



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Ciencia Animal

Desarrollo de un diluyente libre de antibióticos para
inseminación artificial en conejos

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Mejora Genética Animal y Biotecnología de
la Reproducción

AUTOR/A: Ferriz Núñez, Celia

Tutor/a: Lorenzo Rebenaque, Laura

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA
ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

Desarrollo de un diluyente libre de antibióticos para inseminación artificial en conejos

Tesis Final de Máster

Curso 2022-2024

Valencia, julio 2024

Autora: Celia Ferriz Nuñez

Directora: Dra. Laura Lorenzo Rebenaque

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido de manera significativa a la realización de este Trabajo Fin de Máster.

En primer lugar, agradezco al Departamento de Ciencia Animal por brindarme el espacio y los recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación. Agradezco especialmente a Paco y Laura por su orientación experta, paciencia y valiosas sugerencias que han enriquecido este trabajo.

A Juanjo y Manu, quienes han compartido conmigo este viaje académico, gracias por su apoyo mutuo, colaboración y por todos los descansitos para tomar café que hacían el día mucho más ameno.

A mi familia y amigos, su apoyo incondicional y consejos han sido mi mayor motivación. Gracias por estar siempre ahí, acompañándome en cada paso.

Título: Desarrollo de un diluyente libre de antibióticos para inseminación artificial en conejos.

Resumen: La Organización Mundial de la Salud ha reconocido a las bacterias resistentes a los antibióticos como una de las 10 principales amenazas para la salud pública. El mal uso y abuso del empleo de antibióticos ha dado lugar a la aparición de las denominadas bacterias multirresistentes. Combatir las resistencias a los antimicrobianos es una prioridad de la Unión Europea (UE), que ha establecido una estrategia común frente a esta cuestión, en la que España ha sido uno de los países comunitarios que más antibióticos ha utilizado. España aprobó en 2014 su primer Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN), cuyo objetivo principal es la «Prevención de la necesidad del uso de antibióticos». La inseminación artificial (IA) es una tecnología crucial a nivel mundial en la cría de ganado, utilizándose semen fresco en aproximadamente el 90% de la reproducción de ganado en Europa. En más del 99 % de los casos, la inseminación se lleva a cabo con semen fresco y no congelado. Aunque el semen se utiliza lo más rápidamente posible, es necesario almacenarlo hasta tres días a 15-17°C. A esta temperatura, el semen puede sufrir contaminación bacteriana, que los criadores han estado controlando con antibióticos. Sin embargo, recientes directrices europeas indican que el uso de antibióticos en este ámbito será ilegal en un futuro próximo. En este contexto, este estudio tuvo como objetivo el desarrollo de un diluyente libre de antibióticos para su uso en la inseminación artificial en cunicultura. Para ello, se evaluó la actividad antibacteriana del quitosano (biopolímero natural), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y la combinación de ambos, así como su efecto sobre la calidad espermática tanto *in vitro* como *in vivo*. Para ello, con la base del diluyente TCG (250 mM tris-hydroxymethylaminometano, 83 mM ácido cítrico, 50 mM glucosa, pH 6.8-7.0) fueron preparados 5 diluyentes: (i) quitosano (0.05%), (ii) EDTA (20 mM), (iii) quitosano + EDTA (0.05% y 20 mM, respectivamente), (iv) antibióticos (100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomina) y (v) libre de antibióticos. En un primer experimento, los diferentes diluyentes fueron infectados con *Enterococcus faecalis* (10^3 UFC/mL) y sometidos a refrigeración a 15 °C durante 72 horas, realizando un recuento bacteriano (UFC/mL a 0, 24, 48 y 72 horas de refrigeración). En un segundo estudio eyaculados de machos adultos de probada fertilidad fueron obtenidos mediante vagina artificial, generando mezclas heterospérmicas que fueron alicuotadas con los diferentes diluyentes. Las muestras seminales fueron refrigeradas a 15 °C durante 72 horas, realizando la valoración de la calidad seminal (motilidad mediante un programa de análisis de imagen, y viabilidad mediante un test fluorescente de funcionalidad de membrana). Por último, se realizó un tercer experimento en el que se inseminaron 42 hembras con los diferentes diluyentes, determinando la capacidad de fecundación, las pérdidas embrionarias, la tasa de implantación, las pérdidas fetales, la fertilidad y el tamaño de camada. En el experimento 1 se observó que el diluyente con quitosano presentaba un comportamiento similar al diluyente con antibióticos, efecto que se mantuvo a lo largo de la refrigeración ($p > 0.05$). La presencia de EDTA o la combinación quitosano+EDTA presentaban un mayor crecimiento de *Enterococcus faecalis*. En el experimento 2, la motilidad espermática del diluyente con quitosano fue similar a la

observada en el diluyente con antibióticos a lo largo de la refrigeración (24, 48 y 72 horas). La presencia de EDTA o la combinación quitosano+EDTA mostraron un efecto negativo, reduciéndose significativamente la motilidad. En términos de viabilidad, no se observaron diferencias significativas entre diluyentes a ninguna de las horas de refrigeración. Finalmente, la inseminación artificial con los diferentes diluyentes mostró que no había diferencias entre los diluyentes en cuanto a la capacidad fecundante, a excepción del diluyente sin antibióticos cuya capacidad fecundante se vio reducida al 34% aproximadamente. En términos de pérdidas embrionarias el grupo EDTA mostró el valor más bajo ($2\pm 2,3\%$), no se observaron diferencias entre los grupos quitosano y antibióticos ($9\pm 3,7\%$, $21\pm 6,3\%$ respectivamente) siendo estos valores inferiores a los observados para el grupo quitosano+EDTA ($49\pm 5,7\%$). En cuanto a la tasa de implantación, no hubo diferencias entre los grupos quitosano, EDTA y antibióticos ($91\pm 3,7\%$, $98\pm 2,3\%$ y $85\pm 2,2\%$, respectivamente), siendo estos valores superiores a los observados para el grupo que combinaba quitosano+EDTA ($51\pm 5,7\%$). Con respecto a las pérdidas fetales, no se observaron diferencias entre los grupos quitosano, EDTA y antibióticos ($35\pm 6,6\%$, $41\pm 8,4\%$ y $21\pm 6,3\%$ respectivamente), mostrando valores inferiores al grupo quitosano+EDTA ($51\pm 8,0\%$). En términos de animales nacidos, no se observaron diferencias entre los grupos quitosano, EDTA y antibióticos ($6,8\pm 1,20\%$, $6,7\pm 1,54\%$ y $8,7\pm 1,54\%$, respectivamente), siendo estos valores superiores a los observados para el grupo que combinaba quitosano+EDTA ($3,2\pm 1,09\%$). En conclusión, la adición de quitosano (0,05%) a un diluyente con la base TCG ejerció un efecto bacteriostático a lo largo del tiempo frente a *E. faecalis*, sin afectar a la motilidad y viabilidad espermática, demostrando una capacidad fecundante y de fertilidad y prolificidad similar a la del diluyente con presencia de antibióticos. En base a estos resultados la adición de quitosano (0,05%) podría ser una alternativa a los antibióticos en diluyentes de semen de conejo.

Palabras clave: Antimicrobiano; EDTA; Quitosano; Multirresistencia; Cunicultura

Title: Development of an antibiotic-free extender for artificial insemination in rabbits.

Abstract: The World Health Organization has recognized antibiotic-resistant bacteria as one of the top 10 public health threats. The misuse and overuse of antibiotics have led to the emergence of so-called multi-resistant bacteria. Combating antimicrobial resistance is a priority for the European Union (EU), which has established a common strategy to address this issue, with Spain being one of the EU countries that have used the most antibiotics. In 2014, Spain approved its first National Plan against Antibiotic Resistance (PRAN), whose main objective is the "Prevention of the need for the use of antibiotics." Artificial insemination (AI) is a crucial technology worldwide in livestock breeding, using fresh semen in approximately 90% of livestock reproduction in Europe. In more than 99% of cases, insemination is carried out with fresh and not frozen semen. Although semen is used as quickly as possible, it is necessary to store it for up to three days at 15-17°C. At this temperature, semen can suffer bacterial contamination, which breeders have been controlling with antibiotics. However, recent European guidelines indicate that the use of antibiotics in this field will soon be illegal. In this context, this study aimed to develop an antibiotic-free diluent for use in artificial insemination in rabbit farming. To this end, the antibacterial activity of chitosan (a natural biopolymer), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and the combination of both were evaluated, as well as their effect on sperm quality both in vitro and in vivo. Five diluents were prepared using TCG base diluent (250 mM tris-hydroxymethylaminomethane, 83 mM citric acid, 50 mM glucose, pH 6.8-7.0): (i) chitosan (0,05%), (ii) EDTA (20 mM), (iii) chitosan + EDTA (0,05% and 20 mM, respectively), (iv) antibiotics (100 mg/mL penicillin + 100 mg/mL streptomycin), and (v) antibiotic-free. In the first experiment, the different diluents were infected with *Enterococcus faecalis* (10^3 CFU/mL) and refrigerated at 15°C for 72 hours, with bacterial counts (CFU/mL) taken at 0, 24, 48, and 72 hours. In a second study, ejaculates from adult males of proven fertility were obtained using an artificial vagina, generating heterospermic mixtures that were aliquoted with the different diluents. The semen samples were refrigerated at 15°C for 72 hours, and semen quality was assessed (motility using an image analysis program and viability using a membrane functionality fluorescent test). Finally, a third experiment was conducted in which 42 females were inseminated with the different diluents, determining fertilization capacity, embryonic losses, implantation rate, fetal losses, fertility, and litter size. In Experiment 1, it was observed that the chitosan diluent had a similar behavior to the antibiotic diluent, an effect that was maintained throughout refrigeration ($p > 0.05$). The presence of EDTA or the combination of chitosan+EDTA showed greater growth of *Enterococcus faecalis*. In Experiment 2, the sperm motility of the chitosan diluent was similar to that observed in the antibiotic diluent throughout refrigeration (24, 48, and 72 hours). The presence of EDTA or the combination of chitosan+EDTA showed a negative effect, significantly reducing motility. In terms of viability, no significant differences were observed between diluents at any of the refrigeration times. Finally, artificial insemination with the different diluents showed no differences between diluents in terms of fertilizing capacity, except for the antibiotic-free diluent, whose fertilizing capacity was reduced to approximately 34%. In terms of embryonic losses, the EDTA group showed the lowest value ($2 \pm 2,3\%$), with no differences observed between the chitosan and antibiotic groups ($9 \pm 3,7\%$, $21 \pm 6,3\%$, respectively), these values being lower

than those observed for the chitosan+EDTA group (49±5,7%). Regarding implantation rate, no differences were observed between the chitosan, EDTA, and antibiotic groups (91±3,7%, 98±2,3%, and 85±2,2%, respectively), these values being higher than those observed for the chitosan+EDTA group (51±5,7%). As for fetal losses, no differences were observed between the chitosan, EDTA, and antibiotic groups (35±6,6%, 41±8,4%, and 21±6,3%, respectively), with values lower than the chitosan+EDTA group (51±8,0%). In terms of animals born, no differences were observed between the chitosan, EDTA, and antibiotic groups (6,8±1,20%, 6,7±1,54%, and 8,7±1,54%, respectively), these values being higher than those observed for the chitosan+EDTA group (3,2±1,09%). In conclusion, the addition of chitosan (0,05%) to a TCG-based diluent exerted a bacteriostatic effect over time against *E. faecalis*, without affecting sperm motility and viability, demonstrating a fertilizing capacity and fertility and prolificacy similar to that of the diluent with antibiotics. Based on these results, the addition of chitosan (0,05%) could be an alternative to antibiotics in rabbit semen diluents.

Keywords: Antimicrobial; EDTA; Chitosan; Multidrug resistance; Rabbit farming

Títol: Desenvolupament d'un diluent lliure d'antibiòtics per a la inseminació artificial en conills.

Resum: L'Organització Mundial de la Salut ha reconegut les bacteris resistents als antibiòtics com una de les 10 principals amenaces per a la salut pública. L'ús incorrecte i l'abús dels antibiòtics han donat lloc a l'aparició de les denominades bacteris multiresistents. Combatre les resistències als antimicrobians és una prioritat per a la Unió Europea (UE), que ha establert una estratègia comuna per a abordar aquesta qüestió, amb Espanya sent un dels països comunitaris que més antibiòtics ha utilitzat. Espanya va aprovar en 2014 el seu primer Pla Nacional contra la Resistència als Antibiòtics (PRAN), l'objectiu principal del qual és la «Prevenició de la necessitat de l'ús d'antibiòtics». La inseminació artificial (IA) és una tecnologia crucial a nivell mundial en la cria de bestiar, utilitzant-se semen fresc en aproximadament el 90% de la reproducció de bestiar a Europa. En més del 99% dels casos, la inseminació es duu a terme amb semen fresc i no congelat. Encara que el semen s'utilitza tan ràpidament com sigui possible, és necessari emmagatzemar-lo fins a tres dies a 15-17°C. A aquesta temperatura, el semen pot patir contaminació bacteriana, que els criadors han estat controlant amb antibiòtics. No obstant això, les recents directrius europees indiquen que l'ús d'antibiòtics en aquest àmbit serà il·legal en un futur pròxim. En aquest context, aquest estudi va tenir com a objectiu el desenvolupament d'un diluent lliure d'antibiòtics per al seu ús en la inseminació artificial en cunicultura. Per a això, es va avaluar l'activitat antibacteriana del quitosà (biopolímer natural), àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA) i la combinació d'ambdós, així com el seu efecte sobre la qualitat espermàtica tant *in vitro* com *in vivo*. Per a això, amb la base del diluent TCG (250 mM tris-hidroximetilaminometà, 83 mM àcid cítric, 50 mM glucosa, pH 6.8-7.0) es van preparar 5 diluents: (i) quitosà (0,05%), (ii) EDTA (20 mM), (iii) quitosà + EDTA (0,05% i 20 mM, respectivament), (iv) antibiòtics (100 mg/mL penicil·lina + 100 mg/mL estreptomina) i (v) lliure d'antibiòtics. En un primer experiment, els diferents diluents van ser infectats amb *Enterococcus faecalis* (10^3 UFC/mL) i sotmesos a refrigeració a 15 °C durant 72 hores, realitzant un recompte bacterià (UFC/mL) a 0, 24, 48 i 72 hores de refrigeració. En un segon estudi, ejaculats de mascles adults de provada fertilitat van ser obtinguts mitjançant vagina artificial, generant mesclures heterospèrmiques que van ser al·quotades amb els diferents diluents. Les mostres seminals van ser refrigerades a 15 °C durant 72 hores, realitzant la valoració de la qualitat seminal (motilitat mitjançant un programa d'anàlisi d'imatge, i viabilitat mitjançant un test fluorescent de funcionalitat de membrana). Finalment, es va realitzar un tercer experiment en el qual es van inseminar 42 femelles amb els diferents diluents, determinant la capacitat de fecundació, les pèrdues embrionàries, la taxa d'implantació, les pèrdues fetals, la fertilitat i la mida de ventrada. En l'experiment 1 es va observar que el diluent amb quitosà presentava un comportament similar al diluent amb antibiòtics, efecte que es va mantenir al llarg de la refrigeració ($p > 0.05$). La presència d'EDTA o la combinació quitosà+EDTA presentaven un major creixement d'*Enterococcus faecalis*. En l'experiment 2, la motilitat espermàtica del diluent amb quitosà va ser similar a la observada en el diluent amb antibiòtics al llarg de la refrigeració (24, 48 i 72 hores). La presència d'EDTA o la combinació quitosà+EDTA van mostrar un efecte negatiu, reduint-

se significativament la motilitat. En termes de viabilitat, no es van observar diferències significatives entre diluents a cap de les hores de refrigeració. Finalment, la inseminació artificial amb els diferents diluents va mostrar que no hi havia diferències entre els diluents en quant a la capacitat fecundant, a excepció del diluent sense antibiòtics la capacitat fecundant del qual es va veure reduïda al 34% aproximadament. En termes de pèrdues embrionàries, el grup EDTA va mostrar el valor més baix ($2\pm 2,3\%$), no es van observar diferències entre els grups quitosà i antibiòtics ($9\pm 3,7\%$, $21\pm 6,3\%$ respectivament) sent aquests valors inferiors als observats per al grup quitosà+EDTA ($49\pm 5,7\%$). Quant a la taxa d'implantació, no hi va haver diferències entre els grups quitosà, EDTA i antibiòtics ($91\pm 3,7\%$, $98\pm 2,3\%$ i $85\pm 2,2\%$, respectivament), sent aquests valors superiors als observats per al grup que combinava quitosà+EDTA ($51\pm 5,7\%$). Pel que fa a les pèrdues fetals, no es van observar diferències entre els grups quitosà, EDTA i antibiòtics ($35\pm 6,6\%$, $41\pm 8,4\%$ i $21\pm 6,3\%$ respectivament), mostrant valors inferiors al grup quitosà+EDTA ($51\pm 8,0\%$). En termes d'animals nascuts, no es van observar diferències entre els grups quitosà, EDTA i antibiòtics ($6,8\pm 1,20\%$, $6,7\pm 1,54\%$ i $8,7\pm 1,54\%$ respectivament), sent aquests valors superiors als observats per al grup que combinava quitosà+EDTA ($3,2\pm 1,09\%$). En conclusió, l'addició de quitosà (0,05%) a un diluent amb la base TCG va exercir un efecte bacteriostàtic al llarg del temps enfront d'*E. faecalis*, sense afectar la motilitat i viabilitat espermàtica, demostrant una capacitat fecundant i de fertilitat i prolificitat similar a la del diluent amb presència d'antibiòtics. En base a aquests resultats, l'addició de quitosà (0,05%) podria ser una alternativa als antibiòtics en diluents de semen de conill.

Paraules clau: Antimicrobià; EDTA; Quitosà; Multiresistència; Cunicultura

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	LA CRISIS DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS.....	1
1.2.	FUNDAMENTOS PARA ABORDAR LAS RESISTENCIAS BACTERIANAS	2
1.3.	USO DE LOS ANTIBIÓTICOS EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.....	3
1.4.	ESTRATEGIAS DE SUSTITUCIÓN AL USO DE ANTIBIÓTICOS EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL	5
1.5.	INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CUNICULTURA.....	6
2.	OBJETIVOS	9
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1.	ÉTICA.....	10
3.2.	EXPERIMENTO 1: EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i>	10
3.2.1.	AISLAMIENTO DE <i>ENTEROCOCCUS</i>	10
3.2.2.	EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE QUITOSANO Y EDTA CONTRA <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>	10
3.2.3.	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUITOSANO Y EDTA SOBRE LA CALIDAD SEMINAL 12	
3.3.	EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i>	14
3.3.1.	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUITOSA Y EDTA SOBRE LA CAPACIDAD FECUNDANTE.....	14
3.3.2.	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUITOSANO Y EDTA SOBRE LA FERTILIDAD Y PROLIFICIDAD	15
3.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	15
4.	RESULTADOS	17
4.1.	EXPERIMENTO 1: EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i>	17
4.1.1.	AISLAMIENTO DE <i>ENTEROCOCCUS</i>	17
4.1.2.	EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE QUITOSANO Y EDTA CONTRA <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>	17
4.1.3.	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUITOSANO Y EDTA SOBRE LA CALIDAD SEMINAL 18	
4.2.	EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i>	28
4.2.1.	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUITOSANO Y EDTA SOBRE LA CAPACIDAD FECUNDANTE.....	28
4.2.2.	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUITOSANO Y EDTA SOBRE LA FERTILIDAD Y PROLIFICIDAD	29
6.	CONCLUSIONES	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Resumen de los mecanismos de resistencia a los antibióticos. Creado con BioRender.com	3
Figura 2: Procedimiento experimental para el ensayo microbiológico de las sustancias antimicrobianas. Creado con BioRender.com	12
Figura 3: Procedimiento experimental para el estudio de la calidad seminal de las diferentes muestras. Creado con BioRender.com	14
Figura 4: Motilidad espermática 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, 72 horas).....	18
Figura 5: Velocidad curvilínea (VCL) de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48,72 horas).....	19
Figura 6: Velocidad en línea recta (VSL) de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48,72 horas).	20
Figura 7: Velocidad media de trayectoria (VAP) de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48,72 horas)..	21
Figura 8: Coeficiente de linealidad (LIN) de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48,72 horas).	22
Figura 9 : Coeficiente de rectitud (STR) de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48,72 horas).	23
Figura 10: Coeficiente de oscilación (WOB) de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48,72 horas).	24
Figura 11: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48,72 horas).....	25
Figura 12: Frecuencia cruzada de batidos (BCF) de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48,72 horas)..	26
Figura 13: Viabilidad espermática 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, 72 horas).....	27
Figura 14: Ovarios 72 horas después de la inseminación.	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Concentración de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en un medio compuesto por Tris-ácido cítrico-glucosa (TCG).....	11
Tabla 2: Recuento de UFC de las diversas sustancias antimicrobianas en un medio compuesto por Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) frente a <i>Enterococcus faecalis</i> a las 24, 48 y 72 horas de incubación.	17
Tabla 3: Capacidad de fecundación de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*).....	28
Tabla 4: Parámetros para la evaluación de la capacidad de fertilidad y prolificidad de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*).	30

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza

BCF: Frecuencia cruzada de latidos

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FAO: Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina

IA: Inseminación Artificial

LIN: Coeficiente de linealidad

MLG: Modelo Lineal Generalizado

OMS: Organización Mundial de la Salud

OMSA: Organización Mundial de Sanidad Animal

STR: Coeficiente de rectitud

TCG: tris-hydroxymethylaminometano, ácido cítrico y glucosa

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

UFC: Unidades formadoras de colonias

VAP: Velocidad media de trayectoria

VCL: Velocidad curvilínea

VSL: Velocidad en línea recta

Vol: Volumen

WOB: Coeficiente de oscilación

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA CRISIS DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

El descubrimiento del primer antibiótico a mediados del siglo XX cambió el rumbo de la medicina moderna, que pudo así comenzar a tratar la mayoría de las infecciones bacterianas, tanto en los seres humanos como en los animales (Hutchings et al., 2019). Desde entonces, los antibióticos han desempeñado un papel imprescindible en la salud humana y la producción ganadera, permitiendo el impulso del desarrollo socioeconómico (Kasimanickam et al., 2021). Los antibióticos han sido sumamente exitosos en mejorar la salud, de hecho junto con los avances en nutrición, acceso a agua potable, saneamiento y vacunación, han contribuido a reducir la mortalidad mundial en menores de 5 años, pasando de 216 muertes por cada 1000 nacidos vivos en 1950 a 39 muertes por cada 1000 nacidos vivos en 2017 (Browne et al., 2021). Durante aproximadamente 70 años, los antibióticos se han utilizado en la alimentación animal, no solo para tratar enfermedades, sino también como promotores del crecimiento, estimulando el crecimiento, mejorando la eficiencia alimentaria y reduciendo la mortalidad, lo que resulta en una mayor productividad. Estos compuestos mejoran el rendimiento del ganado mediante una conversión más eficiente de los piensos en productos animales, incrementando las tasas de crecimiento y los rendimientos de la producción (FAO, 2010). Sin embargo, el empleo descontrolado de los antibióticos ha dado lugar al aumento exponencial de la resistencia bacteriana a estos compuestos (Ding et al., 2023), por ello desde 2006 su empleo como profilácticos en el pienso está prohibido.

La resistencia a los antibióticos es un problema global que afecta a todos los habitantes del planeta en mayor o menor grado. La resistencia a los antibióticos se presenta cuando las bacterias se adaptan y crecen en presencia de estos. Aunque este problema ha sido observado desde que se descubrieron los antibióticos, su aparición va ligada a la frecuencia de su empleo. Para 2030, se prevé que el uso mundial de antimicrobianos tanto en humanos como en animales destinados a la producción de alimentos aumente a 236.757 toneladas anuales (Morrell et al., 2022). Este valor es significativamente elevado en comparación con estudios anteriores, ya que en 2018 el consumo mundial de antibióticos veterinarios fue de 76.704 toneladas (WOAH, 2022). Dado que muchos antibióticos pertenecen a la misma clase de medicamentos, la resistencia a un agente antibiótico concreto puede llevar a la resistencia a toda una clase (Organización Mundial de la Salud, WHO de sus siglas en inglés, 2016). Sin embargo, aunque el vínculo entre el uso de antimicrobianos y la resistencia parece claro, esta asociación es compleja. No se puede adoptar un enfoque uniforme para comprender la resistencia, ya que hay diversos factores que intervienen. Estos factores incluyen las interacciones patógeno-fármaco, las interacciones patógeno-huésped, las tasas de mutación del patógeno, la aparición de clones resistentes a los antimicrobianos con éxito, las tasas de transmisión de patógenos entre los seres humanos, los animales y el medio ambiente y la resistencia cruzada (Holmes et al., 2016). Hoy por hoy, el desarrollo de bacterias resistentes a este

tipo de medicamentos constituye una de las amenazas más serias para la salud pública; las bacterias multirresistentes causan 33.000 muertes al año en Europa (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2015) y alrededor de 700.000 en todo el mundo (Dadgostar, 2019). Esto ha llevado a la Organización Mundial de la Salud (WHO, de sus siglas en inglés) a declarar esta situación como uno de los diez principales desafíos a los que se enfrenta la salud pública (WHO, 2021).

Un ejemplo representativo de este tipo de bacterias es el género *Enterococcus* spp. La relevancia clínica de esta especie está directamente relacionada con su resistencia a los antibióticos, lo cual aumenta el riesgo de colonización e infección (Kristich et al., 2014). Los *Enterococcus* multirresistentes representan patógenos nosocomiales de gran importancia y constituyen un desafío clínico cada vez mayor. Estos organismos han desarrollado resistencia a prácticamente todos los antimicrobianos utilizados en la práctica clínica actual, empleando una variedad de estrategias genéticas (Miller et al., 2014). De hecho, los *Enterococcus* son parte del grupo de organismos ESKAPE (*Enterococci* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.), identificados por la WHO como causas emergentes de infecciones nosocomiales y resistentes a los antibióticos. En las últimas décadas, estos patógenos han representado una creciente amenaza para la salud pública debido a su resistencia antimicrobiana (Bereanu et al., 2024).

1.2. FUNDAMENTOS PARA ABORDAR LAS RESISTENCIAS BACTERIANAS

Comprender la base científica de la resistencia a los antimicrobianos es esencial para combatir la amenaza que supone para la salud pública (Marco-Fuertes et al., 2022). Esta comprensión debe abarcar varios conceptos, por un lado, los mecanismos de resistencia, los cuales permitan enfoques novedosos para el diagnóstico y la terapia (Figura 1), y por otro, descifrar los factores que provocan la resistencia a los antimicrobianos en la sociedad y el medio ambiente, lo cual es esenciales para el desarrollo de políticas de intervención adecuadas (Holmes et al., 2016).

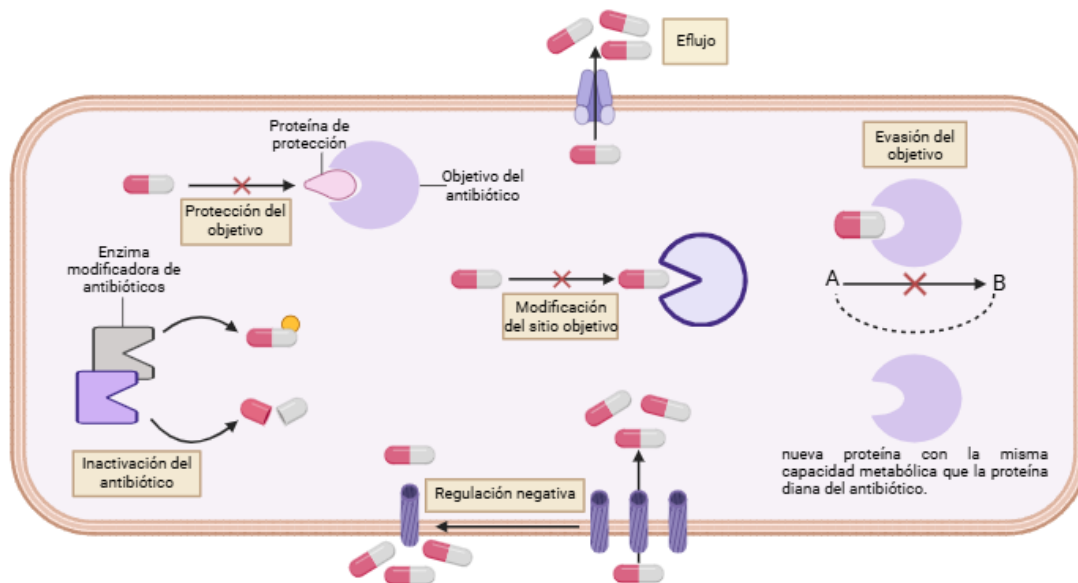


Figura 1: Resumen de los mecanismos de resistencia a los antibióticos. Los mecanismos de resistencia a los antibióticos incluyen la degradación enzimática o modificación de la molécula del antibiótico, la alteración del sitio objetivo del antibiótico, la evasión del objetivo mediante el uso de nuevas proteínas donde la función del objetivo del antibiótico es llevada a cabo por una nueva proteína que no es inhibida por el antibiótico, lo que hace redundante el objetivo original y el antibiótico ineficaz., la disminución del flujo de entrada del antibiótico y el aumento del eflujo activo fuera de la célula bacteriana. También se puede lograr resistencia mediante la protección del objetivo del antibiótico gracias a una asociación física con una proteína de protección específica Adaptado de Darby et al. (2023). Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

Los genes de resistencia adquirida pueden transferirse entre bacterias, lo que permite que las bacterias prosperen en un entorno que de otro modo sería tóxico. Los principales medios horizontales de transmisión en la naturaleza son la conjugación, la transducción y la transformación. Una vez adquiridos, los genes de resistencia se transmiten verticalmente durante la división celular (Lerminiaux & Cameron, 2019). Existen diferentes categorías de resistencia: las bacterias con resistencia adquirida a sustancias antimicrobianas de tres o más clases de antibióticos se conocen como multirresistentes; si son susceptibles a una o dos sustancias antimicrobianas, se definen como extremadamente resistentes a los medicamentos; las bacterias que no son susceptibles a ninguno de los agentes de todas las clases de antimicrobianos son panresistentes (Malaluang et al., 2021).

No existe una solución única y se necesitarán varios enfoques sinérgicos, superpuestos y complementarios, con un fuerte objetivo general compartido para garantizar y mantener el acceso a terapias antimicrobianas eficaces (OMS, 2023).

1.3. USO DE LOS ANTIBIÓTICOS EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Un área en la que se utilizan cantidades significativas de antibióticos es en la inseminación artificial (IA), ya que las regulaciones estipulan que los antibióticos deben agregarse a las dosis de semen para el comercio internacional, lo que contradice las

recomendaciones actuales sobre el uso prudente de sustancias antimicrobianas (Morrell et al., 2022).

Las bacterias de la piel y del entorno del animal colonizan la mucosa del tracto reproductor distal y se transfieren al semen durante la eyaculación. La IA se realiza cada vez más con semen refrigerado transportado a otras instalaciones (Malaluang et al., 2021), lo que permite tiempo adicional para que los microorganismos crezcan a medida que el semen se procesa y enfría. Por lo tanto, la carga bacteriana puede ser considerablemente mayor en el momento de la IA que inmediatamente después de la recolección del semen.

Las bacterias no solo compiten con los espermatozoides por los nutrientes, podrían producir subproductos metabólicos y toxinas, reduciendo así la "vida útil" de las dosis seminales (Morrell & Wallgren, 2014). Por lo tanto, la calidad del esperma puede disminuir en presencia de bacterias. De hecho, se demostró que las bacterias en el semen se asocian negativamente con la calidad espermática y la fertilidad (Kuster & Althouse, 2016). La influencia de las bacterias uropatógenas grampositivas en la morfología y función de los espermatozoides ha sido poco investigada hasta ahora. Mehta et al. (2002) demostraron que los cocos aerobios están presentes en aproximadamente el 50% de las muestras de semen en parejas infértiles. De hecho, *Enterococcus faecalis* (*E. Faecalis*) ha sido aislado en el 53% de los pacientes que presentan infertilidad (Moretti et al., 2009). El aumento de la prevalencia de infecciones del tracto genital causadas por *E. faecalis* se asocia con una calidad seminal comprometida en términos de concentración y morfología de los espermatozoides (Moretti et al., 2009).

Para intentar solventar esta situación, la adición de antibióticos en los diluyentes de semen ya sea en la industria humana o ganadera, está sujeta a una estricta regulación por parte de directivas gubernamentales nacionales e internacionales (Reglamento (UE) 2019/6 del Parlamento Europeo y del Consejo). Por ello, existe una tendencia a utilizar un cóctel de antibacterianos de amplio espectro y muy potentes, cada uno a una concentración más baja de lo que se requeriría individualmente, en un esfuerzo por reducir la toxicidad de los espermatozoides. Las sustancias antibióticas que se utilizan con mayor frecuencia en los diluyentes seminales incluyen los β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas), cuyo mecanismo de acción radica en la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, lo que conduce a la lisis celular y la muerte (Ďuračka et al., 2023). Otros de los antibióticos que más se emplean, son los inhibidores de la síntesis de proteínas bacterianas como aminoglucósidos (estreptomina, gentamicina, kanamicina), lincosamidas (lincomicina) o macrólidos (tilosina, tilmicosina, espectinomicina) (Ďuračka et al., 2023). Sin embargo, existe una gran variación entre las diferentes especies animales con respecto a los tipos de antimicrobianos y las dosis añadidas a los diluyentes utilizados tanto para los procedimientos de enfriamiento como de congelación del semen (Santos et al., 2020).

Sin embargo, incluso una pequeña cantidad de cada antibiótico puede resultar en el desarrollo de resistencia a los antibióticos dentro de una especie animal. En este sentido,

estudios previos demostraron que la presencia de antibióticos en el diluyente seminal puede afectar negativamente a la calidad del esperma (motilidad, morfología y mayor índice de fragmentación del ADN) durante el almacenamiento refrigerado (Jasko et al., 1993; Al-Kass et al., 2019). Además, esta práctica contrasta con las recomendaciones actuales para el uso prudente de antibióticos (Morrell et al., 2022).

1.4. ESTRATEGIAS DE SUSTITUCIÓN AL USO DE ANTIBIÓTICOS EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Encontrar alternativas a los antibióticos para controlar los microorganismos en las dosis seminales para la IA sería beneficioso tanto para mejorar la calidad y la supervivencia de los espermatozoides como para retrasar el desarrollo de resistencia a los antibióticos (Morrell & Wallgren, 2014).

Schulze et al. (2016) definieron los criterios que debe cumplir un posible aditivo espermático para ser considerado como una alternativa antimicrobiana. Estos incluyen tener una acción antimicrobiana de amplio espectro, ausencia de toxicidad en los espermatozoides, no interferir con la fertilidad, alta estabilidad, alta actividad a temperaturas comunes de almacenamiento de semen, bajo potencial para evocar resistencia bacteriana, facilidad de aplicación y viabilidad económica (Schulze et al., 2016).

Se han investigado algunas alternativas a los antibióticos convencionales en el diluyente seminal, como la centrifugación coloidal (Martínez-Pastor et al., 2021) o la extracción de plasma seminal, en diferentes especies (Ramires Neto et al., 2015). Sin embargo, estas técnicas implican un aumento en el tiempo de procesamiento del semen. Otros enfoques para superar el crecimiento bacteriano son los compuestos bioactivos que pueden mejorar el medio oxidativo del semen almacenado, prolongando así la supervivencia de los espermatozoides en semen (Santos et al., 2020). Los flavonoides son la clase más importante de compuestos fenólicos que ejercen una actividad antibacteriana extraordinaria contra cepas bacterianas multirresistentes (Shamsudin et al., 2022). Además, los extractos de plantas también mostraron efectos favorables sobre el semen almacenado (Cojkic et al., 2023). A lo largo de la historia de la humanidad, los extractos de plantas se han utilizado en la medicina, la industria farmacéutica y la nutrición, así como con fines cosméticos y de otro tipo (Giannenas et al., 2019). La principal actividad farmacológica de las plantas proviene de sus metabolitos secundarios; terpenoides, como compuestos fenólicos, alcaloides y compuestos que contienen azufre, los cuales también protegen a la propia planta contra posibles patógenos (A. Hussein & A. El-Anssary, 2019). Además de esta actividad antimicrobiana, los fitoquímicos poseen numerosas características como antioxidantes, propiedades antivirales, antiparasitarias, antitumorales, antiinflamatorias y analgésicas (Guerrero et al., 2018). Los aceites esenciales pueden afectar la estructura y la función de las bacterias, entre otras cosas, interfiriendo con las membranas citoplasmáticas y disminuyendo la síntesis de ATP (Nazzaro et al., 2013).

Un ejemplo representativo es el quitosano, un producto de origen natural que se puede aplicar en muchas áreas debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y propiedades no tóxicas (Rizeq et al., 2019). La actividad antimicrobiana de amplio espectro del quitosano ofrece un gran potencial para este producto (Ke et al., 2021). Los investigadores han propuesto varios mecanismos para explicar la actividad antibacteriana del quitosano. Entre ellas, las interacciones electrostáticas con los compuestos de la pared celular y la disrupción de la membrana externa se han identificado como las vías más probables (Mirbagheri et al., 2023). El quitosano puede interactuar con los fosfolípidos y las proteínas de la membrana plasmática, lo que altera la integridad de la membrana (Hosseinnejad & Jafari, 2016). Además, se ha observado que el quitosano afecta la integridad de la pared celular (Guarnieri et al., 2022). Estos efectos combinados contribuyen a la actividad antimicrobiana del quitosano contra las bacterias (Mirbagheri et al., 2023). Se ha observado que la presencia de nanopartículas de quitosano no tuvo ningún efecto sobre la motilidad total, la integridad del acrosoma, la funcionalidad de la membrana o la viabilidad de los espermatozoides. A las 24, 48 y 72 horas, las características de calidad se mantuvieron en todos los grupos, sin diferencias significativas (Viudes-De-Castro et al., 2021).

Otros enfoques para controlar el crecimiento bacteriano incluyen el uso de moléculas activas como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), un agente quelante que exhibe una alta afinidad por los iones metálicos y una alta densidad de ligandos, la unión se produce típicamente a través de sus dos grupos amino y cuatro carboxilatos (Umerska et al., 2018). El EDTA ha demostrado incrementar la permeabilidad de la pared celular externa en bacterias gramnegativas, lo que facilita el acceso de otras moléculas a la célula (Gil et al., 1994). Esto puede conducir a una alteración o inhibición más eficaz de su metabolismo al permitir que compuestos específicos penetren más fácilmente en la célula bacteriana (Viudes-De-Castro et al., 2021). Los experimentos con el ligando quelante de amplio espectro EDTA sugieren que daña a *Escherichia coli* al interrumpir la permeabilidad de la membrana, posiblemente a través del secuestro de iones Ca^{2+} y Mg^{+} (Paterson, 2021). Varios estudios demuestran que existe una actividad inhibitoria del EDTA contra bacterias gramnegativas (*Escherichia Coli*), bacterias grampositivas (*Staphylococcus*) y hongos (*Candida spp.*) (Gil et al., 1994; Root, et al., 1988). Además, se ha evidenciado que la sustitución de antibióticos en los diluyentes actuales por EDTA y bestatina previene el crecimiento bacteriano a lo largo de 72 h en las dosis seminales de conejo (Viudes-De-Castro et al., 2021).

1.5. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CUNICULTURA

La primera persona en utilizar la IA en la cunicultura fue Bonadona en 1937, quien también desarrolló la primera vagina artificial para esta especie (Barrio et al., 2012). Podemos decir que el uso sistemático de la IA en la cría de conejos comenzó a finales de los años 80 en algunos países. Sin embargo, en España, su uso se retrasó hasta finales del siglo XX (Quintela et al., 2023). Esta técnica ha mejorado notablemente la producción cunícola, facilitando el desarrollo de nuevos sistemas de gestión reproductiva, utilizando semen de líneas genéticamente seleccionadas y, en algunos casos, contribuyendo a

mejorar la salud de las granjas (Viudes-De-Castro & Vicente, 2023). Además, la IA reduce la dependencia de los machos reproductores en la explotación ganadera (Morrell, 1995). A diferencia de la monta natural, con un solo eyaculado se puede inseminar a un número significativo de hembras, hasta 20, dependiendo de la cantidad de semen requerida para la inseminación y la cantidad recuperada del eyaculado (Morrell, 1995). En el caso del conejo, para obtener una tasa de fertilidad normal (66% a 80%) y prolificidad (de 8 a 9,5 gazapos al nacer), normalmente se utilizan de 16 a 20 millones de espermatozoides frescos por inseminación (Viudes-De-Castro & Vicente, 1997).

Los conejos alcanzan la madurez sexual entre los 4 y los 7 meses, dependiendo de la cepa. Las razas pequeñas (los Holandeses y Polacos) alcanzan la pubertad alrededor de los 4 meses; razas de tamaño mediano (Sandy Lop y New Zealand White), entre 4 y 6 meses; mientras que las razas más grandes (Flamencos) no alcanzan la madurez sexual hasta los 7 meses de edad. Los conejos son capaces de reproducirse durante varios años, sin embargo, con la edad tienden a disminuir tanto el tamaño de la camada, como la calidad del eyaculado (Morrell, 1995). Además, pertenece a las especies de ovulación inducida, lo que implica que la liberación de óvulos ocurre en respuesta a la estimulación física durante la cópula. En el contexto de la IA en esta especie, es necesario usar análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) para inducir la ovulación. Estos análogos pueden ser administrados de diversas formas, vía intramuscular, subcutánea, intravenosa o intravaginal (Viudes-de-Castro et al., 2023).

En el caso del conejo, el espermatozoide se introduce en la parte superior de la vagina. Como ocurre en otros mamíferos, la fecundación tiene lugar en el útero aproximadamente 14 horas después del apareamiento o la inseminación. Durante los primeros estadios del desarrollo embrionario antes de la implantación, este se encuentra influenciado por el ambiente del oviducto y del útero (Vicente, 2014). El uso de vagina artificial es el método más utilizado para la recogida del semen en conejo, ya que permite utilizar temperaturas (en torno a 50 °C) y presiones adecuadas para estimular la eyaculación de los machos (Morrell, 1995). A diferencia de otras especies, en general, la inseminación artificial en conejo se lleva a cabo con mezclas heteroespéricas (Vicente, 2014). Además, una práctica recomendable es la dilución 1:3-1:5 vol/vol del eyaculado inmediatamente después de la recolección. Procediendo tras su evaluación, al menos en términos de movilidad y porcentaje de espermatozoides anormales (Lavara et al., 2005), a su mezcla y dilución definitiva en función de la dosis espermática a utilizar y del período de almacenamiento. Un diluyente básico para IA está compuesto por un tampón orgánico como tris(hidroximetil)aminometano (Tris), ácido tris-etilendiaminotetraacético-dodecilsulfato de sodio (Tes) o citrato de sodio, para mantener el pH (6,8 a 7,2), azúcares como glucosa o fructosa como fuente de energía para mantener la capacidad de movimiento, solutos para ajustar el pH y la presión osmótica a 300 mOsm/kg y antibióticos para prevenir el crecimiento bacteriano (Viudes-De-Castro & Vicente, 2023).

Un aspecto clave de la IA es la criopreservación a largo plazo de los espermatozoides, la cual a menudo solo es posible de forma limitada debido a las diferentes criotolerancias en las especies animales (Wiebke et al., 2022). En el caso del conejo, el semen ha de ser

conservado en refrigeración, ya que existe una reducción global del porcentaje de espermatozoides móviles y viables tras someterlo a la criopreservación (Mocé & Vicente, 2009). El semen refrigerado permanece entre 15-18°C hasta su utilización. La perdurabilidad de este es función del genotipo, medio utilizado y calidad del eyaculado, oscilando entre las 24-72 horas. El inconveniente radica en que *Staphylococcus aureus* puede crecer en un rango de temperatura entre 15° y 45°C (Missiakas & Schneewind, 2013), los *Enterococcus* son bacterias mesófilas que pueden crecer entre 10°C y 45°C (Ben Braïek et al., 2019), de modo que durante el tiempo que mantengamos el semen refrigerado las bacterias van a continuar proliferando, lo que justifica la necesidad de incorporar antimicrobianos a los diluyentes (Viudes-De-Castro & Vicente, 2023).

2. OBJETIVOS

En este contexto, el objetivo general del presente estudio fue evaluar la capacidad antimicrobiana del quitosano y EDTA adicionados a un diluyente base de Tris-Citrato-Glucosa y determinar su efecto sobre la calidad seminal, así como la fertilidad y prolificidad. Para ello, se establecieron dos objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto antimicrobiano del quitosano (0,05%) y el EDTA (20 mM), así como la combinación de ambos, sobre *E. faecalis* y su influencia sobre la motilidad y la viabilidad espermática a lo largo de 72 horas de refrigeración.
2. Evaluar el efecto del quitosano (0,05%) y el EDTA (20 mM), y la combinación de ambos, sobre los parámetros reproductivos en condiciones de preparación de dosis comerciales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÉTICA

Este estudio se realizó bajo la Directiva 2010/63/UE EEC sobre el uso de animales en experimentación. El procedimiento experimental fue aprobado por el comité de ética de la Universitat Politècnica de València, con el código de autorización por el órgano competente: 2021-VSC-PEA-0270.

3.2. EXPERIMENTO 1: EVALUACIÓN *IN VITRO*

3.2.1. AISLAMIENTO DE *ENTEROCOCCUS*

Para la obtención de la bacteria diana para la determinación de la eficacia de los diferentes agentes antimicrobianos se emplearon 21 machos de probada fertilidad de la línea V, de los que se obtuvo 1 eyaculado mediante vagina artificial. Para la obtención de los microorganismos se llevó a cabo la separación de los espermatozoides y los microorganismos mediante una centrifugación en gradiente de densidades. Para ello, el eyaculado fue situado sobre 2 mL de una solución con densidad $\rho = 1,077$ g/ml (Capricorn Scientific) y se sometió a un periodo de centrifugación a 300 g durante 20 minutos. Posteriormente, 0.5 ml del sobrenadante fue transferido a un tubo con 2 mL de suero fisiológico y nuevamente centrifugados a 16400 rpm durante 10 minutos, descartando el sobrenadante para recuperar el pellet que contenía la población microbiana.

Para la obtención de las cepas de *Enterococcus* spp se empleó un cultivo convencional. Brevemente, las muestras obtenidas tras la centrifugación fueron pre-enriquecidas 1:10 vol/vol en agua de peptona tamponada (BPW, de sus siglas en inglés, Scharlau, Barcelona, España) e incubadas a $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Transcurridos este periodo, se realizó la siembra en agar no específico Columbia CNA con un 5% de sangre de oveja (BD, Becton Dickinson, Madrid, España) y se incubaron a $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24-48 horas. Las placas se examinaron a las 24 y 48 horas, y las colonias que mostraban características morfológicamente compatibles con *Enterococcus* spp. fueron sometidas a la prueba de catalasa y finalmente identificadas mediante prueba bioquímica (API-20STREP, bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia). Todas las cepas identificadas como *Enterococcus* spp. fueron almacenadas a -80°C para análisis posteriores.

3.2.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE QUITOSANO Y EDTA CONTRA *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana del quitosano y del EDTA, se seleccionó una de las cepas de *E. faecalis* almacenadas previamente. Para ello se prepararon 5 diluyentes con la base TCG (250 mM tris-hydroxymethylaminometano, 83 mM ácido cítrico, 50 mM glucosa, pH 6.8-7.0). Los diluyentes fueron: (i) quitosano (0.05%), (ii) EDTA

(20 mM), (iii) quitosano + EDTA (0.05% y 20 mM, respectivamente), (iv) antibióticos (100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomina) y (v) libre de antibióticos (Tabla 1).

Tabla 1: Concentración de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en un medio compuesto por Tris-ácido cítrico-glucosa (TCG).

Grupo	Concentración (mg/mL)
Quitosano	0.05%
EDTA	20 mM
Quitosano + EDTA	0.05% + 20 mM
Antibióticos	100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomina
	0

*TCG (250 mM tris-hydroxymethylaminometano, 83 mM ácido cítrico, 50 mM glucosa, pH 6.8-7.0) (Viudes-de-Castro, 1997).

Para la obtención del inóculo bacteriano se obtuvo una colonia a partir del cultivo de *E. faecalis* en 5 mL de agua de peptona (BPW; Scharlau, Barcelona, España) que fue sometida a incubación durante 4 horas a 37°C. Posteriormente se determinó la concentración mediante espectrofotometría (Eppendorf BioPhotometer), ajustando dicha concentración en base a densidad óptica (OD) a 0,2 a 600 nm, cuya equivalencia es de 10^8 unidades formadoras de colonias por mL (UFC/ml). A partir de esta determinación se realizaron diluciones seriadas (1:10 vol/vol) hasta la obtención de la concentración 10^3 UFC/mL. Dicha concentración fue la utilizada para determinar la actividad antimicrobiana en este experimento. Esta concentración fue seleccionada en función a estudios previos en los que se indicaba como la concentración presente en muestras seminales (Moreira et al., 2013; Goldberg et al., 2017). A cada uno de los diluyentes se le añadió el inóculo bacteriano (10^3 UFC/mL), realizando una dilución 1:5 vol/vol y procediendo a su refrigeración a 15°C durante 72 horas (Dometic Osaka OK15). A las 24, 48 y 72 horas de refrigeración se realizó un recuento en placa sembrando 100 µL de cada una de las muestras en una placa agar sangre (BD, Becton Dickinson, Madrid, España). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas, procediendo posteriormente al recuento de las UFC/ml. Se realizaron un total de 4 réplicas biológicas.

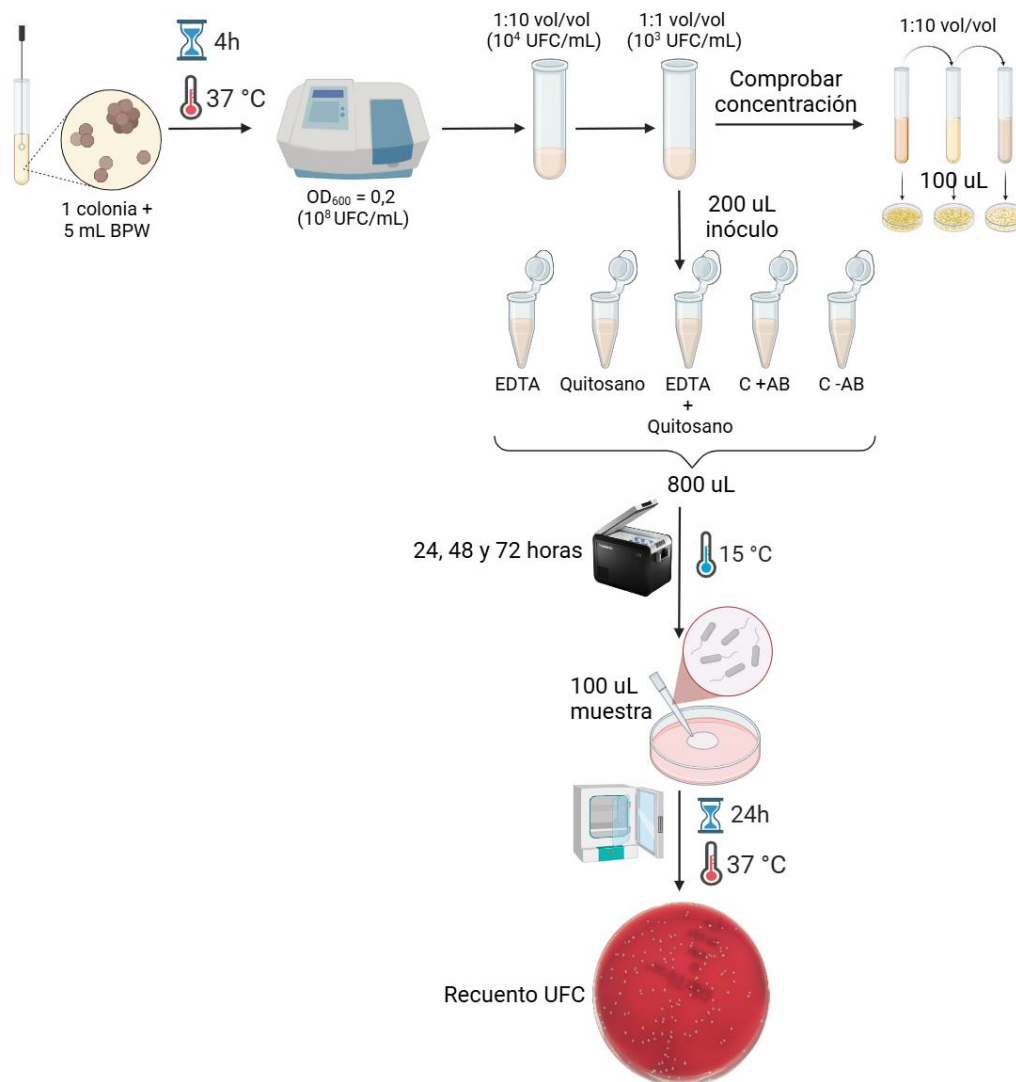


Figura 2: Procedimiento experimental para el ensayo microbiológico de las sustancias antimicrobianas. Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

3.2.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUITOSANO Y EDTA SOBRE LA CALIDAD SEMINAL

La determinación del efecto de los diferentes diluyentes sobre la calidad espermática se llevó a cabo mediante la determinación de la motilidad y viabilidad. Para ello se emplearon un total de 21 machos adultos (1-2 años) de probada fertilidad de los que se obtuvieron los eyaculados mediante el uso de la vagina artificial. Una vez obtenido el eyaculado, se examinaron macroscópicamente para descartar aquellas que mostraban signos de contaminación con orina (color amarillento). En primer lugar, se retiró el tapón de gel cuando este estaba presente en las muestras. Posteriormente, se llevó a cabo una mezcla heterospérmica de los eyaculados para generar una muestra única. Una vez obtenido la mezcla heterospérmica esta fue dividida en 5 alícuotas que fueron mezcladas con los distintos diluyentes descritos en la tabla 1 a una dilución 1:5 (vol/vol). Posteriormente, las muestras fueron refrigeradas a 15°C durante 72 horas (Dometic

Osaka OK15). A las 0, 24, 48 y 72 horas de refrigeración se realizó la valoración de la motilidad y viabilidad.

La motilidad espermática se evaluó mediante la determinación del porcentaje de células móviles totales, se midió mediante un sistema de análisis asistido por ordenador (ISAS Proiser, Valencia, España). Para ello, se utilizaron 10 mL de cada muestra y un microscopio óptico con contraste de fase negativa a 100 aumentos (Nikon Eclipse E200) y equipado con una placa termostataada (37 °C). Se capturaron 4 campos ópticos, evaluando un mínimo de 400 espermatozoides en total (Casares Crespo et al., 2016). Además, se determinaron los siguientes parámetros de la cinética del movimiento de los espermatozoides: velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidad en línea recta (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidad media 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; $\text{VSL}/\text{VAP} \times 100$), la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm) y la frecuencia cruzada de latidos (BCF, Hz) (Marco-Jiménez et al., 2020). Respecto a la determinación de la viabilidad espermática, esta se evaluó mediante la valoración de la integridad de la membrana de la cabeza (Agarwal *et al.*, 2022). Para ello, se utilizó el kit comercial LIVE/DEAD® Sperm Viability (L-7011, Invitrogen) que emplea dos colorantes fluorescentes que se unen al ADN, el SYBR-14 que es un fluoróforo permeable a las membranas, tiñendo el ADN de todas las células de color verde, y el yoduro de propidio que es un fluoróforo permeable únicamente a las células con la membrana dañada, tiñendo el ADN de estas células de color rojo. Para realizar este procedimiento se realizó una co-incubación de las muestras con ambos fluoróforos (SYBR-14 100 nM y IP 2.4 mM) en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, se procedió a contar en el microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioscope 5) un mínimo de 100 espermatozoides por muestra. Se realizaron un total de 8 réplicas biológicas.

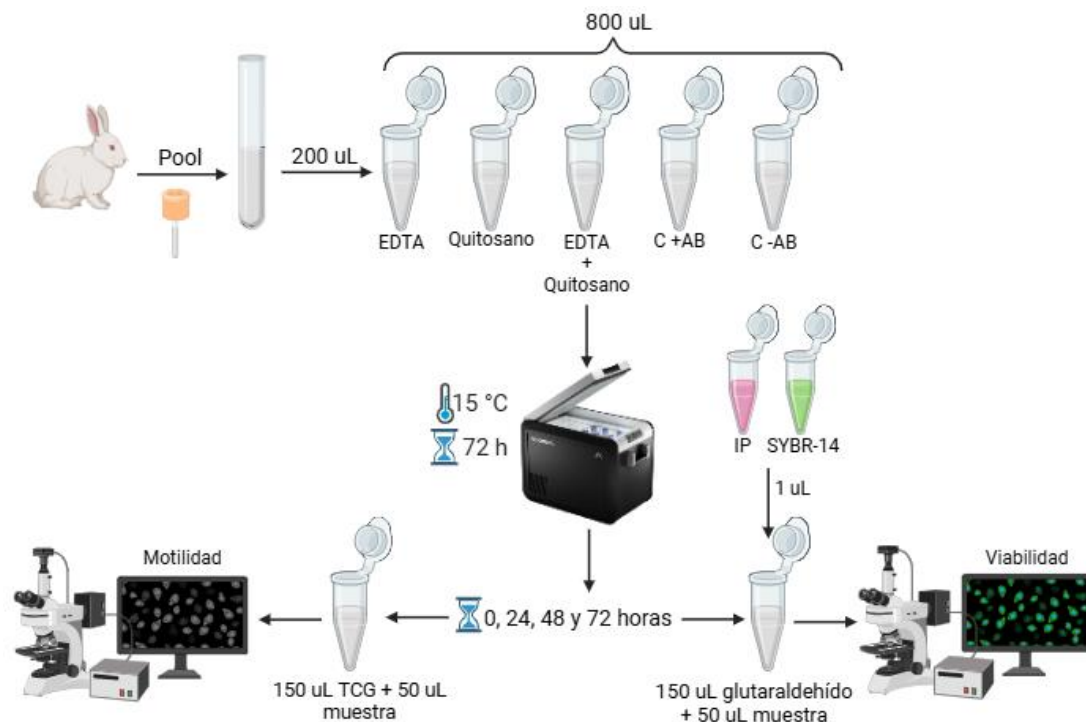


Figura 3: Procedimiento experimental para el estudio de la calidad seminal de las diferentes muestras. Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

3.3. EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN *IN VIVO*

3.3.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUITOSA Y EDTA SOBRE LA CAPACIDAD FECUNDANTE

La determinación del efecto de los diferentes diluyentes sobre la capacidad fecundante se llevó a cabo mediante una prueba de fecundación empleando hembras sometidas a un tratamiento de sobreestimulación ovárica. Para ello se emplearon 19 hembras multíparas que fueron asignadas aleatoriamente a uno de los 5 grupos experimentales. Todos los animales se encontraban alojados en jaulas individuales (87 x 40 cm), bajo las condiciones descritas previamente. Setenta y dos horas antes de la inseminación, se administró 0,75 mg/kg de la hormona corifolitropina alfa (FSH-CTP; Elonva) por vía intramuscular. Trascurrido este periodo, las hembras fueron inseminadas con muestras de semen obtenido y preparado tal y como se ha descrito anteriormente en el apartado 3.2.3, sometidas a un periodo de 24 horas de refrigeradas. Cada dosis contenía una concentración de 30 millones/ml en 0,5 mL de volumen que fue depositada utilizando cánulas curvas estándar (24 cm). En el momento de la inseminación se administró intramuscularmente 3 ug de acetato de buserilina (análogo de GnRH) para inducir la ovulación. Las dosis seminales se elaboraron con una mezcla heterospérmica con más del 70% de movilidad espermática y menos del 20% de espermatozoides anormales.

A las 72 horas tras la inseminación artificial, las hembras fueron eutanasiadas mediante una sobredosis de barbitúricos, recuperando el tracto reproductivo. En el momento de la recuperación se observó la tasa de ovulación contabilizando el número de cuerpos lúteos. Tras la perfusión de oviductos y de útero mediante una solución Dulbecco's

Phosphate Buffered Saline (DPBS) y 0,2% de albúmina de suero bovino se procedió al recuento de la tasa de recuperación global [formada por el conjunto de oocitos, embriones normales y anormales], embriones totales recuperados y embriones normales recuperados. Los embriones recuperados fueron catalogados basándose en criterios morfológicos, considerándose embriones normales aquellos embriones en estadio de mórula compactada o blastocisto temprano que presentaban una masa de células homogénea y ninguna anomalía en la cubierta de mucina y zona pelúcida.

3.3.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUITOSANO Y EDTA SOBRE LA FERTILIDAD Y PROLIFICIDAD

La determinación del efecto de los diferentes diluyentes sobre la fertilidad y prolificidad se llevó a cabo mediante la inseminación artificial convencional en un total de 23 hembras. Las hembras eran multíparas y fueron asignadas aleatoriamente a uno de los 4 grupos experimentales. Se descartó el diluyente sin antibióticos por cuestiones de salud animal. Todos los animales fueron alojados de forma similar a lo ya descrito anteriormente. Las hembras fueron sometidas a un tratamiento de sincronización 48 horas antes de la inseminación, mediante la administración de 12,5 UI de gonadotropina sérica equina (eCG) (Cuniser500, Hipra, Girona, España) vía intramuscular. Trascurrido este periodo, las hembras fueron inseminadas con muestras de semen obtenido y preparado tal y como se ha descrito anteriormente en el apartado 3.2.3, sometido a un periodo de 24 horas de refrigeración. Cada dosis contenía una concentración de 30 millones/ml en 0,5 mL de volumen que fue depositada utilizando cánulas curvas estándar (24 cm). En el momento de la inseminación se administró intramuscularmente 3 ug de acetato de buserilina (análogo de GnRH) para inducir la ovulación. Las dosis seminales se elaboraron con una mezcla heterospérmica en con más del 70% de movilidad espermática y menos del 20% de espermatozoides anormales.

Trascurridos 13 días, se realizó una laparoscopia para determinar la fertilidad, la tasa de ovulación y la tasa de implantación embrionaria. Brevemente, los animales fueron preanestesiados con una mezcla de xilazina (2,5 mg/kg) (Bayer AG, Leverkusen, Alemania) y clorhidrato de ketamina (12,5 mg/kg) (Imalgene 500, Merial SA, Lyon, Francia) por vía intramuscular, seguidamente se les administró por vía intravenosa 1 mL de clorhidrato de ketamina (25 mg/kg) (Imalgene 500, Merial SA, Lyon, France) para asegurar una anestesia total. Posteriormente, se empleó clorhidrato de buprenorfina (0,01 mg/kg) por vía subcutánea como analgésico, además se administró bencilpenicilina procaína monohidrato (18,7 mg/kg) y bencilpenicilina benzatina tetrahidrato (15,6 mg/kg), así como también meloxicam (0,5 mg/kg) (García-Dominguez et al., 2019). El día del parto se anotaron en número de gazapos nacidos. Además, se determinaron las pérdidas embrionarias, calculadas como el número de embriones implantados frente a la tasa de ovulación, y las pérdidas fetales, calculadas como el número de animales nacidos frente a los embriones implantados.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó un Modelo Lineal Generalizado (GLM, de sus siglas en ingles) para evaluar la actividad antimicrobiana del quitosano, EDTA, quitosano + EDTA, control con

antibióticos y control sin antibióticos frente a la concentración de *E. faecalis* (UFC/mL), la motilidad y los parámetros cinéticos, así como la viabilidad espermática y el tamaño de camada. Para la evaluación de la capacidad de fecundación, la fertilidad, la tasa de implantación y las pérdidas embrionarias y fetales se empleó también un GLM, asumiendo una distribución binomial (función de enlace probit). Los datos se presentan como medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de las medias de mínimos cuadrados (LSM \pm SEM). Una diferencia de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa. Los análisis se realizaron empleando el software comercial SPSS 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU., 2020).

4. RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTO 1: EVALUACIÓN *IN VITRO*

4.1.1. AISLAMIENTO DE *ENTEROCOCCUS*

Un total de 33,3% (7/21) de las muestras de semen analizadas resultaron positivas para la presencia de *E. faecalis*. De todas las cepas aisladas, una fue la seleccionada para la realización del estudio de la capacidad antimicrobiana a los diferentes agentes antimicrobianos utilizados en este estudio.

4.1.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE QUITOSANO Y EDTA CONTRA *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Tal y como se puede observar en la Tabla 2, el diluyente con quitosano presentó la misma capacidad frente a *E. faecalis* que el diluyente que incorpora antibióticos ($p > 0,05$) tanto a 24, 48 como 72 horas de refrigeración. Por el contrario, ni el diluyente con EDTA, ni el diluyente que contiene ambas sustancias parecen tener la capacidad de inhibir el crecimiento. En concreto, aunque a las 24 horas de refrigeración mostraban un crecimiento similar al del grupo sin antibióticos ($p > 0,05$), esta capacidad se pierde tanto a 48 como a 72 horas, llegando incluso en el caso específico del diluyente con EDTA a presentar un crecimiento superior al del diluyente sin antibióticos ($p < 0,05$).

Tabla 2: Recuento de UFC de las diversas sustancias antimicrobianas en un medio compuesto por Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) frente a *Enterococcus faecalis* a las 24, 48 y 72 horas de incubación. Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media.

Grupo	N	Tiempo de incubación (horas)		
		24	48	72
Quitosano	4	105,25 \pm 9,3 ^{ab}	64,25 \pm 8,8 ^b	39 \pm 7,9 ^{bc}
EDTA	4	128,33 \pm 10,8 ^a	133 \pm 10,17 ^a	106,3 \pm 7,9 ^a
EDTA + Quitosano	4	132,5 \pm 9,3 ^a	108 \pm 8,8 ^a	69,3 \pm 7,9 ^b
Sin antibióticos	4	126,25 \pm 9,3 ^a	73,75 \pm 8,8 ^b	60 \pm 7,9 ^b
Antibióticos	4	97,25 \pm 9,3 ^b	57,2 \pm 8,8 ^b	29 \pm 7,9 ^c

*TCG: 250 mM tris-hydroxymethylaminometano, 83 mM ácido cítrico, 50 mM glucosa, pH 6.8-7.0. EDTA: Quitosano: TCG suplementado con quitosano 0,05%, EDTA: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM, EDTA + Quitosano: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM y quitosano 0,05%, Sin antibióticos: diluyente TCG, Antibióticos: TCG suplementado con 100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomicina. N: Número de replicas. Los diferentes superíndices (a,b,c) indican diferencias estadísticamente significativas en la misma columna (mismo tiempo; $p < 0,05$).

4.1.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUITOSANO Y EDTA SOBRE LA CALIDAD SEMINAL

El resultado del análisis del efecto de quitosano y EDTa en el diluyente sobre la motilidad se muestra en la Figura 3. En ella se puede observar como el diluyente que contenía quitosano presentó unos valores similares a los del diluyente con antibióticos, efecto observado hasta las 72 horas ($p > 0,05$). En cambio, el diluyente con EDTa presentaba una pérdida de motilidad espermática desde la adición (tiempo 0, $p < 0,05$), efecto que se mantuvo a lo largo de las 72 horas de refrigeración ($p < 0,05$), comportamiento similar al diluyente que contenía la combinación de EDTa + quitosano ($p < 0,05$).

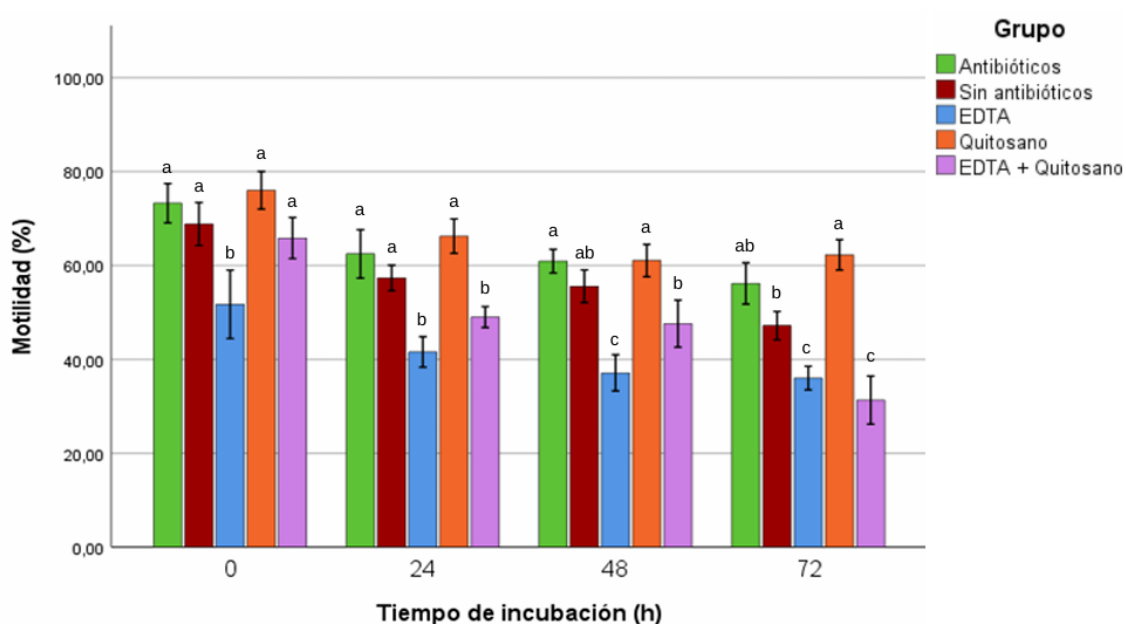


Figura 4: Motilidad espermática de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en un medio compuesto por Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48, 72 horas). El análisis se llevó a cabo con 8 mezclas heterospérmicas. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. *TCG: 250 mM tris-hydroxymethylaminometano, 83 mM ácido cítrico, 50 mM glucosa, pH 6.8-7.0. EDTa: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM, Quitosano: TCG suplementado con quitosano 0,05%, EDTa + Quitosano: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM y quitosano 0,05%, Sin antibióticos: diluyente TCG, Antibióticos: TCG suplementado con 100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomomicina. Los valores con superíndices distintos (a, b, c) indican diferencias en la motilidad de las muestras en el mismo momento ($p < 0,05$).

Al evaluar los diferentes parámetros cinéticos espermáticos, ninguno de los parámetros se vio afectado tras la adición de los diferentes diluyentes (tiempo 0). No se observaron variaciones entre los diluyentes para los parámetros VSL y VAP durante las 72 horas de refrigeración. Disminuyen progresivamente durante el período de incubación en todos los grupos (Figuras 6 y 7; $p > 0,05$). En cuanto a la VSL, el diluyente con EDTa presentó unos valores superiores a los observados en el diluyente con quitosano y con antibióticos a las 72 horas de refrigeración (Figura 5; $p < 0,05$).

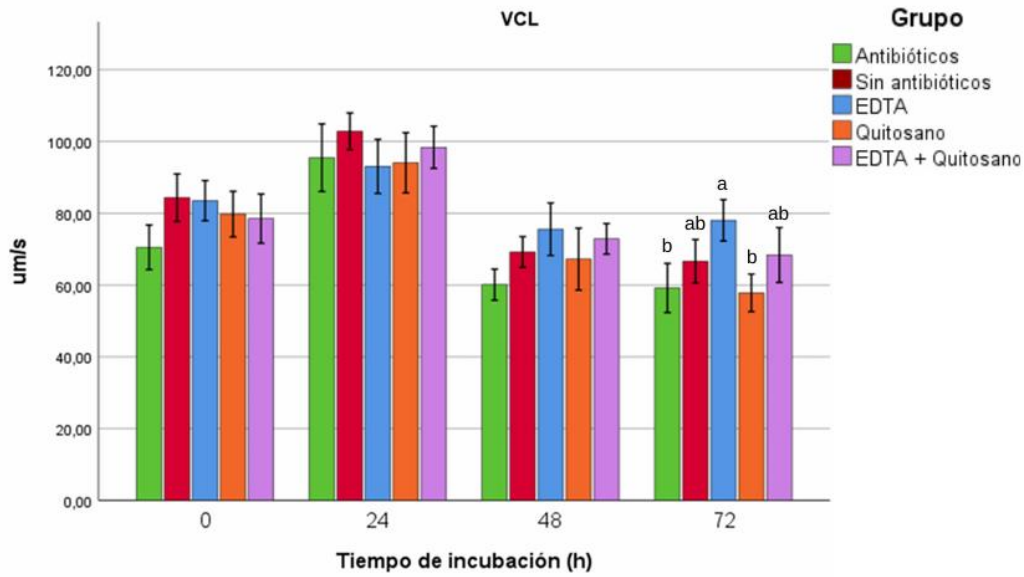


Figura 5: Velocidad curvilínea (VCL) de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48, 72 horas). El análisis se llevó a cabo con 8 mezclas heterospérmicas. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. *TCG: 250 mM tris-hydroxymethylaminometano, 83 mM ácido cítrico, 50 mM glucosa, pH 6.8-7.0. EDTA: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM, Quitosano: TCG suplementado con quitosano 0,05%, EDTA + Quitosano: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM y quitosano 0,05%, Sin antibióticos: diluyente TCG, Antibióticos: TCG suplementado con 100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomicina. Los valores con superíndices distintos (a, b) indican diferencias en la motilidad de las muestras en el mismo momento ($p < 0,05$).

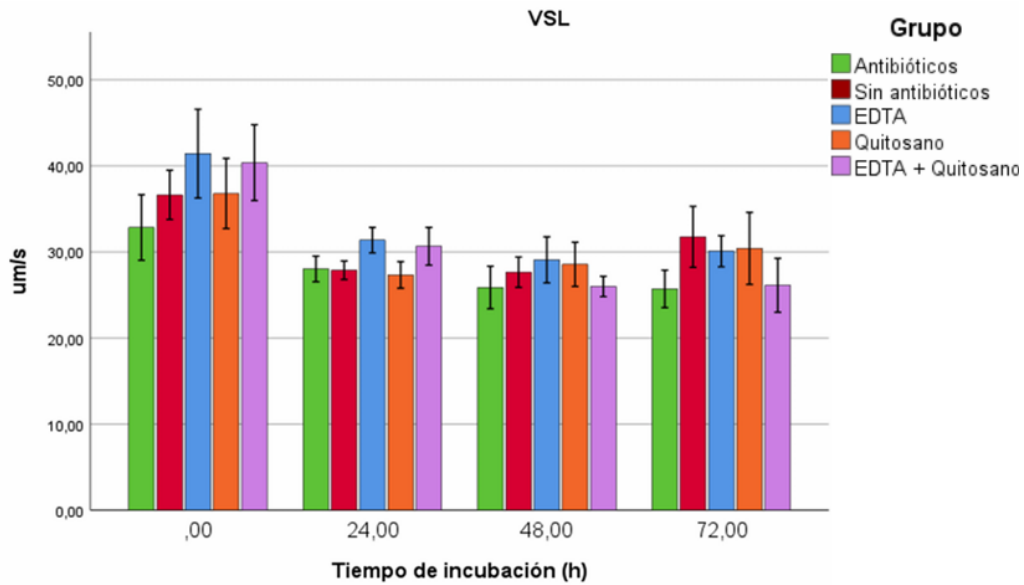


Figura 6: Velocidad en línea recta (VSL) de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48, 72 horas). El análisis se llevó a cabo con 8 mezclas heterospérmicas. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. *TCG: 250 mM tris-hydroxymethylaminometano, 83 mM ácido cítrico, 50 mM glucosa, pH 6.8-7.0. EDTA: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM, Quitosano: TCG suplementado con quitosano 0,05%, EDTA + Quitosano: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM y quitosano 0,05%, Sin antibióticos: diluyente TCG, Antibióticos: TCG suplementado con 100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomina.

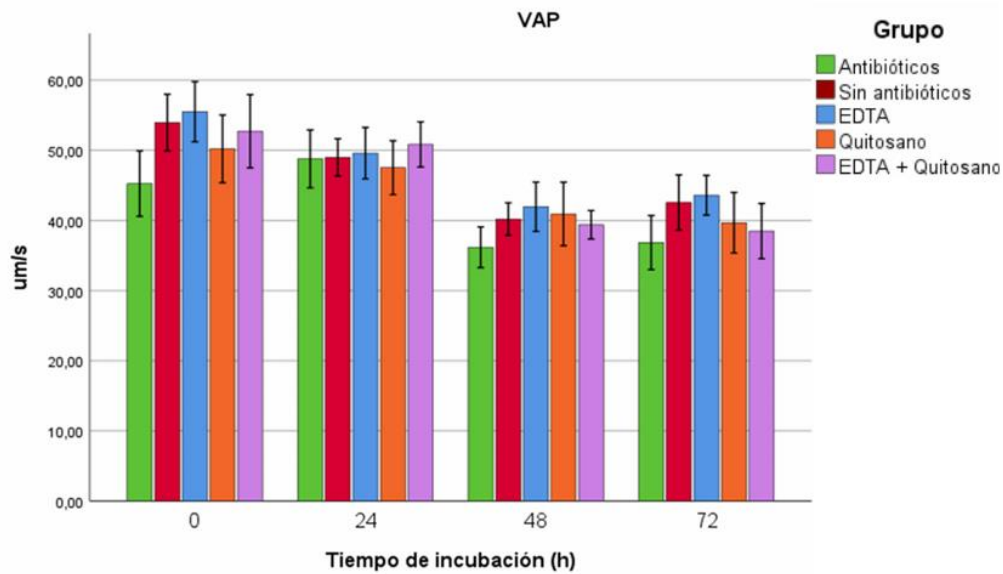


Figura 7: Velocidad media de trayectoria (VAP) de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48, 72 horas). El análisis se llevó a cabo con 8 mezclas heterospérmicas. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. *TCG: 250 mM tris-hydroxymethylaminometano, 83 mM ácido cítrico, 50 mM glucosa, pH 6.8-7.0. EDTA: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM, Quitosano: TCG suplementado con quitosano 0,05%, EDTA + Quitosano: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM y quitosano 0,05%, Sin antibióticos: diluyente TCG, Antibióticos: TCG suplementado con 100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomina.

El estudio de los índices LIN, STR y WOB no mostraron diferencias entre el diluyente con antibióticos y el resto de los diluyentes (Figuras 8, 9 y 10). No obstante, el diluyente con EDTA o la combinación de EDTA y quitosano mostraron valores ligeramente superiores al grupo tratado con quitosano ($p < 0,05$).

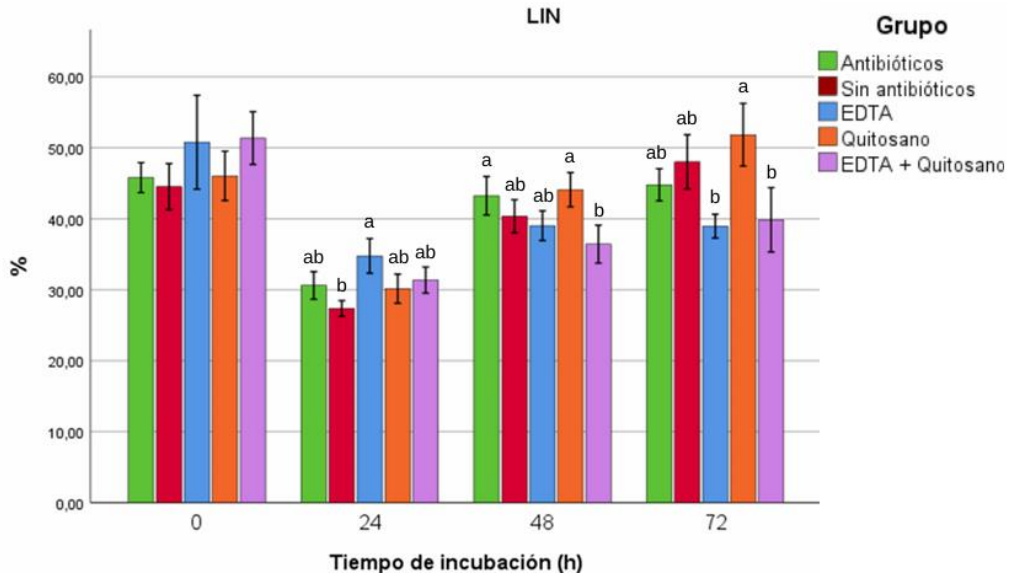


Figura 8: Coeficiente de linealidad (LIN) de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48, 72 horas). El análisis se llevó a cabo con 8 mezclas heterospérmicas. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. *TCG: 250 mM tris-hydroxymethylaminometano, 83 mM ácido cítrico, 50 mM glucosa, pH 6.8-7.0. EDTA: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM, Quitosano: TCG suplementado con quitosano 0,05%, EDTA + Quitosano: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM y quitosano 0,05%, Sin antibióticos: diluyente TCG, Antibióticos: TCG suplementado con 100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomicina. Los valores con superíndices distintos (a, b) indican diferencias en la motilidad de las muestras en el mismo momento ($p < 0,05$).

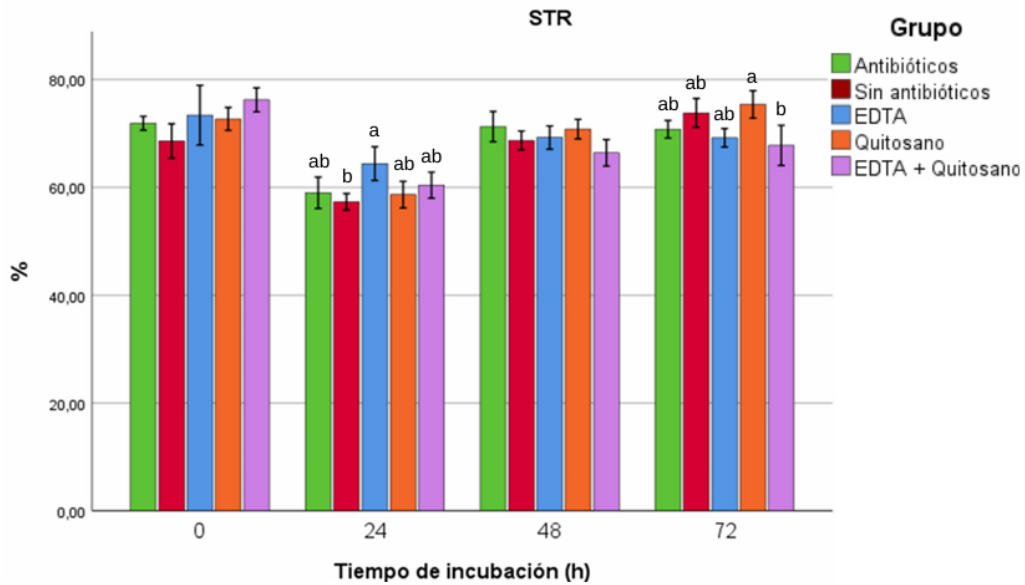


Figura 9 : Coeficiente de rectitud (STR) de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48,72 horas). El análisis se llevó a cabo con 8 mezclas heterospérmicas. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. *TCG: 250 mM tris-hydroxymethylaminometano, 83 mM ácido cítrico, 50 mM glucosa, pH 6.8-7.0. EDTA: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM, Quitosano: TCG suplementado con quitosano 0,05%, EDTA + Quitosano: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM y quitosano 0,05%, Sin antibióticos: diluyente TCG, Antibióticos: TCG suplementado con 100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomina. Los valores con superíndices distintos (a, b) indican diferencias en la motilidad de las muestras en el mismo momento ($p < 0,05$).

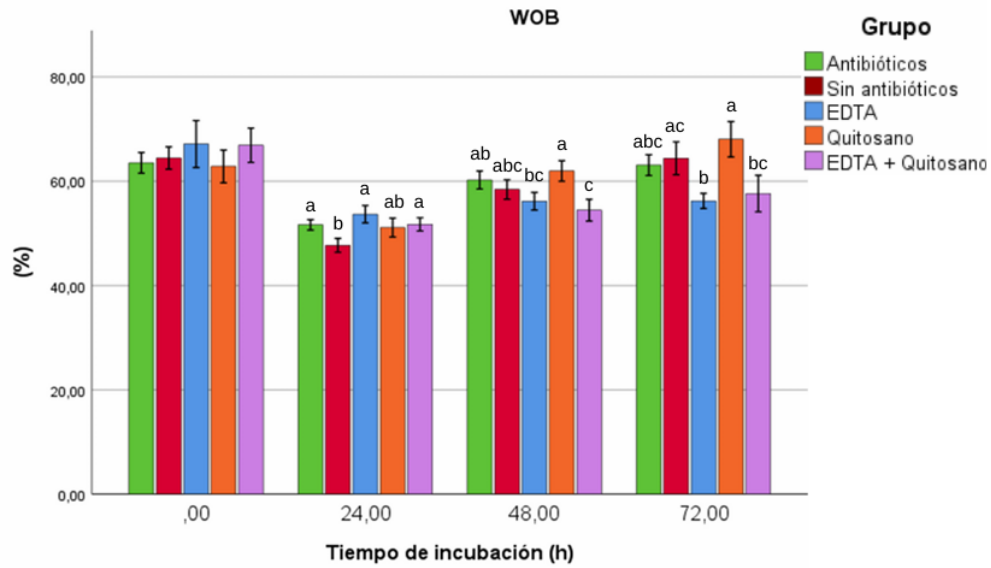


Figura 10: Coeficiente de oscilación (WOB) de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48, 72 horas). El análisis se llevó a cabo con 8 mezclas heterospérmicas. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. *TCG: 250 mM tris-hydroxymethylaminometano, 83 mM ácido cítrico, 50 mM glucosa, pH 6.8-7.0. EDTA: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM, Quitosano: TCG suplementado con quitosano 0,05%, EDTA + Quitosano: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM y quitosano 0,05%, Sin antibióticos: diluyente TCG, Antibióticos: TCG suplementado con 100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomina. Los valores con superíndices distintos (a, b, c) indican diferencias en la motilidad de las muestras en el mismo momento ($p < 0,05$).

En cuanto a los parámetros relacionados con el movimiento de la cabeza del espermatozoide, tanto ALH como BCF disminuyeron de manera progresiva durante el período de refrigeración (Figuras 11 y 12). Además, los diluyentes con EDTA y la combinación de EDTA y quitosano presentaron valores superiores al diluyente con antibióticos (Figura 11) ($p < 0,05$).

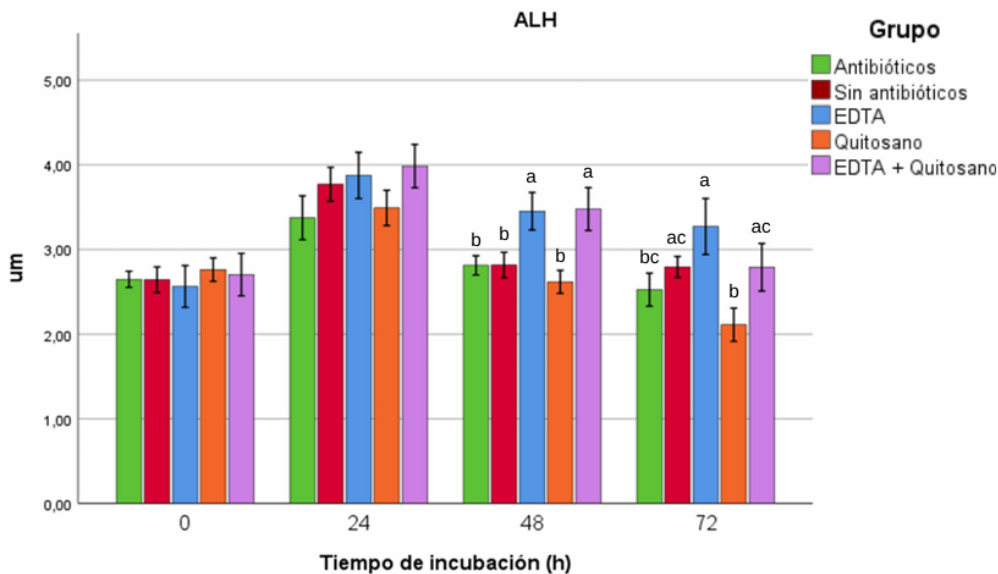


Figura 11: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48,72 horas). El análisis se llevó a cabo con 8 mezclas heterospérmicas. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. *TCG: 250 mM tris-hydroxymethylaminometano, 83 mM ácido cítrico, 50 mM glucosa, pH 6.8-7.0. EDTA: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM, Quitosano: TCG suplementado con quitosano 0,05%, EDTA + Quitosano: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM y quitosano 0,05%, Sin antibióticos: diluyente TCG, Antibióticos: TCG suplementado con 100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomicina. Los valores con superíndices distintos (a, b, c) indican diferencias en la motilidad de las muestras en el mismo momento ($p < 0,05$).

En el caso específico del BCF, sólo se observaron diferencias a las 24 y 48 horas de refrigeración. En concreto, el diluyente con EDTA presentó un valor menor que el diluyente con antibióticos a las 24 horas de refrigeración, mientras que este valor fue mayor que el diluyente con quitosano a las 48 horas de refrigeración (Figura 12) ($p < 0,05$).

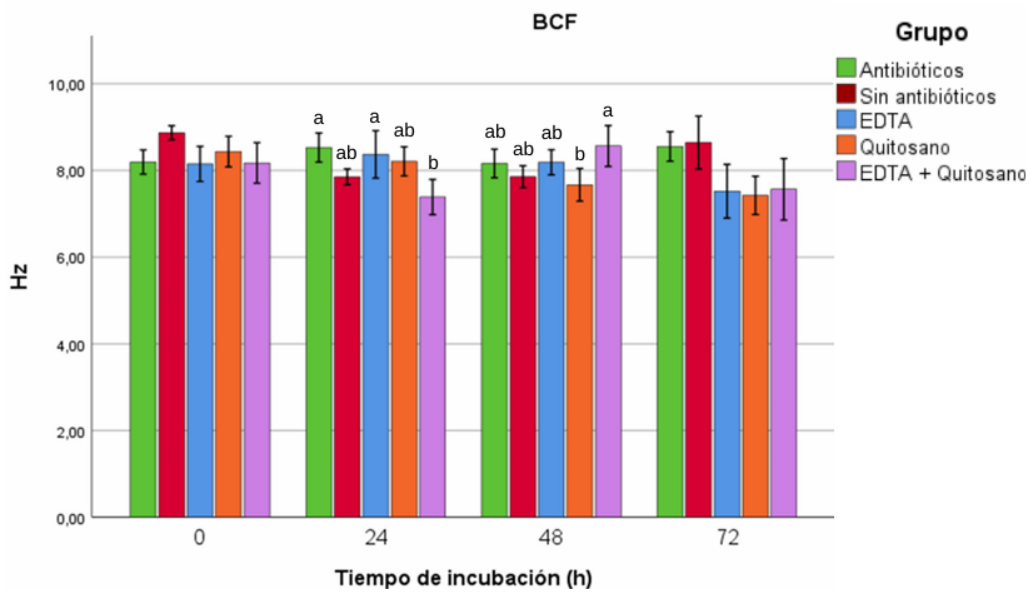


Figura 12: Frecuencia cruzada de batidos (BCF) de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48, 72 horas). El análisis se llevó a cabo con 8 mezclas heterospérmicas. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. *TCG: 250 mM tris-hydroxymethylaminometano, 83 mM ácido cítrico, 50 mM glucosa, pH 6.8-7.0. EDTA: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM, Quitosano: TCG suplementado con quitosano 0,05%, EDTA + Quitosano: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM y quitosano 0,05%, Sin antibióticos: diluyente TCG, Antibióticos: TCG suplementado con 100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomicina. Los valores con superíndices distintos (a, b) indican diferencias en la motilidad de las muestras en el mismo momento ($p < 0,05$).

Respecto a el efecto de los diluyentes sobre la viabilidad espermática observamos que ninguno de los diluyentes afectó a la viabilidad durante el periodo de refrigeración de 72 horas (Figura 13, $p > 0,05$).

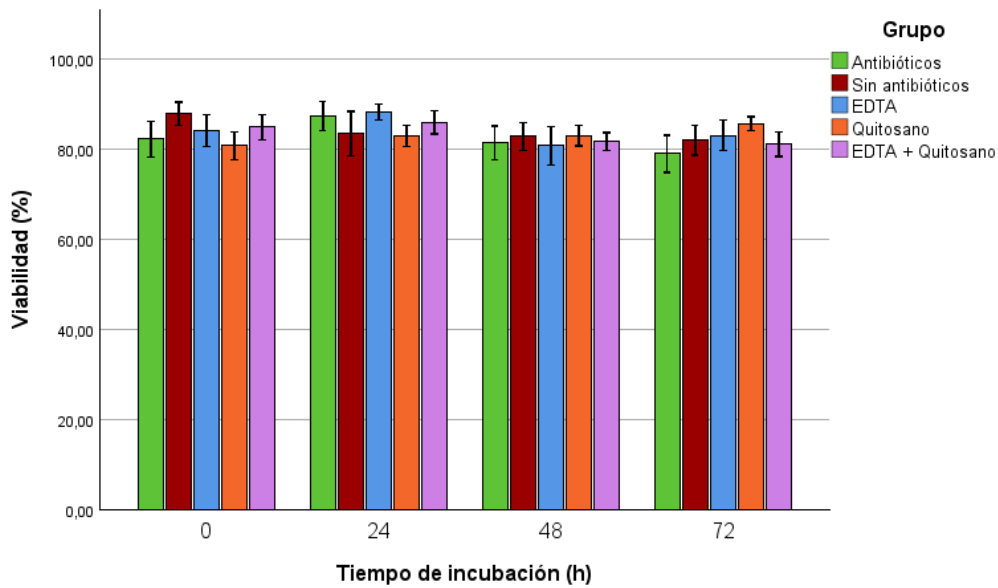


Figura 13: Viabilidad espermática de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en un medio compuesto por Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) a los diferentes tiempos de refrigeración (0, 24, 48, 72 horas). El análisis se llevó a cabo con 8 mezclas heterospérmicas. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. *TCG: 250 mM tris-hydroxymethylaminometano, 83 mM ácido cítrico, 50 mM glucosa, pH 6.8-7.0. EDTA: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM, Quitosano: TCG suplementado con quitosano 0,05%, EDTA + Quitosano: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM y quitosano 0,05%, Sin antibióticos: diluyente TCG, Antibióticos: TCG suplementado con 100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomina.

4.2. EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN *IN VIVO*

4.2.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUITOSANO Y EDTA SOBRE LA CAPACIDAD FECUNDANTE

Tras la recuperación de los embriones mediante la perfusión, de los ovarios se contaron los cuerpos lúteos para la estimación de la tasa de ovulación (Figura 14).



Figura 14: Ovarios 72 horas después de la inseminación, se pueden observar folículos hemorrágicos en negro. Los folículos postovulatorios, de mayor tamaño y con un punto rojo en el centro, así como los folículos preovulatorios, más pequeños y sin el punto rojo mencionado, también son distinguibles.

La capacidad fecundante fue similar entre los diluyentes con quitosano, EDTA y la combinación de ambos y el diluyente con antibióticos (Tabla 3). Lo que se observa es una pérdida significativa de capacidad fecundante de las dosis seminales que no incorporan ninguna sustancia antimicrobiana en el diluyente (Tabla 3), $p < 0,05$.

Tabla 3: Capacidad de fecundación de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*) evaluada mediante la recuperación de ovocitos y embriones y contabilizando cuantos de este total eran embriones viables. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar de la media.

Grupo	N	Capacidad fecundación
Quitosano	64	$94 \pm 3,0^b$
EDTA	36	$100 \pm 0,0^a$
EDTA + Quitosano	48	$85 \pm 5,1^b$
Antibióticos	26	$88 \pm 6,3^{ab}$
Sin antibióticos	64	$34 \pm 5,9^c$

*TCG: 250 mM tris-hydroxymethylaminometano, 83 mM ácido cítrico, 50 mM glucosa, pH 6.8-7.0. Quitosano: TCG suplementado con quitosano 0,05%, EDTA: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM, EDTA + Quitosano: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM y quitosano 0,05%, Sin antibióticos: diluyente TCG, Antibióticos: TCG suplementado con 100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomycin. N: Número de replicas. Los diferentes superíndices (a,b,c) indican diferencias en los valores en el mismo momento ($p < 0,05$).

4.2.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUITOSANO Y EDTA SOBRE LA FERTILIDAD Y PROLIFICIDAD

La fertilidad, determinada mediante laparoscopia, y el tamaño de camada fueron evaluados sobre todos los diluyentes a excepción del que no presentaba ningún agente antimicrobiano (Figura 15).

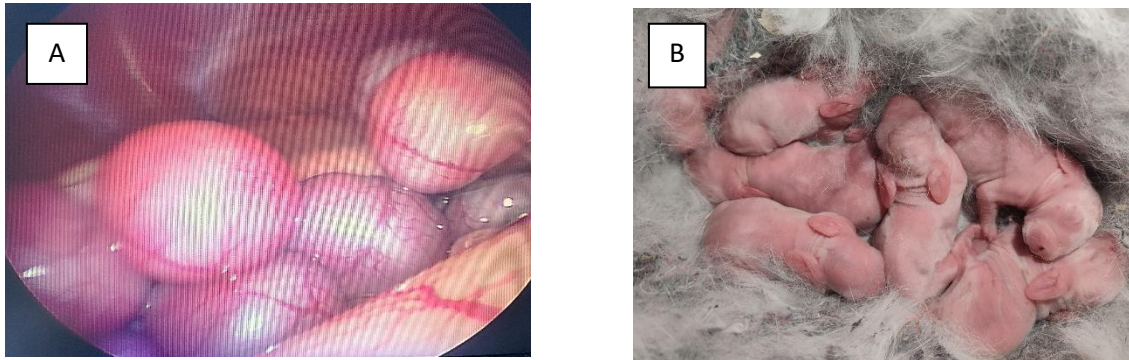


Figura 15: A: Embriones implantados día 13 de gestación. B: Gazapos recién nacidos día 28 de gestación

El estudio de la fertilidad no mostró diferencias entre diluyentes, siendo esta del 100% cuando se empleó el diluyente que contenía la combinación de EDTA y quitosano (Tabla 4). En términos de implantación, el diluyente con quitosano y el diluyente con EDTA presentaron valores similares al diluyente con antibióticos. ($p > 0,05$). Sin embargo, el grupo que contiene la combinación de EDTA y quitosano presenta una pérdida significativa en la tasa de implantación ($p < 0,05$, Tabla 4). El análisis del tamaño de camada reveló una reducción significativa del diluyente que contiene la combinación de EDTA y quitosano ($p < 0,05$, Tabla 4), mientras que el resto de las diluyentes presentaban unos valores similares al diluyente con antibióticos (Tabla 4).

Tabla 4: Parámetros para la evaluación de la capacidad de fertilidad y prolificidad de las diferentes sustancias con actividad antibacteriana en medio Tris-Cítrico-Glucosa (TCG*). Los datos se presentan como promedio \pm error estándar de la media. Los diferentes superíndices (a, b, c) indican diferencias significativas en los valores de fertilidad.

Grupo	N	Fertilidad	Pérdidas embrionarias	Tasa implantación	Pérdidas fetales	Tasa de nacidos
Quitosano	57	83 \pm 15,2	9 \pm 3,7 ^{bc}	91 \pm 3,7 ^{ab}	35 \pm 6,6 ^{ab}	6,8 \pm 1,20 ^a
EDTA	43	67 \pm 19,2	2 \pm 2,3 ^c	98 \pm 2,3 ^a	41 \pm 8,4 ^{ab}	6,7 \pm 1,54 ^a
EDTA + Quitosano	76	100 \pm 0,0	49 \pm 5,7 ^a	51 \pm 5,7 ^c	51 \pm 8,0 ^a	3,2 \pm 1,09 ^b
Antibióticos	39	60 \pm 21,9	21 \pm 6,3 ^b	85 \pm 5,8 ^b	21 \pm 6,3 ^b	8,7 \pm 1,54 ^a

*TCG: 250 mM tris-hydroxymethylaminometano, 83 mM ácido cítrico, 50 mM glucosa, pH 6.8-7.0. EDTA: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM, Quitosano: TCG suplementado con quitosano 0,05%, EDTA + Quitosano: TCG suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 20 mM y quitosano 0,05%, Sin antibióticos: diluyente TCG, Antibióticos: TCG suplementado con 100 mg/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomicina. N: Número de replicas. Los diferentes superíndices (a,b,c) indican diferencias en los valores en el mismo momento ($p < 0,05$).

Los resultados de las pérdidas embrionarias y fetales se muestran en la tabla 4. En concreto, el diluyente con EDTA presentó una menor tasa de pérdidas embrionarias en comparación con el diluyente con antibióticos ($p < 0,05$, Tabla 4). El diluyente que contiene la combinación de EDTA y quitosano presentó las mayores pérdidas embrionarias ($p < 0,05$, Tabla 4). En cuanto a las pérdidas fetales, El diluyente que contiene la combinación de EDTA y quitosano presentó nuevamente las mayores pérdidas ($p < 0,05$, Tabla 4). Tanto el diluyente con quitosano como el de EDTA presentaron unos valores similares al diluyente con antibióticos (Tabla 4).

5. DISCUSIÓN

En la producción cunícola, el empleo de antimicrobianos para el control de la contaminación bacteriana es particularmente relevante en la inseminación artificial (IA). La carga bacteriana en las dosis seminales es determinante para su calidad y éxito reproductivo (Morrell & Wallgren, 2014), ya que la presencia de bacterias en el semen no solo afecta al macho, sino que también impacta en la salud y fertilidad de la hembra, pudiendo causar inflamación sistémica y enfermedad (Maes et al., 2008), además de reducir el tamaño de la camada (Maroto Martín et al., 2010). Nuestros resultados se alinean con esta observación, según los datos obtenidos cuando no se adicionó ningún agente antimicrobiano al diluyente. En concreto, en nuestro test de capacidad fecundante, el diluyente sin antibióticos presentó un valor de alrededor del 34%. Esto refuerza la idea de la necesidad de adicionar agentes antimicrobianos para limitar la proliferación bacteriana y sus efectos negativos. Sin embargo, el aumento de las resistencias y las crecientes restricciones en el uso de antibióticos hacen necesaria la búsqueda de nuevas alternativas a su empleo (Rouillon et al., 2022).

En cunicultura, el procedimiento a nivel de campo de la IA se suele llevar a cabo con semen refrigerado a 15 °C (Roca et al., 2000) durante 24 horas, una temperatura que favorece la proliferación bacteriana (Missiakas & Schneewind, 2013; Braïek et al., 2019). En estudios preliminares demostraron que la comunidad bacteriana presente en el semen de conejo puede incluir especies de *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas spp.* y *Enterococcus spp.* entre otras (Mercier y Rideaud, 1990; Duracka et al., 2019). Los *Enterococcus* han mostrado resistencia a las cefalosporinas, la clindamicina, los aminoglucósidos y el trimetoprim-sulfametoxazol (García-Solache & Rice, 2019). Por consiguiente, han sido utilizados en el presente estudio para evaluar la capacidad antimicrobiana de las sustancias elegidas como posibles sustitutivos de los antibióticos. Nuestros resultados han demostrado que la utilización de quitosano en el diluyente previene el crecimiento de *E. faecalis* hasta un periodo de 72 horas en las dosis de conejo. Este resultado va en consonancia con varios trabajos en los que se ha demostrado la actividad inhibitoria del quitosano contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) (Erdem et al., 2016; Goy et al., 2016). El quitosano está formado por cadenas lineales de unidades de glucosamina [β -(1-4)-D-glucosamina] y en menor medida de N-acetil D-glucosamina [β -(1-4)-N-acetil-D-glucosamina], destacando la presencia de grupos funcionales como el hidroxilo y el amino. El quitosano es una molécula versátil ampliamente investigada, que muestra propiedades interesantes con posibles aplicaciones en diferentes campos. Una de las características más prometedoras es la actividad antimicrobiana (antifúngica y antibacteriana), la cual se basa fundamentalmente en la atracción electrostática del quitosano con diversos componentes de la pared y la membrana celular de hongos y bacterias que tienen componentes con carga negativa. Gracias a esta característica, actualmente, la utilización de la molécula en agricultura sostenible se justifica, ya que no genera problemas de salud pública ni de contaminación ambiental (Jiménez Mejía et al., 2018).

Por otro lado, a pesar de la actividad antimicrobiana demostrada por el EDTA contra varios patógenos (Root et al., 1988), en el presente estudio, un diluyente con este componente no mostró acción inhibitoria sobre el crecimiento de *E. faecalis*. Esto puede ser debido a que en general el EDTA se considera un "potenciador" de la actividad de otros agentes antimicrobianos (Umerska et al., 2018), y en otros estudios donde se ha visto su efectividad como antimicrobiano ha sido utilizándose en combinación con otros compuestos (Lambert et al., 2004; Viudes-De-Castro et al., 2021). Ejemplo de ello es que el diluyente que combinaba tanto EDTA como quitosano mejoraba la actividad antimicrobiana frente a *E. faecalis*, si bien no alcanza la capacidad de inhibición que muestra el quitosano cuando se aplica de manera individual.

El diluyente con quitosano conservó tanto la motilidad, y la cinética del movimiento, como la viabilidad de los espermatozoides durante 72 horas de refrigeración, mostrando el mismo comportamiento que el grupo control con antibióticos. Resultado que se confirmaría en términos de fecundación, implantación y tamaño de camada. En cambio, el diluyente con EDTA disminuyó considerablemente la motilidad en los espermatozoides en el momento de la adición, lo que podría ser explicado por los tres cationes más abundantes del semen son: calcio (Ca^{2+}), sodio (Na^+) y potasio (K^+), y su papel en la regulación de la motilidad, capacitación, reacción acrosómica y fusión con la membrana plasmática de ovocitos (Pinto et al., 2023). El EDTA es un quelante de iones metálicos divalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} o el Zn, entre otros, por lo que la reducción de la concentración catiónica tanto dentro del citosol como en el plasma seminal podría explicar la disminución del potencial fecundante (Bourinbaier & Lee, 1996). Al igual que se observa en el grupo que contiene quitosano, la combinación de EDTA y quitosano, también presentó una pérdida significativa de la motilidad espermática a las 24 horas de refrigeración. Ambos grupos muestran alteraciones en el resto de los parámetros cinéticos (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH y BCF). Este hecho puede conllevar problemas en el tránsito del espermatozoide a través del tracto reproductor femenino y en su capacidad para alcanzar y fertilizar el óvulo. Ninguno de los dos grupos control mostró efectos en la calidad in vitro de los espermatozoides almacenados a largo plazo (72 horas).

La presencia de microorganismos en el semen puede reducir su calidad y capacidad de fecundación (Moretti et al., 2009). Los resultados de nuestro estudio indican que los valores de fertilidad del grupo control sin antibióticos podrán estar afectados por este hecho, al observarse valores muy inferiores al resto de los grupos en estudio al realizar los experimentos in vivo en la etapa preimplantacional. Por ello este grupo fue eliminado al proceder a la evaluación de la etapa post-implantacional, ya que además podría dar lugar a problemas en el tracto reproductor femenino (Altmäe et al., 2019). Por otro lado, el diluyente que contenía quitosano presentó una fertilidad y prolificidad similar a la observada con el diluyente con antibióticos. Sin embargo, al evaluar la etapa post-implantacional, se observaron pérdidas de implantación significativas en el grupo que

contenía ambas sustancias antimicrobianas, así como una tasa reducida de nacidos en ambos grupos. Este fenómeno podría atribuirse al hecho de que estudios previos han demostrado que la presencia de EDTA a una concentración de 0,1 mmol/L en el medio de cultivo disminuye el desarrollo de blastocistos y el número de células (Gruber & Klein, 2011). Además, ha generado problemas en la fase avanzada de desarrollo embrionario al inhibir la glucólisis reduciendo la producción de energía en el estadio de blastocisto e inhibiendo significativamente el desarrollo de la masa celular interna (Gardner et al., 2000). Lo cual puede estar sucediendo en el presente estudio, ya que los espermatozoides se han visto expuestos a EDTA durante 72 horas, pudiendo transmitir este diluyente al óvulo fecundado.

No obstante, se requieren investigaciones adicionales para validar el rendimiento reproductivo del semen de conejo almacenado durante 72 horas en diluyentes enriquecidos con quitosano.

6. CONCLUSIONES

Como conclusión, demostramos que la adición de quitosano al 0,05% al diluyente de semen de conejo presenta un efecto bacteriostático a lo largo del tiempo, inhibiendo eficazmente el crecimiento de *E. faecalis*. Además, el diluyente con quitosano no afectó la motilidad, incluyendo sus diferentes parámetros cinéticos, ni la viabilidad a lo largo de 72 horas de refrigeración. Los resultados del estudio in vivo indican que el diluyente con quitosano al 0,05% presentó parámetros reproductivos similares a los obtenidos con el diluyente con antibióticos.

El uso de un diluyente con EDTA (20 mM) o con la combinación de EDTA (20 mM) y quitosano (0,05%) no inhibe el crecimiento de *E. faecalis*, altera los parámetros espermáticos y afecta los parámetros reproductivos, lo que implica su descarte como alternativa al uso de los antibióticos convencionales en los diluyentes de semen de conejo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. (2020). *Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos*.
- A. Hussein, R., & A. El-Anssary, A. (2019). Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. In *Herbal Medicine*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76139>
- Al-Kass, Z., Spergser, J., Aurich, C., Kuhl, J., Schmidt, K., & Morrell, J. M. (2019). Effect of presence or absence of antibiotics and use of modified single layer centrifugation on bacteria in pony stallion semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(2), 342–349. <https://doi.org/10.1111/rda.13366>
- Altmäe, S., Franasiak, J. M., & Mändar, R. (2019). The seminal microbiome in health and disease. In *Nature Reviews Urology* (Vol. 16, Issue 12, pp. 703–721). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0250-y>
- Barrio, M., Quintela, L., Becerra, J., Cainzos, J., Prieto, A., & Rodríguez-Zamora Herradón, A. P. (2012). *Evolución del manejo reproductivo en cunicultura* (Vol. 108, Issue 2). Reproducción y Obstetricia, Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria de Lugo.
- Ben Braïek, O., Smaoui, S., Ennouri, K., Morandi, S., Cremonesi, P., Hani, K., & Ghrairi, T. (2019). RAPD-PCR characterisation of two *Enterococcus lactis* strains and their potential on *Listeria monocytogenes* growth behaviour in stored chicken breast meats: Generalised linear mixed-effects approaches. *LWT*, 99, 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.053>
- Bereanu, A.-S., Bereanu, R., Mohor, C., Vintilă, B. I., Codru, I. R., Olteanu, C., & Sava, M. (2024). Prevalence of Infections and Antimicrobial Resistance of ESKAPE Group Bacteria Isolated from Patients Admitted to the Intensive Care Unit of a County Emergency Hospital in Romania. *Antibiotics*, 13(5), 400. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13050400>
- Bourinbaiar, A. S., & Lee, C.-H. (1996). Synergistic Effect of Gramicidin and EDTA in Inhibiting Sperm Motility and Cervical Mucus Penetration in Vitro. In *CONTRACEPTION* (Vol. 54).
- Browne, A. J., Chipeta, M. G., Haines-Woodhouse, G., Kumaran, E. P. A., Hamadani, B. H. K., Zarea, S., Henry, N. J., Deshpande, A., Reiner, R. C., Day, N. P. J., Lopez, A. D., Dunachie, S., Moore, C. E., Stergachis, A., Hay, S. I., & Dolecek, C. (2021). Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000–18: a spatial modelling study. *The Lancet Planetary Health*, 5(12), e893–e904. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(21\)00280-1](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00280-1)
- Cojic, A., Hansson, I., Johannisson, A., & Morrell, J. M. (2023). Effect of Some Plant-Based Substances on Microbial Content and Sperm Quality Parameters of Bull Semen. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4). <https://doi.org/10.3390/ijms24043435>

- Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., & Blair, J. M. A. (2023). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 21, Issue 5, pp. 280–295). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>
- Ding, D., Wang, B., Zhang, X., Zhang, J., Zhang, H., Liu, X., Gao, Z., & Yu, Z. (2023). The spread of antibiotic resistance to humans and potential protection strategies. In *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Vol. 254). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114734>
- Ďuračka, M., Benko, F., Chňápek, M., & Tvrdá, E. (2023). Strategies for Bacterial Eradication from Human and Animal Semen Samples: Current Options and Future Alternatives. In *Sensors* (Vol. 23, Issue 15). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/s23156978>
- Garcia-Dominguez, X., Marco-Jimenez, F., Viudes-de-Castro, M. P., Vicente, J. S. (2019) Minimally Invasive Embryo Transfer and Embryo Vitrification at the Optimal Embryo Stage in Rabbit Model. *J. Vis. Exp.* (147), e58055, doi:10.3791/58055.
- García-Solache, M., & Rice, L. B. (2019). The enterococcus: A model of adaptability to its environment. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 32, Issue 2). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>
- Gardner, D. K., Lane, M. W., & Lane, M. (2000). EDTA stimulates cleavage stage bovine embryo development in culture but inhibits blastocyst development and differentiation. *Molecular Reproduction and Development*, 57(3), 256–261. [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200011\)57:3<256::AID-MRD7>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200011)57:3<256::AID-MRD7>3.0.CO;2-P)
- Giannenas, I., Sidiropoulou, E., Bonos, E., Christaki, E., & Florou-Paneri, P. (2019). The history of herbs, medicinal and aromatic plants, and their extracts: Past, current situation and future perspectives. In *Feed Additives: Aromatic Plants and Herbs in Animal Nutrition and Health* (pp. 1–18). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814700-9.00001-7>
- Gil, M. L., Casanova, M., & Martinez, P. (1994). Changes in the cell wall glycoprotein composition of *Candida albicans* associated to the inhibition of germ tube formation by EDTA. In *Arch Microbiol* (Vol. 161).
- 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>
- Goy, R. C., Morais, S. T. B., & Assis, O. B. G. (2016). Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. Coli* and *S. aureus* growth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(1), 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.09.010>
- Gruber, I., & Klein, M. (2011). Embryo culture media for human ivf: Which possibilities exist? *Journal of the Turkish German Gynecology Association*, 12(2), 110–117. <https://doi.org/10.5152/jtgga.2011.25>

- Guarnieri, A., Triunfo, M., Scieuzo, C., Ianniciello, D., Tafi, E., Hahn, T., Zibek, S., Salvia, R., De Bonis, A., & Falabella, P. (2022). Antimicrobial properties of chitosan from different developmental stages of the bioconverter insect *Hermetia illucens*. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12150-3>
- Guerriero, G., Berni, R., Muñoz-Sanchez, J. A., Apone, F., Abdel-Salam, E. M., Qahtan, A. A., Alatar, A. A., Cantini, C., Cai, G., Hausman, J. F., Siddiqui, K. S., Hernández-Sotomayor, S. M. T., & Faisal, M. (2018). Production of plant secondary metabolites: Examples, tips and suggestions for biotechnologists. In *Genes* (Vol. 9, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes9060309>
- 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. In *The Lancet* (Vol. 387, Issue 10014, pp. 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)
- Hosseinnejad, M., & Jafari, S. M. (2016). Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 85, pp. 467–475). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022>
- Hutchings, M., Truman, A., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 51, pp. 72–80). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Jasko, D. J., Bedford, S. J., Cook, N. L., Mumford, E. L., Squires, E. L., & Pickett, B. W. (1993). Effect of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, *40*(5), 885–893. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(93\)90356-a](https://doi.org/10.1016/0093-691x(93)90356-a)
- Jiménez Mejía, R., Arceo Martínez, M. T., & Loeza Lara, P. D. (2018). Quitosano: actividad antimicrobiana y mecanismos de acción. *E-CUCBA*, (9), 17–23. <https://doi.org/10.32870/e-cucba.v0i9.98>
- Kasimanickam, V., Kasimanickam, M., & Kasimanickam, R. (2021). Antibiotics Use in Food Animal Production: Escalation of Antimicrobial Resistance: Where Are We Now in Combating AMR? In *Medical sciences (Basel, Switzerland)* (Vol. 9, Issue 1). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/medsci9010014>
- Ke, C. L., Deng, F. S., Chuang, C. Y., & Lin, C. H. (2021). Antimicrobial actions and applications of Chitosan. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym13060904>
- Kristich, C. J., Rice, L. B., & Arias, C. A. (n.d.). *Enterococcal Infection-Treatment and Antibiotic Resistance*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
- Kuster, C. E., & Althouse, G. C. (2016). The impact of bacteriospermia on boar sperm storage and reproductive performance. *Theriogenology*, *85*(1), 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.049>
- Lavara, R., Mocé, E., Lavara, F., Viudes De Castro, M. P., & Vicente, J. S. (2005). Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in

- rabbits? *Theriogenology*, *64*(5), 1130–1141.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.01.009>
- Terminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, *65*(1), 34–44.
<https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>
- Maes, D., Nauwynck, H., Rijsselaere, T., Mateusen, B., Vyt, P., de Kruif, A., & Van Soom, A. (2008). Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. *Theriogenology*, *70*(8), 1337–1345.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.018>
- Malaluang, P., Wilén, E., Lindahl, J., Hansson, I., & Morrell, J. M. (2021). Antimicrobial resistance in equine reproduction. In *Animals* (Vol. 11, Issue 11). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/ani11113035>
- Marco-Fuertes, A., Marin, C., Lorenzo-Rebenaque, L., Vega, S., & Montoro-Dasi, L. (2022). Antimicrobial Resistance in Companion Animals: A New Challenge for the One Health Approach in the European Union. In *Veterinary Sciences* (Vol. 9, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/vetsci9050208>
- 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>
- Maroto Martín, L. O., Muñoz, E. C., De Cupere, F., Van Driessche, E., Echemendia-Blanco, D., Rodríguez, J. M. M., & Beeckmans, S. (2010). Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Animal Reproduction Science*, *120*(1–4), 95–104.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.03.008>
- Martínez-Pastor, F., Lacalle, E., Martínez-Martínez, S., Fernández-Alegre, E., Álvarez-Fernández, L., Martínez-Alborcia, M. J., Bolarin, A., & Morrell, J. M. (2021). Low density Porcicoll separates spermatozoa from bacteria and retains sperm quality. *Theriogenology*, *165*, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.02.009>
- Miller, W. R., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2014). Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 12, Issue 10, pp. 1221–1236). Expert Reviews Ltd. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.956092>
- Mirbagheri, V. S., Alishahi, A., Ahmadian, G., Petroudi, S. H. H., Ojagh, S. M., & Romanazzi, G. (2023). Recent findings in molecular reactions of E. coli as exposed to alkylated, nano- and ordinary chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules*, *253*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127006>
- Missiakas, D. M., & Schneewind, O. (2013). Growth and laboratory maintenance of *Staphylococcus aureus*. *Current Protocols in Microbiology*, *SUPPL.28*.
<https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc09c01s28>
- Mocé, E., & Vicente, J. S. (2009). Rabbit sperm cryopreservation: A review. In *Animal Reproduction Science* (Vol. 110, Issues 1–2, pp. 1–24).
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.08.015>

- 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>
- Moretti, E., Capitani, S., Figura, N., Pammolli, A., Federico, M. G., Giannerini, V., & Collodel, G. (2009). The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *26*(1), 47–56. <https://doi.org/10.1007/s10815-008-9283-5>
- Morrell, J. M., Malaluang, P., Cojkic, A., & Hansson, I. (2012). *Alternatives to Antibiotics in Semen Extenders Used in Artificial Insemination*. www.intechopen.com
- Morrell, J. M., & Wallgren, M. (2014). Alternatives to antibiotics in semen extenders: A review. In *Pathogens* (Vol. 3, Issue 4, pp. 934–946). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens3040934>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. In *Pharmaceuticals* (Vol. 6, Issue 12, pp. 1451–1474). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Paterson, J. R., Wadsworth, J. M., Hu, P., & Sharples, G. J. (2023). A critical role for iron and zinc homeostatic systems in the evolutionary adaptation of *Escherichia coli* to metal restriction. *Microbial Genomics*, *9*(12). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001153>
- Pinto, F. M., Odriozola, A., Candenás, L., & Subirán, N. (2023). The Role of Sperm Membrane Potential and Ion Channels in Regulating Sperm Function. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 8). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms24086995>
- Quintela, L. A., Becerra, J. J., Peña, A. I., Yáñez, U., Villamayor, P. R., Sánchez-Quinteiro, P., Martínez, P., & Herradón, P. G. (2023). Three decades of progress in artificial insemination in rabbit farming: a review. In *World Rabbit Science* (Vol. 31, Issue 2, pp. 93–107). Universidad Politecnica de Valencia. <https://doi.org/10.4995/wrs.2023.18661>
- Ramires Neto, C., Sancler da Silva, Y. F. R., Resende, H. L., Guasti, P. N., Monteiro, G. A., Papa, P. M., Dell’acqua Júnior, J. A., Puoli Filho, J. N. P., Alvarenga, M. A., & Papa, F. O. (2015). Control methods and evaluation of bacterial growth on fresh and cooled stallion semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, *35*(4), 277–282. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.01.014>
- Rizeq, B. R., Younes, N. N., Rasool, K., & Nasrallah, G. K. (2019). Synthesis, bioapplications, and toxicity evaluation of chitosan-based nanoparticles. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20225776>
- Roca, J., Martínez, S., Vázquez, J. M., Lucas, X., Parrilla, I., & Martínez, E. A. (2000). Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. In *Animal Reproduction Science* (Vol. 64).

- Root, J. L., McIntyre, R., Jacobs, N. J., & Daghighian, C. P. (1988). *Inhibitory Effect of Disodium EDTA upon the Growth of Staphylococcus epidermidis In Vitro: Relation to Infection Prophylaxis of Hickman Catheters* (Vol. 32, Issue 11). <https://journals.asm.org/journal/aac>
- 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>
- Santos, C. S., Silva, A. M., Maia, K. M., Rodrigues, G. S. O., Feijó, F. M. C., Alves, N. D., Oliveira, M. F., & Silva, A. R. (2020). Composition of semen and foreskin mucosa aerobic microbiota and its impact on sperm parameters of captive collared peccaries (Pecari tajacu). *Journal of Applied Microbiology*, 129(3), 521–531. <https://doi.org/10.1111/jam.14663>
- Schulze, M., Dathe, M., Waberski, D., & Müller, K. (2016). Liquid storage of boar semen: Current and future perspectives on the use of cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*, 85(1), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.016>
- Shamsudin, N. F., Ahmed, Q. U., Mahmood, S., Shah, S. A. A., Khatib, A., Mukhtar, S., Alsharif, M. A., Parveen, H., & Zakaria, Z. A. (2022). Antibacterial Effects of Flavonoids and Their Structure-Activity Relationship Study: A Comparative Interpretation. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27041149>
- Umerska, A., Strandh, M., Cassisa, V., Matougui, N., Eveillard, M., & Saulnier, P. (2018). Synergistic effect of combinations containing EDTA and the antimicrobial peptide AA230, an arenicin-3 derivative, on gram-negative bacteria. *Biomolecules*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/biom8040122>
- Viudes-de-Castro, M. P., Marco Jimenez, F., & Vicente, J. S. (2023). 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., & Vicente, J. S. (1997). REPZON SCIENCE Effect of sperm count on the fertility and prolificity rates of meat rabbits. In *Animal Reproduction Science* (Vol. 46).
- Viudes-De-Castro, M. P., & Vicente, J. S. (2023). Trends in rabbit insemination extenders for fresh and frozen semen. a review. In *World Rabbit Science* (Vol. 31, Issue 2, pp. 109–116). Universidad Politecnica de Valencia. <https://doi.org/10.4995/wrs.2023.18505>
- Wiebke, M., Hensel, B., Nitsche-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>

