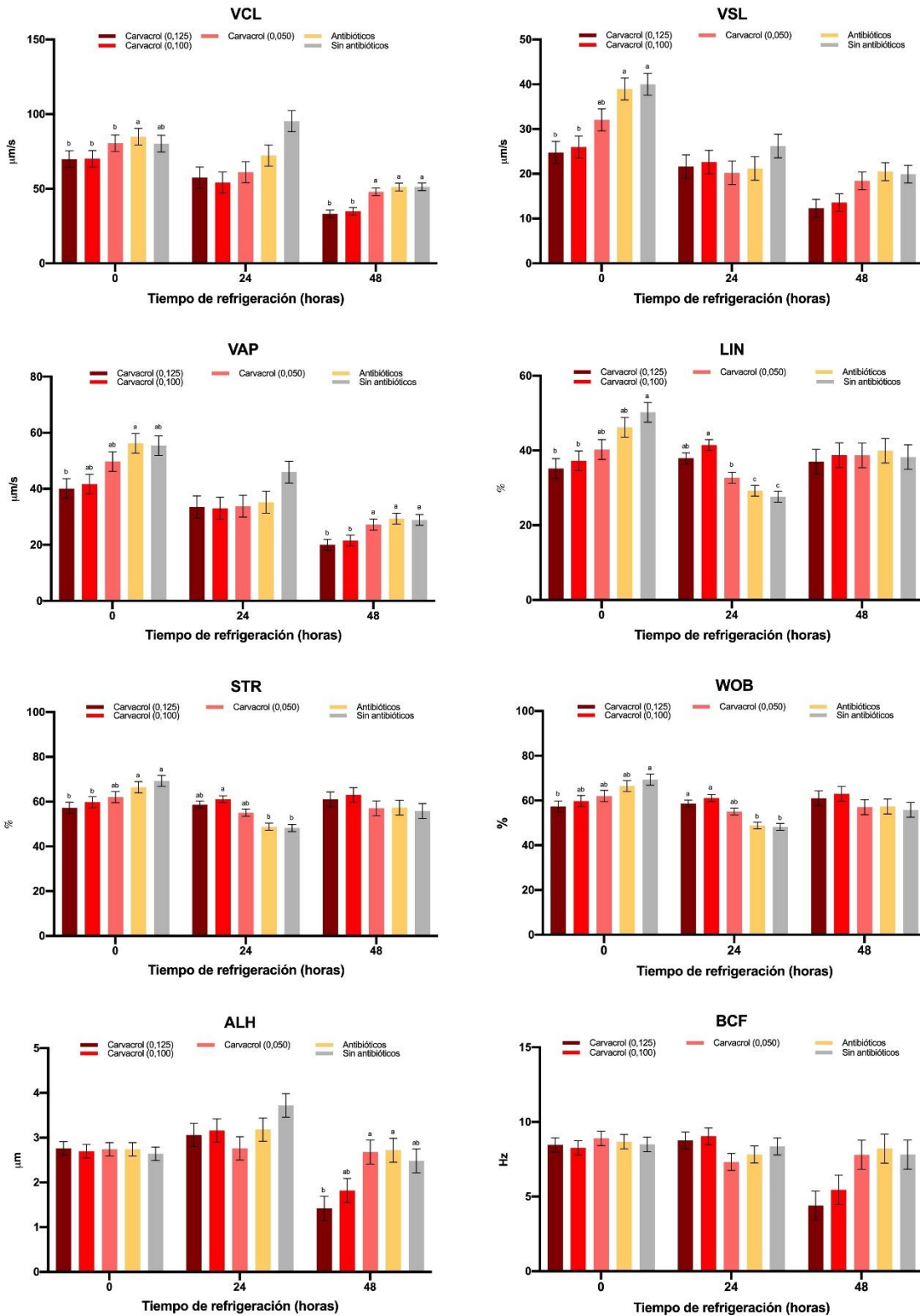


Figura 19. Parámetros cinéticos del experimento 2 de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48 horas). VCL: velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$); VSL: velocidad en línea recta ($\mu\text{m/s}$); VAP: velocidad promedio de trayectoria ($\mu\text{m/s}$); LIN: coeficiente de linealidad (%); STR: coeficiente de rectitud (%); WOB: coeficiente de oscilación (%); ALH: amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (μm); BCF: frecuencia de cruzamiento del latido (Hz). Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de

la media. Los valores con superíndices distintos (a, b, c) son significativamente diferentes ($p < 0,0500$).

*TCG (250 mM tris-hidroximetilaminometano, ácido cítrico 83 mM, 50 mM glucosa, pH 6,8-7,0).

4.2.3. Viabilidad espermática

El estudio de la viabilidad demostró que la adición de CA en concentraciones decrecientes a partir de 0,125 mg/mL presentaron unos resultados similares que los grupos con y sin antibióticos a lo largo del periodo de refrigeración hasta las 48 horas (Figura 20).

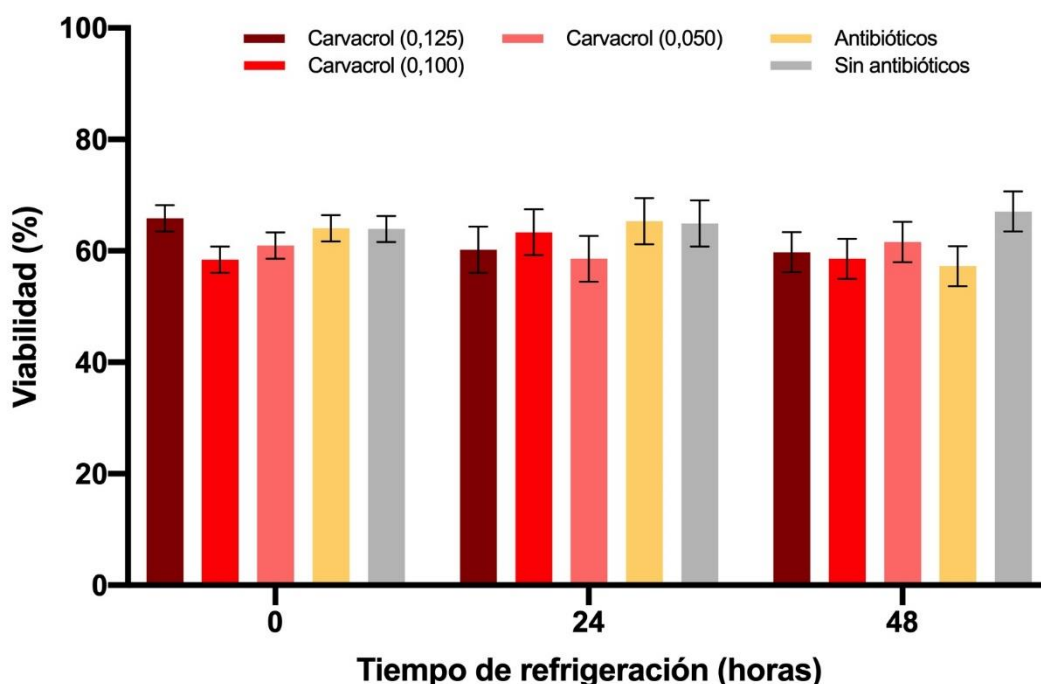


Figura 20. Viabilidad espermática del experimento 2 de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en un medio compuesto por Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48 horas). El análisis se llevó a cabo con 10 mezclas heterospermicas. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. Los valores con superíndices distintos (a, b) son significativamente diferentes ($p < 0,0500$). *TCG (250 mM tris-hidroximetilaminometano, ácido cítrico 83 mM, 50 mM glucosa, pH 6,8-7,0).

5. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue el estudio de la adición de sustancias de origen vegetal con actividad antibacteriana como alternativas al uso de antibióticos para la conservación de dosis seminales refrigeradas en conejo. Nuestros resultados evidenciaron que, de todos los agentes evaluados, únicamente el CA tuvo la capacidad de inhibir el crecimiento de la bacteria comensal *E. coli*. La adición de EU o de FA, así como su derivado, el MF, no fueron eficaces frente a *E. coli*. La actividad antibacteriana del CA ha sido descrita previamente (Liu *et al.*, 2017; Kachur & Suntres, 2020), incluyendo su uso en semen de verraco (Frydrychová S *et al.*, 2012; Mazurova *et al.*, 2015). Asimismo, también existe bibliografía con la actividad antimicrobiana del EU (Oyieng Angienda *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2017), FA y sus derivados (Borges *et al.*, 2013). Si bien la adición de EU, FA y MF no demostraron ser capaces de inhibir el crecimiento, su comportamiento fue similar a los antibióticos frente a *E. coli* durante 24 horas de refrigeración, pero no así tras 48 horas de refrigeración.

Cuando se procedió a la determinación de la calidad espermática, nuestros resultados demostraron que la adición de 0,250 mg/mL de CA afectó negativamente tanto a la motilidad (y a sus parámetros cinéticos), como a la viabilidad. Hasta la fecha, el uso del CA en dosis seminales de conejo no ha sido descrito por lo que la discusión de nuestros resultados es algo limitada. No obstante, nuestros resultados en conejo estarían alineados con lo descrito en diferentes estudios en otras especies ganaderas. Así, Frydrychová *et al.* (2012) determinó que el uso de 300 mg/mL de CA produce un efecto negativo en la viabilidad durante periodos de almacenamiento cortos, así como una reducción en motilidad del 70% a tiempo 0 hasta el 40% tras un periodo de refrigeración de 24 horas en semen de verraco. Resultados también corroborados por Mazurova *et al.* (2015), observando una reducción en motilidad del 60% a tiempo 0 hasta el 20% tras un periodo de refrigeración de 48 horas. Estos resultados sugieren que el CA, a elevadas concentraciones, presenta un efecto negativo sobre los espermatozoides. El CA despolariza el potencial de membrana, resultando en la pérdida de iones y nutrientes importantes y, provocando la muerte de las bacterias (Mazurova *et al.*, 2015). Este mecanismo podría, en parte, ser responsable de la pérdida de funcionalidad de los espermatozoides. El mecanismo de acción del EU también parece actuar sobre la membrana externa bacteriana, interrumpiendo su metabolismo y la proteosíntesis (Mazurova *et al.*, 2015). A pesar de que tanto el CA como el EU actúan a nivel de membrana, nuestros resultados demostrarían que ambos agentes no presentan la misma capacidad antibacteriana contra *E. coli*, lo que también es extensible a sus efectos sobre la membrana de los espermatozoides. Esto podría atribuirse, en parte, a las diferencias en sus estructuras químicas, siendo el EU más complejo estructuralmente debido a la presencia del grupo metoxi (-OCH₃). Estas variaciones estructurales implican afinidades y capacidades de interacción diferentes, lo explica las discrepancias en la potencia y actividad antimicrobiana. Además, investigaciones previas han determinado que el CA es el aceite esencial que más actividad antibacteriana presenta (Burt, 2004). Hasta la fecha no se ha descrito el uso de ácido felúrico y su derivado el metil ferulato en el control microbiano presente en las dosis seminales, así como su actividad sobre la calidad seminal impidiendo así profundizar más en la discusión de los resultados obtenidos en este estudio.

En base a los resultados obtenidos en el primer experimento, se trató de estudiar la capacidad antimicrobiana del CA a concentraciones más bajas. Así, el uso de CA a 0,050 mg/mL no presentaba diferencias significativas en porcentaje de motilidad, cinética del movimiento espermático y de viabilidad, en comparación con el grupo con antibióticos. Sin embargo, esta concentración de CA presentó un crecimiento de *E. coli* significativamente superior tanto a 24 como a 48 horas de refrigeración en comparación con el grupo con antibióticos. En cambio, concentraciones más elevadas (0,125 mg/mL y 0,100 mg/mL) nuevamente afectaban negativamente a las características seminales, disminuyendo así el porcentaje de células móviles, tanto a las 24 como a las 48 horas de refrigeración. Resultado acorde con lo descrito por otros autores quienes indicaron que los compuestos fenólicos pueden alterar la motilidad de los espermatozoides (Pasquariello *et al.*, 2020). No obstante, la adición de CA a concentraciones entre 0,125 y 0,050 mg/mL no generaron ningún efecto sobre la viabilidad espermática ni a 24, ni a 48 horas de refrigeración. Además, la concentración de 0,125 mg/mL de CA fue la única que inhibió el crecimiento a las 48 horas de refrigeración. En base a estos resultados, sería necesario abordar un nuevo experimento en el que se evalúe el efecto de 0,125 mg/mL de CA durante la refrigeración de las dosis seminales de conejo sobre la capacidad fecundante (inseminaciones en condiciones de campo) para así conocer la aplicabilidad del CA como sustituto a los antibióticos.

6. CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que el uso de *Origanum vulgare* (eugenol a 0,250 mg/mL) y dos derivados de la paja del arroz (ácido felúrico y metil ferulato a concentraciones de 0,200 y 0,400 mg/mL) mantiene la calidad seminal durante un periodo de refrigeración de hasta 48 horas, pero se muestran ineficaces en el control del crecimiento de la bacteria comensal *E. coli*. Sin embargo, la adición de *Syzygium aromaticum* (carvacrol a 0,250 mg/mL) a las dosis seminales inhibe el crecimiento de *E. coli* durante 48 horas de refrigeración, pero altera la calidad seminal *in vitro*. La reducción de CA a la concentración de 0,125 mg/mL permite controlar el crecimiento de *E. coli* a 24 horas, e inhibir su crecimiento a las 48 horas de refrigeración sin alterar la viabilidad espermática, no así la motilidad. Como proyección futura, es necesario llevar a cabo un estudio adicional sobre la adición de 0,125 mg/mL de carvacrol en condiciones de inseminación (*in vivo*) con la finalidad de evaluar su impacto biológico en términos de fertilidad y prolificidad para determinar su potencial uso.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A., SHARMA, R. K., GUPTA, S., BOITRELLE, F., FINELLI, R., PAREKH, N., DURAIRAJANAYAGAM, D., SALEH, R., ARAFA, M., CHO, C. L., FARKOUH, A., RAMBHATLA, A., HENKEL, R., VOGIATZI, P., TADROS, N., KAVOUSSI, P., KO, E., LEISEGANG, K., KANDIL, H., ... SHAH, R. (2022). Sperm vitality and necrozoospermia: diagnosis, management, and results of a global survey of clinical practice. *World Journal of Men's Health*, 40(2), 228–242. Korean Society for Sexual Medicine and Andrology. <https://doi.org/10.5534/wjmh.210149>
- ALTMÄE, S., FRANASIAK, J. M., & MÄNDAR, R. (2019). The seminal microbiome in health and disease. *Nature Reviews Urology*, 16(12), 703–721. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0250-y>
- ANANDHI, P., THARANI, M., RAJESHKUMAR, S., & LAKSHMI, T. (2022). Antibacterial activity of cinnamon and clove oil against wound pathogens. *Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology = Journal de La Therapeutique Des Populations et de La Pharmacologie Clinique*, 28(2), e41–e46. <https://doi.org/10.47750/jptcp.2022.871>
- BAUD, D., PATTARONI, C., VULLIEMOZ, N., CASTELLA, V., MARSLAND, B. J., & STOJANOV, M. (2019). Sperm microbiota and its impact on semen parameters. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00234>
- BORGES, A., FERREIRA, C., SAAVEDRA, M. J., & SIMÕES, M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 19(4), 256–265. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0244>
- BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- CHRISTAKI, E., MARCOU, M., & TOFARIDES, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), 26–40, Springer. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>

- CONTRERAS, M. J., NÚÑEZ-MONTERO, K., BRUNA, P., ZÁRATE, A., PEZO, F., GARCÍA, M., LEAL, K., & BARRIENTOS, L. (2023). Mammals' sperm microbiome: current knowledge, challenges, and perspectives on metagenomics of seminal samples. *Frontiers in Microbiology* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1167763>
- COTTELL, E., HARRISON, R. F., MCCAFFREY, M., WALSH, T., MALLON, E., & BARRY-KINSELLA, C. (2000). Are seminal fluid microorganisms of significance or merely contaminants? *Fertility and Sterility*, 74(3), 465–470. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)00709-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00709-3)
- DI IORIO, M., MANCHISI, A., ROCCO, M., CHRENEK, P., & IAFFALDANO, N. (2014). COMPARISON OF different extenders on the preservability of rabbit semen stored at 5°C for 72 hours. *Italian Journal of Animal Science*, 13(4), 710–714. <https://doi.org/10.4081/ijas.2014.3444>
- DURACKA, M., LUKAC, N., KACANIOVA, M., KANTOR, A., HLEBA, L., ONDRUSKA, L., & TVRDA, E. (2019). Antibiotics versus natural biomolecules: The case of *in vitro* induced bacteriospermia by enterococcus faecalis in rabbit semen. *Molecules*, 24(23). <https://doi.org/10.3390/molecules24234329>
- EFENBERGER-SZMECHTYK, M., NOWAK, A., & CZYZOWSKA, A. (2021). Plant extracts rich in polyphenols: antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(1), 149–178. Bellwether Publishing, Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1722060>
- FRYDRYCHOVÁ S, LUSTYKOVÁ A, VÁCLAVKOVÁ E, LIPENSKÝ J, ROZKOT M, & OPLETAL L. (2012). Effect of natural substances as a potential substitute for antibiotics in boar semen extender on semen survival time. *Research in Pig Breeding*, 6, 2012 (2): 20-23
- GÒDIA, M., RAMAYO-CALDAS, Y., ZINGARETTI, L. M., LÓPEZ, S., RODRÍGUEZ-GIL, J. E., YESTE, M., SÁNCHEZ, A. M., & CLOP, A. (2020b). A RNA-seq characterization of the porcine sperm microbiome. bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory). <https://doi.org/10.1101/2020.03.16.994244>
- GOLDBERG, A. M. G., CARDOSO, M., BERNARDI, M. L., WENTZ, I., & BORTOLOZZO, F. P. (2017). The impact of bacterial contamination of the ejaculate and extender on the quality of swine semen doses. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(5), 3095. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n5p3095>.
- HOLMES, A. H., MOORE, L. S. P., SUNDSFJORD, A., STEINBAKK, M., REGMI, S., KARKEY, A., GUERIN, P. J., & PIDDOCK, L. J. V. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387(10014), 176–187. Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0)
- HOSSEINZADEH, S. (2001). Co-incubation of human spermatozoa with Chlamydia trachomatis serovar E causes premature sperm death. *Human Reproduction*, 16(2), 293–299. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.2.293>

- HOU, D., ZHOU, X., ZHONG, X., SETTLES, M. L., HERRING, J., WANG, L., ABDO, Z., FORNEY, L. J., & XU, C. (2013). Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertility and Sterility*, 100(5), 1261-1269.e3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.07.1991>
- KACHUR, K., & SUNTRES, Z. (2020). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(18), 3042–3053). Bellwether Publishing, Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>
- LEYVA-LÓPEZ, N., GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P., VAZQUEZ-OLIVO, G., & HEREDIA, J. B. (2017). Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*, 22(6), 989. <https://doi.org/10.3390/molecules22060989>
- LI, T., SHEN, Y., CHEN, H., XU, Y., WANG, D., CUI, F., HAN, Y., & LI, J. (2021). Antibacterial Properties of Coaxial Spinning Membrane of Methyl ferulate/zein and Its Preservation Effect on Sea Bass. *Foods*, 10(10), 2385. <https://doi.org/10.3390/foods10102385>
- LIU, Q., MENG, X., LI, Y., ZHAO, C. N., TANG, G. Y., & LI, H. BIN. (2017). Antibacterial and antifungal activities of spices. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6) <https://doi.org/10.3390/ijms18061283>
- MARCO-JIMÉNEZ, F., BORRÁS, S., GARCIA-DOMINGUEZ, X., D'AURIA, G., VICENTE, J. S., & MARIN, C. (2020). Roles of host genetics and sperm microbiota in reproductive success in healthy rabbit. *Theriogenology*, 158, 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.09.028>
- MAZUROVA, J., KUKLA, R., ROZKOT, M., LUSTYKOVA, A., SLEHOVA, E., SLEHA, R., LIPENSKY, J., & OPLETAL, L. (2015). Use of natural substances for boar semen decontamination. *Veterinarni Medicina*, 60(5), 235–247. <https://doi.org/10.17221/8175-VETMED>
- MCEWEN, S. A., & COLLIGNON, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology Spectrum*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017>
- MOORE, S. G., & HASLER, J. F. (2017). A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10314–10331. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13138>
- MOREIRA, F., CORCINI, C. D., RODRIGUES, G., ARAUJO, E. G. DE, LEITE, F. L., & LUCIA JUNIOR, T. (2013). Identification of Escherichia coli and Staphylococcus aureus in the prepuce, semen, and vulvar secretions of swine. *Semina: Ciências Agrárias*, 34(1), 341–346. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n1p341>
- MORRELL, J. M. (1995). Artificial insemination in rabbits. *British Veterinary Journal*, 151(5), 477–488. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(05\)80022-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(05)80022-3)
- MORRELL, J. M., & WALLGREN, M. (2014). Alternatives to antibiotics in semen extenders: A review. *Pathogens*, 3 (4), 934–946. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens3040934>

- MORTIMER, S. T. (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update*, 3(5), 403-439. <https://doi.org/10.1093/humupd/3.5.403>
- Muiño-Blanco, T., Pérez-Pé, R., & Cebrián-Pérez, J. A. (2008). Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 18-31. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01228.x>
- MUNITA, J. M., & ARIAS, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- NABI, A., KHALILI, M. B., ESLAMI, G., VAKILI, M., ANBARI, F., & TORIKI, A. (2022). A comparison of different O-antigen serogroups of Escherichia coli in semen samples of fertile and infertile men. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 49(1). <https://doi.org/10.5653/cerm.2020.04161>
- NEMETH, J., OESCH, G., & KUSTER, S. P. (2015). Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(2), 382–395. <https://doi.org/10.1093/jac/dku379>
- OYIENG ANGIENDA, P., ONYANGO, D. M., & HILL, D. J. (2010). Potential application of plant essential oils at sub-lethal concentrations under extrinsic conditions that enhance their antimicrobial effectiveness against pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 4(16), 1678–1684. <http://www.academicjournals.org/ajmr>
- PASQUARIELLO, R., VERDILE, N., BREVINI, T. A. L., GANDOLFI, F., BOITI, C., ZERANI, M., & MARANESI, M. (2020). The role of resveratrol in mammalian reproduction. In *Molecules*, 25(19), 4554. <https://doi.org/10.3390/molecules25194554>
- REICHART, M., KAHANE, I., & BARTOOV, B. (2000). *In vivo* and *In vitro* Impairment of Human and Ram Sperm Nuclear Chromatin Integrity by Sexually Transmitted Ureaplasma urealyticum Infection1. *Biology of Reproduction*, 63(4), 1041–1048. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.4.1041>
- RESTREPO, G., ZAPATA, K., COLORADO, P., & ROJANO, B. (2023). Cooling of porcine semen in an extender supplemented with carvacrol. *Reproduction in Domestic Animals*. <https://doi.org/10.1111/rda.14359>
- ROCA, J., MARTINEZ, S., VÁZQUEZ, J. T., LUCAS, X., PARRILLA, I., & MARTÍNEZ, E. (2000). Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. *Animal Reproduction Science*, 64(1-2), 103-112. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00185-8](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00185-8)
- RODIN, D. M., LARONE, D., & GOLDSTEIN, M. (2003). Relationship between semen cultures, leukospermia, and semen analysis in men undergoing fertility evaluation. *Fertility and Sterility*, 79, 1555–1558. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(03\)00340-6](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(03)00340-6)
- ROUILLON, C., CAMUGLI, S., CARION, O., ECHEGARAY, A., DELHOMME, G., & SCHMITT, E. (2022). Antimicrobials in a rabbit semen extender: effects on reproduction. *World Rabbit Science*, 30(4), 295-308. <https://doi.org/10.4995/wrs.2022.17132>

- SAKR, O. G., GAD, A., RODRÍGUEZ, M., REBOLLAR, P. G., & MILLÁN, P. (2019). Superoxide dismutase mimics improves semen quality during chilled preservation of rabbit spermatozoa. *Livestock Science*, 221, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.01.015>
- SANTOYO, S., CAVERO, S., JAIME, L., CIFUENTES, A., SEÑORÁNS, F. J., & REGLERO, G. (2006). Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Compounds with Antimicrobial Activity from *Origanum vulgare* L.: Determination of Optimal Extraction Parameters. *Journal of Food Protection*, 69(2), 369-375. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.2.369>
- SONG, W., XIN, J., YU, C., XIA, C., & PAN, Y. (2023). Alkyl ferulic acid esters: Evaluating their structure and antibacterial properties. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1135308>
- SUÁREZ, C. A., SIERRA, A. P., RESTREPO, D. M., DUQUE C., J. E., & RESTREPO, G. B. (2020). Evaluation of Extenders for the Cooling of Rabbit Semen (*Oryctolagus Cuniculus*). *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 31(2). <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17857>
- VIUDES-DE-CASTRO, M. P., MARCO JIMENEZ, F., & VICENTE, J. S. (2023a). Reproductive Performance of Female Rabbits Inseminated with Extenders Supplemented with GnRH Analogue Entrapped in Chitosan-Based Nanoparticles. *Animals*, 13(10). <https://doi.org/10.3390/ani13101628>
- VIUDES-DE-CASTRO, M. P., MARCO-JIMENEZ, F., VICENTE, J. S., & MARIN, C. (2021). Antibacterial activity of some molecules added to rabbit semen extender as alternative to antibiotics. *Animals*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/ani11041178>
- VIUDES-DE-CASTRO, M. P., MOCÉ, E., LAVARA, R., MARCO-JIMÉNEZ, F., & VICENTE, J. S. (2014). Aminopeptidase activity in seminal plasma and effect of dilution rate on rabbit reproductive performance after insemination with an extender supplemented with buserelin acetate. *Theriogenology*, 81(9), 1223–1228. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.02.003>
- VIUDES-DE-CASTRO, M. P., & VICENTE, J. S. (1997). Effect of sperm count on the fertility and prolificity rates of meat rabbits. *Animal Reproduction Science*, 46(3–4), 313–319. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(96\)01628-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(96)01628-4)
- VIUDES-DE-CASTRO, M. P., & VICENTE, J. S. (2023b). Trends in rabbit insemination extenders for fresh and frozen semen. A review. *World Rabbit Science*, 31(2), 109–116. <https://doi.org/10.4995/wrs.2023.18505>
- WEI, H., JIN, Z., WANG, Y., YANG, F., XIAO, Y., JIANG, Y., HU, J., & GAO, M. T. (2022). Antibacterial Effect of Phenolic Acids Derived from Rice Straw and in Combination with Antibiotics Against *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(7), 2931–2945. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03650-5>
- Weng, S.-L., Chiu, C.-M., Lin, F.-M., Huang, W.-C., Liang, C., Yang, T., Yang, T.-L., Liu, C.-Y., Wu, W.-Y., Chang, Y.-A., Chang, T.-H., & Huang, H.-D. (2014). Bacterial Communities in Semen from Men of Infertile Couples: Metagenomic Sequencing Reveals Relationships

of Seminal Microbiota to Semen Quality. *PLoS ONE*, 9(10), e110152.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110152>

WIEBKE, M., HENSEL, B., NITSCHKE-MELKUS, E., JUNG, M., & SCHULZE, M. (2022). Cooled storage of semen from livestock animals (part I): boar, bull, and stallion. *Animal Reproduction Science*, 246. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106822>

WORLD HEALTH ORGANIZATION: WHO. (2021, November 17). *Antimicrobial resistance*.
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

8. ANEXOS

ANEXO I

RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DEL DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030.

Este trabajo se relaciona con los objetivos del desarrollo sostenible (ODS) salud y bienestar (ODS 3) y vida de ecosistemas terrestres (ODS 15).

El presente trabajo pretende abordar las crecientes preocupaciones sobre la salud y el bienestar, en línea con el ODS número 3. El uso indiscriminado y excesivo de antibióticos ha llevado a la aparición de bacterias multirresistentes, lo que ha sido declarado por la OMS como una de las diez principales amenazas públicas a las que se enfrenta la salud pública (World Health Organization: WHO, 2021). En este contexto, la investigación se centra en encontrar alternativas eficaces al uso de antibióticos en las dosis seminales de conejos utilizadas en IA, con el propósito de prevenir la diseminación de enfermedades y fomentar prácticas más seguras y sostenibles en la ganadería. A través de la exploración de sustancias de origen vegetal con propiedades antimicrobianas, se busca garantizar la salud y el bienestar tanto de los animales como de las seres humanos involucrados en la producción y consumo de productos ganaderos, contribuyendo así a la consecución del objetivo global de mejorar la salud y el bienestar de todos (Tabla 4).

Así mismo, el presente trabajo está relacionado con el ODS número 15, centrado en la preservación y la protección de la vida de los ecosistema terrestres. El uso indiscriminado de antibióticos en la ganadería ha demostrado ser perjudicial para la salud de los animales y el medio ambiente, al contribuir a la aparición de bacterias resistentes y a la contaminación de los suelos y las aguas. Mediante la búsqueda de alternativas a los antibióticos en las dosis seminales de conejos, este trabajo busca promover prácticas más sostenibles que no comprometan la salud de los ecosistemas terrestres. Al encontrar métodos y sustancias efectivas para la conservación de las dosis seminales sin recurrir a antibióticos, se contribuye a la protección de la biodiversidad y la preservación de los ecosistemas terrestres, lo que resulta fundamental para asegurar la salud y el bienestar de las generaciones futuras (Tabla 4).

Tabla 4. Relación del trabajo con los Objetivos del Desarrollo Sostenible (ODS) de la agenda 2030.

Objetivos del Desarrollo Sostenible	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar.	X			
ODS 4. Educación de calidad.				X

ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.				X
ODS 13. Acción por el clima.				X
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.	X			
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X