



Facultad de Veterinaria  
**Universidad** Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Resistencias a los antibióticos: búsqueda de alternativas en la  
preparación de dosis seminales en la especie porcina

Antibiotic resistance: search for alternatives in the preparation of  
seminal doses in swine

Autora:  
Paula Aspas Cortés

Director/es:  
Victoria Luño Lázaro  
José Ignacio Martí Jiménez

Facultad de Veterinaria

2022

# ÍNDICE

1. Resumen/Abstract .....	3
2. Introducción .....	4
2.1. Formación de las resistencias antimicrobianas .....	4
2.2. Resistencia antimicrobiana en veterinaria .....	5
2.2.1. La inseminación artificial y el uso de antibióticos .....	6
3. Justificación y objetivos .....	7
4. Metodología .....	7
5. Resultados y discusión .....	8
5.1. Métodos físicos .....	10
5.2. Péptidos antimicrobianos .....	13
5.3. Sustancias naturales bioactivas .....	15
5.4. Otras alternativas .....	17
5.4.1. Conservación sin antibióticos a 5 °C .....	17
5.4.2. Nanopartículas .....	18
5.4.3. Probióticos .....	20
5.4.4. BactiBag .....	20
5.4.5. Diluyentes comerciales sin antibióticos .....	21
6. Conclusiones/Conclusions .....	22
7. Valoración personal .....	23
8. Bibliografía .....	24

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Resultados obtenidos tras la búsqueda en las bases de datos .....	<b>8</b>
<b>Tabla 2.</b> Recuento bacteriano tras la SLC .....	<b>12</b>
<b>Tabla 3.</b> CMI de péptidos catiónicos sintéticos frente a bacterias .....	<b>14</b>
<b>Tabla 4.</b> CMI para gentamicina vs. gentamicina combinada con los péptidos .....	<b>15</b>
<b>Tabla 5.</b> Microorganismos aislados tras incubación con nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	<b>20</b>

## Índice de figuras

<b>Imagen 1.</b> Centrifugación coloidal en una sola capa .....	<b>11</b>
<b>Imagen 2.</b> Eliminación del sedimento en tubo de centrifuga .....	<b>12</b>
<b>Imagen 3.</b> Niveles bacteriológicos en muestras con y sin antibióticos .....	<b>18</b>
<b>Imagen 4.</b> Crecimiento de <i>S. aureus</i> con AgNPs .....	<b>19</b>

## 1. Resumen

Hoy en día la inseminación artificial es la técnica más empleada en la reproducción porcina. Para la preparación de dosis seminales se suele recurrir al uso de antibióticos con el fin de evitar el crecimiento bacteriano que podría producir una disminución de la calidad seminal y con ello de la fertilidad en la cerda. Sin embargo, el aumento de las resistencias microbianas ha promovido la búsqueda de diferentes alternativas como pueden ser la centrifugación coloidal, aceites esenciales, péptidos antimicrobianos o incluso otras bacterias que produzcan un efecto probiótico al limitar la proliferación de aquellas que son patógenas. A pesar de que estas alternativas se están empezando a utilizar en la producción porcina, todavía es necesario determinar si estas opciones van a ser capaces de preservar la calidad de las dosis seminales y de controlar el crecimiento microbiano en el modelo productivo actual.

## Abstract

Today, artificial insemination is the most widely used technique in pig breeding. For the preparation of seminal doses, the use of antibiotics is usually used in order to avoid bacterial contamination. However, the increase in microbial resistance has promoted the search for different alternatives such as colloidal centrifugation, essential oils, antimicrobial peptides or even other bacteria that produce a probiotic effect and are able to control the proliferation of those that are pathogenic. Although these alternatives are beginning to be investigated or used in pig production, it is still necessary to determine whether these options will be able to offer the same results in terms of the quality of the seminal doses and the control of microbial growth as antibiotics in the current production model.

## 2. Introducción

La aparición de microorganismos resistentes frente a la mayoría de antibióticos está generando un gran problema que afecta tanto a la Salud Pública como a la Sanidad Animal (Gimeno y Ortega, 2005). La Organización Mundial de la Salud lo considera una de las 10 principales amenazas a las que se enfrenta la humanidad, ya que cada año alrededor de 700.000 personas mueren en todo el mundo debido a infecciones producidas por bacterias resistentes a los antibióticos, cifra que podría superar los 10 millones de muertes en 2050 (O'Neill, 2016).

### 2.1. Formación de las resistencias antimicrobianas

La resistencia antimicrobiana de una población bacteriana se define como la capacidad de ésta para evadir la actividad de los antibióticos (Wright, 2010). El origen de esta resistencia se simplifica a dos condiciones que deben darse (Gimeno y Ortega, 2005):

- El contacto prolongado del microorganismo con el antibiótico.
- Que este contacto se de en una concentración que le permita al microorganismo sobrevivir.

Oromí (2000) describió que la resistencia bacteriana a los antibióticos puede ser natural, por medio de mutaciones o por transferencia de genes. La resistencia natural se produce cuando varias cepas de la misma especie son resistentes a un antibiótico, como es el caso de la impermeabilidad que presentan las Gram negativas frente a la penicilina G por las propiedades de su pared bacteriana (Oromí, 2000). Por otro lado, se producen mutaciones donde el antibiótico va a actuar sobre una población susceptible, de la cual se origina la población resistente que genéticamente tiene codificada la mutación, y le permite la supervivencia en presencia de la molécula antimicrobiana (Munita y Arias, 2016). Este tipo de resistencia se presenta de forma muy escasa (1 o 2 %) y es aislada en cepas de clínica humana (Oromí, 2000). Y en tercer lugar se encuentra el proceso de transferencia de genes de unas bacterias a otras, causa de la mayoría de las resistencias bacterianas (80 %) a través de un mecanismo que se puede desarrollar de tres formas distintas (Oromí, 2000). La primera es la transformación, donde se produce la incorporación de ADN desnudo; la segunda es la transducción donde el vector es un virus bacteriano, es decir, lo que se conoce como bacteriófago; y por último la conjugación, en la que se requiere un estrecho contacto entre la célula donante y receptora para la transferencia de ADN (Oromí, 2000; Munita y Arias, 2016).

Además de los procesos genéticos, también han desarrollado mecanismos que pueden interferir en la ruta bioquímica del antimicrobiano: modificando la molécula antimicrobiana,

disminuyendo la penetración, aumentando la expulsión del antibiótico o generando cambios genéticos en el lugar de unión (Munita y Arias, 2016). Un ejemplo claro de ello es la resistencia a las fluoroquinolonas (FQs) que se puede dar de tres maneras diferentes: mediante la mutación del lugar de unión de la FQ, con una sobreexpresión de las bombas que expulsan el fármaco de la bacteria o protegiendo el sitio donde se une la FQ con una proteína bacteriana (Munita y Arias, 2016).

## 2.2. Resistencia antimicrobiana en veterinaria

Desde el ámbito de la veterinaria podemos considerar que las resistencias antimicrobianas han surgido por la necesidad de usar antibióticos de diversas formas: con un fin terapéutico frente a una enfermedad, como promotores del crecimiento con el objetivo de aumentar la producción, de manera profiláctica para prevenir una infección o como metafilaxia cuando aparecen casos que son compatibles con la enfermedad que sospechamos y tratamos todo el lote de animales (Cancho, García y Simal, 2000; Errecalde, 2004; Gimeno y Ortega, 2005). Tras la utilización de antibióticos, es necesario respetar los tiempos de espera, definido por el BOE en el Real Decreto 1246/2008 como el periodo de tiempo necesario entre la última administración de medicamento veterinario a un animal y la obtención de productos alimenticios de ese animal protegiendo la Salud Pública. En el caso de no respetarse, se pueden generar residuos en los tejidos de los animales que se consumen como alimentos o los que se usan para la obtención de los mismos (Gratacós, 2008), lo que conlleva un riesgo de transmisión a la cadena alimentaria y al medio ambiente (Gimeno y Ortega, 2005).

Desde el punto de vista de la Salud Pública, estos residuos pueden producir efectos adversos en las personas como reacciones tóxicas y alérgicas, toxicidad crónica por una extensa exposición a dosis bajas, desarrollo de resistencias a los microorganismos e interferencias en la flora intestinal del consumidor (Gratacós, 2008). Por ello, el Comité Veterinario Europeo de Productos Medicinales ha determinado los límites máximos de residuos de diferentes antibióticos como la penicilina y la oxitetraciclina en alimentos de origen animal con el fin de garantizar la protección del consumidor y regular el uso de antibióticos (Falcón et al., 2010). Por ejemplo, en el caso de la oxitetraciclina cualquier especie productora de alimento no debe sobrepasar los siguientes límites de residuos de antibióticos (Falcón et al., 2010): 100 µg/Kg en músculo, 300 µg/Kg en hígado, 600 µg/Kg en riñón, 100 µg/Kg en leche 200 µg/Kg en huevos y 25 µg/Kg en miel (EMEA, 1995).

A día de hoy existe un plan global para tratar estas resistencias a los antimicrobianos desde una perspectiva One Health con el objetivo de evitar la transmisión de estas bacterias de

los animales a los humanos. Para ello es necesaria la coordinación y cooperación de numerosos sectores como son la agricultura y la medicina humana y animal (Mesonero, 2020). En el 2014 se aprobó en España el Plan Nacional de Resistencia a los Antibióticos, una estrategia que tiene como objetivo disminuir y evitar la propagación de la resistencia antimicrobiana para conservar la eficacia de los antibióticos y disminuir su repercusión sobre la salud humana y animal (Mesonero, 2020). Este programa, de adhesión voluntaria, ha logrado junto con la voluntad de las empresas, los veterinarios y la sociedad, una reducción del 58,8 % del uso de antibióticos hasta 2020.

### 2.2.1. La inseminación artificial y el uso de antibióticos

En el ámbito de la veterinaria una de las áreas que más antibióticos utiliza es la reproducción animal. Actualmente la inseminación artificial (IA) es la técnica reproductiva más utilizada en el sector porcino ya que tiene numerosas ventajas, como el uso de verracos genéticamente superiores, descartar eyaculados de baja calidad o mejorar la higiene durante la inseminación a las hembras (Gonçalves, 2012; Luther et al., 2021). Para preparar las dosis seminales se recurre al uso de antibióticos en los diluyentes con el fin de controlar el crecimiento microbiano durante su conservación a una temperatura de 17 °C (Luther et al., 2021).

En el caso de la reproducción animal, debido a la posible contaminación durante los procesos de recolección y manipulación del semen, la Normativa Europea regula a través de la Directiva 90/429/CEE, el Reglamento Delegado -UE- 2016/429 complementados con el Real Decreto 841/2011 la adición de antibióticos a los diluyentes seminales (Parlamento Europeo UE). Dicha normativa indica que la combinación de antibióticos tiene que tener un efecto equivalente al que ofrece la concentración de 500 UI de estreptomicina/ml, 500 UI de penicilina/ml, 150 µg de lincomicina/ml y 300 µg de espectomicina/ml. Generalmente, se utiliza una mezcla de diferentes antibióticos de amplio espectro (penicilina, estreptomicina, lincomicina, espectinomicina) a una baja concentración, para no producir toxicidad a nivel celular (Althouse, Pierdon y Lu, 2008).

Actualmente en España se inseminan al 95 % de las reproductoras, lo que significa que anualmente se aplican entre 1 y 6 toneladas de antibióticos a través de la inseminación artificial, cifra que debe ser tomada en cuenta en la lucha contra la creación de resistencias antibióticas (Topigs Norsvin, 2021).

### 3. Justificación y objetivos

En la actualidad existen numerosas bacterias resistentes a ciertos antibióticos debido al uso indiscriminado que se ha realizado a lo largo de los años en la medicina humana y veterinaria. En el ámbito de la reproducción porcina, los antibióticos se añaden a los diluyentes seminales con el fin de evitar el crecimiento bacteriano y la pérdida de la calidad espermática, existiendo una legislación que regula las concentraciones y la composición que se puede utilizar. Debido al aumento de las resistencias a los antimicrobianos se están buscando alternativas con la misma eficacia para poder reducir su uso.

Por estos motivos en este trabajo se plantean los siguientes objetivos:

- Conocer los puntos críticos del proceso de obtención de los eyaculados con mayor riesgo de contaminación bacteriana y establecer medidas para reducirla.
- Analizar las diferentes alternativas a los antibióticos en las dosis seminales porcinas.
- Evaluar si estas alternativas son eficaces y permiten la sustitución de los antimicrobianos.

### 4. Metodología

Para llevar a cabo este trabajo, se ha realizado una revisión bibliográfica de artículos publicados en el periodo 2000-2022 sobre el desarrollo de la resistencia antimicrobiana en la reproducción porcina, así como en las posibles alternativas actuales al uso de antibióticos.

Esta revisión se ha realizado mediante la búsqueda de artículos en bases de datos de carácter científico como Google académico, Web of Science, Pubmed, así como revistas científicas y de divulgación del sector porcino.

Para una búsqueda más sencilla y con mayor precisión se han utilizado palabras clave como “resistencia bacteriana”, “One Health veterinary”, “boar semen extender”, “alternativas antibióticos semen porcino”, “seminal contaminants”, “péptidos antimicrobianos”, “natural substances boar semen”, “colloid centrifugation”, “mechanism antibiotic resistance”.

A continuación, se muestra en la Tabla 1 los resultados totales obtenidos al realizar la búsqueda de algunos términos nombrados en los buscadores.

Tabla 1. Resultados obtenidos tras la búsqueda de los términos mencionados.

	Pubmed	Google Académico	Web of Science
<i>Mechanism antibiotic resistance</i>	23881	28500	22231
<i>Resistencia bacteriana</i>	288	19100	18
<i>One Health veterinary</i>	30315	1530000	21420
<i>Boar semen extender</i>	328	10900	599
<i>Alternativas antibióticos semen porcino</i>	-	1020	-
<i>Seminal contamination</i>	230	48800	177
<i>Antimicrobial peptides</i>	35299	86500	35520
<i>Natural substances semen</i>	56	18900	95
<i>Colloid centrifugation</i>	1430	160000	564

## 5. Resultados y discusión

Actualmente, resulta imprescindible el uso de antibióticos para la producción de dosis seminales. Durante la eyaculación, se puede producir una contaminación bacteriana del semen al pasar por el tracto reproductivo y al entrar en contacto con el medio ambiente, ya que las glándulas accesorias y el orificio prepucial pueden contener bacterias libres (Morrell, 2019). El grado de contaminación de las dosis dependerá de las condiciones higiénicas que se sigan en el Centro de Inseminación y la técnica de recogida utilizada (Gonçalves, 2012). A pesar de utilizar unas prácticas higiénicas en la extracción, Díaz et al. (2000) determinaron que la concentración de bacterias en los eyaculados podía ser de entre 100 y 217 UFC/ml, la cual podía ascender hasta 450.000 UFC/ml cuando se recogía la muestra seminal con pocos cuidados de limpieza y con un mal posicionamiento de la mano.

Durante el almacenamiento y tras la dilución del semen con el diluyente, las dosis quedan almacenadas durante un periodo de tiempo que puede favorecer la replicación de las bacterias causando un deterioro en la calidad seminal y la posibilidad de producir patologías en las hembras inseminadas como metritis, endometritis, retorno del celo o menor tamaño de la camada (Morrel, 2019; Costinar et al., 2021). A nivel de los espermatozoides, se pueden producir

cambios en la motilidad e integridad de la membrana plasmática, exocitosis del contenido acrosomal, disminución de la actividad mitocondrial, alteraciones del ADN, incremento de la apoptosis o aglutinaciones. Las bacterias que más alteraciones producen en la calidad seminal y en el tracto reproductivo de las hembras son las Gram negativas, siendo las que se aíslan con más frecuencia las de la familia *Enterobacteriaceae* (*Serratia* spp., *E. coli*), aunque *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp., así como algunas Gram positivas (*Enterococcus* spp.), también pueden formar parte de esta microbiota contaminante (Althouse y Lu, 2005; Úbeda et al., 2013).

En los centros de obtención de semen porcino para la IA existen varios puntos críticos que se deben controlar para reducir al máximo la contaminación bacteriana de las dosis. Las principales fuentes de contaminación clasificadas según Althouse et al. (2000) son las de origen animal: fecal, fluidos de la cavidad prepucial, piel, pelos del prepucio, secreciones respiratorias o humanas; y por otro lado la contaminación de origen no animal (grifo del agua, fallos en el procesado del agua, aire o sistema de ventilación y fosas o desagües).

Cuando se obtiene el eyaculado, éste se mezcla con un diluyente que debe cumplir las siguientes características: aportar energía para el metabolismo de los espermatozoides, protegerlos frente al shock térmico por frío, mantener el pH, hacer frente a los residuos metabólicos y las bacterias, mantener el equilibrio osmótico y estabilizar las membranas plasmáticas (Cuenca y Avellaneda, 2017). Para ello, un diluyente debe incluir los siguientes componentes básicos (Cuenca y Avellaneda, 2017):

- Glucosa: proporciona energía a los espermatozoides.
- Sustancias tampón: para regular y mantener el pH seminal en un rango más amplio con el fin de evitar la pérdida de motilidad espermática y mantener su capacidad fecundante. Actualmente los más utilizados son HEPES y MOPS.
- Sales con iones inorgánicos: van a regular y mantener una presión osmótica por encima de 200 mOsm, ya que una bajada de ésta supone una reducción de la motilidad espermática. Algunos ejemplos de estas sales son el cloruro sódico y potásico.
- Antibióticos: se utilizan la penicilina, estreptomicina, lincomicina, gentamicina, neomicina o kanamicina. La combinación de antibióticos debe proporcionar un efecto similar al que dicta la UE bajo la Directiva 90/429/CEE.

Actualmente existe controversia en la eficiencia de los antibióticos utilizados frente a los microorganismos hallados en las muestras, ya que se han detectado bacterias en el semen a pesar de su empleo (Morrell, 2019). Maroto et al. (2010) determinaron que un 62 % de los

eyaculados puros y un 79,5 % de los diluidos que se exportan para su comercialización actuaban como diseminadores de enfermedades bacterianas. Posteriormente, estos mismos autores determinaron que las dosis de semen diluido con una concentración bacteriana mayor a  $3,5 \times 10^3$  UFC/mL producían una reducción en el tamaño de la camada de 2,53 a 3,35 lechones/camada, es decir, unas dosis seminales con contaminación bacteriana van a suponer pérdidas económicas en las explotaciones. Además, en un estudio realizado en los EE.UU. se detectó que el 86 % de las bacterias encontradas en las dosis seminales presentaban resistencias a los antibióticos utilizados en su preparación (Althouse y Lu, 2005). En otro estudio en Europa se observó la presencia de bacterias resistentes a la gentamicina en el 26 % de las dosis y en el 66,7 % de los centros de inseminación artificial (Schulze et al., 2015).

Debido a la controversia de la eficiencia de los antimicrobianos y las numerosas resistencias bacterianas que se están generando frente a ellos, se ha visto la necesidad de buscar alternativas que se van a analizar a continuación.

### 5.1. Métodos físicos

A lo largo de los años se han desarrollado diferentes tipos de técnicas de selección espermática (migración, filtración o la centrifugación a través de coloides), cuyo principal objetivo es eliminar el plasma seminal, restos de diluyentes o ciertas partículas contaminantes, a la vez que recuperar a los espermatozoides que ofrezcan una mejor calidad para la fecundación (Morrell et al., 2009). Una de las primeras técnicas utilizadas en medicina humana fue la centrifugación en gradiente de densidad (DGC), sin embargo, para el procesado de eyaculados de verraco no fue muy efectiva, por lo que se desarrolló otra técnica más simple, la centrifugación de una sola capa de coloide (SLC) (Morrell y Wallgren, 2014). Esta última permite separar aquellos espermatozoides que tienen una mejor morfología y motilidad (Morrell y Wallgren, 2011), desarrollar formulaciones coloidales especie-específicas (Androcoll-P, en el caso del porcino) y procesar mayores volúmenes de eyaculado (Björnsdotter, Morrell y González, 2013). Estos coloides constan de partículas de sílice coloidal cubiertas con sileno, un material no tóxico e ideal para la separación de materiales biológicos. Esta técnica aprovecha la diferente densidad de los espermatozoides de modo que, aquellos que presentan mejor motilidad y morfología irán al fondo del tubo tras la centrifugación aislándose de otros constituyentes, que se acumulan en el coloide (Morrell et al., 2009).

La centrifugación coloidal es una técnica que también se ha aplicado con el fin de separar los espermatozoides del plasma seminal, lugar donde se encuentran las bacterias, reduciendo así su contaminación y pudiendo ser una alternativa al uso de antibióticos en los diluyentes

(Sorarrain de Pedro, 2020). Por ejemplo, el método SLC con Androcoll-P ha permitido llegar a procesar un volumen de 150 ml de eyaculado porcino (Morrell y Wallgren, 2011), a la vez que eliminar circovirus tipo 2 mejorando así la bioseguridad (Martinez et al., 2013).

Morrell y Wallgren (2011) realizaron un estudio para determinar si el método de centrifugación de una sola capa (Imagen 1) con formulación específica para verracos, Androcoll-P, podía disminuir la carga bacteriana del eyaculado o controlar el crecimiento bacteriano durante la refrigeración (Tabla 2). Los resultados mostraron que con este método era posible la eliminación completa (6 de 10 muestras) o una reducción considerable de los contaminantes bacterianos (4 de 10 muestras). El tipo de bacteria y/o el tiempo transcurrido entre la recolección y el procesamiento con SLC afectaban a la eliminación de bacterias, siendo más probable que las bacterias móviles flageladas estuvieran presentes después de SLC que las bacterias no flageladas. Debido al coste del producto y al tiempo requerido para el procesamiento de las muestras, no es una técnica que se utilice comercialmente.



Imagen 1. Centrifugación coloidal en una sola capa (SLC)  
(Morrell y Wallgren, 2011).

Tabla 2. Recuento bacteriano en las muestras seminales de verraco a las 0 h de la SLC y tras 24 h de almacenamiento a una temperatura de 16-18 °C (Morrell y Wallgren, 2011).

Verraco	1 h después de SLC		Después de 24 h de almacenamiento @ 16-18 C	
	sin centrifugar	SLC	sin centrifugar	SLC
1	Flora mixta + estreptococo alfa hemolítico Ca. 4000 ufc/ml	Sin crecimiento	Flora mixta + estreptococo alfa hemolítico. California. 40 ufc/ml	Sin crecimiento
2	Estafilococosp. en flora mixta Ca. 500 ufc/ml	S. aureusen cultivo puro 1000 ufc/mL (posible contaminación después de SLC)	Ligero crecimiento de Estafilococo en flora mixta ca. 50 ufc/ml	Sin crecimiento
3	Alfa hemolítico Estreptococo en flora mixta Ca. 1000 ufc/mL	Sin crecimiento	Ligero crecimiento de Bacilosp. en flora mixta	Sin crecimiento
4	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento
5	Pseudomonas aeruginosa 6800 ufc/ml; coagulasa Estafilococo negativo 920 ufc/mL	Sin crecimiento	Pseudomonas aeruginosa > 10 000 ufc/mL en flora mixta	Sin crecimiento
6	Pseudomonas aeruginosa 10000 ufc/ml; Estafilococo coagulasa negativo 800 ufc/mL	Sin crecimiento	Pseudomonas aeruginosa > 10000 ufc/mL; Estreptococo 2900 ufc/mL	Sin crecimiento
7	Burkholderiasp., 500 ufc/mL citrobactersp., 500 ufc/mL	Burkholderia 50 ufc/ml	citrobacterspp. 10000 ufc/mL	Pseudomonas aeruginosa 200 ufc/ml
8	E. coli 3000 ufc/ml	E. coli 150 ufc/ml	E. coli 5000 ufc/ml	E. coli 300 ufc/ml
9	pantoea 1000 ufc/mL citrobacter 200 ufc/ml	pantoea 1000 ufc/mL	Pseudomonas aeruginosa 3000 ufc/ml; citrobacter 300 ufc/ml	Pseudomonas aeruginosa 200 ufc/ml; pantoeasp. 200 ufc/ml
10	pantoea 260 ufc/ml	cocos grampositivos 70 ufc/ml	Klebsiella pneumoniae 20 ufc/ml; Pseudomonas aeruginosa 100 ufc/ml	K. pneumoniae 40 ufc/ml

Por último, dentro de los métodos físicos se encuentra la centrifugación de coloides modificados con tubos de centrífuga con un tubo estrecho insertado (Imagen 2), el cual permite eliminar el sedimento sin que entre en contacto con el sobrenadante ya que hay riesgo durante la manipulación de volver a contaminar la muestra. Estos tubos se comercializan actualmente para tubos de centrífuga de 15 ml pero no son muy utilizados (Gonçalves, 2012).



Imagen 2. Eliminación del sedimento con un tubo estrecho insertado en el tubo de centrífuga (Morrell et al., 2013).

## 5.2. Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAM) son secuencias de 10-50 aminoácidos que participan en la respuesta primaria de defensa de los seres vivos frente a patógenos como las bacterias o parásitos, siendo por tanto los principales componentes de la respuesta inmunitaria innata. En los mamíferos se encuentran en aquellas zonas más susceptibles de sufrir infecciones por los patógenos como son la piel o mucosas (Jenssen, Hamill y Hancock, 2006). El mecanismo de acción de estos péptidos consiste en dañar la estructura de la membrana del patógeno creando poros intra-membranales en la bicapa lipídica provocando la lisis y la muerte (Olascoaga et al., 2019).

Existen diferentes péptidos en función del organismo frente al que actúan; en primer lugar, los péptidos antifúngicos, de los cuales se han identificado alrededor de 100 la mayoría de ellos de origen natural, entre los que destacan las defensinas, aisladas en animales, plantas e insectos (Olascoaga et al., 2019). En segundo lugar, se encuentran los péptidos antivirales capaces de actuar directamente o sobre alguna etapa del ciclo de los virus como la replicación, la transcripción, etc... La principal ventaja que ofrecen son su baja toxicidad y pocos efectos secundarios. En este grupo encontramos la cecropina y melitina ambos con acción antiviral y también antibacteriana frente a Gram negativos (Olascoaga et al., 2019). Por último, los péptidos antibacterianos como alternativa al uso de antibióticos debido el aumento de las resistencias antimicrobianas. Éstos suelen actuar en la permeabilización de la membrana plasmática, sobre el metabolismo bacteriano o sobre las funciones del ADN y las proteínas de las bacterias. En los humanos se han aislado péptidos con capacidad bacteriostática y bactericida frente a diferentes microorganismos. Un ejemplo de ello son las lactoferrinas, las cuales son producidas por las células del epitelio de las mucosas con poder de actuación frente a *Lysteria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus stearothermophilus* (Olascoaga et al., 2019).

Las bacterias presentan una membrana rica en lípidos y cargada negativamente, mientras que los PAM presentan una carga catiónica y son anfipáticos, razón por la que tienen una actividad específica frente a las bacterias. Las interacciones electrostáticas que se producen promueven la acumulación de péptidos catiónicos en la membrana de las bacterias produciendo en éstas cambios en su conformación y como consecuencia su destrucción (Schulze et al., 2014).

En el ámbito de la reproducción y específicamente en las dosis seminales porcinas, los requisitos que deben cumplir estos péptidos son los siguientes: amplio espectro frente a patógenos, baja capacidad de crear resistencias, de fácil aplicación, asequibles económicamente, que no causen toxicidad espermática y que sean funcionales a las

temperaturas de conservación seminal (Gómez-Coronado, 2018). En el año 2014, Speck et al. analizaron el efecto de dos péptidos cíclicos y catiónicos (c-WWW y c-WFW) y un análogo de amida de magainina II helicoidal catiónica (MK5E) incluidos en las dosis refrigeradas de verraco frente a 2 bacterias Gram positivas y 11 Gram negativas (incluyendo *E. coli* multirresistente). Todos los PAM mostraron efectividad frente a la mayoría de las bacterias a excepción de *Proteus spp.* (resistente frente a todos PAM) y *Staphylococcus aureus* (resistente frente a MK5E) (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) establecidas para péptidos catiónicos sintéticos frente a bacterias (Speck et al., 2014).

bacterias	CIM (mM) determinadas para		
	c-WFW	c-WWW	MK5E
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6.3–12.5	50	25–50
<i>Escherichia coli</i> DH5a	6.3	12.5–25	25–50
<i>Escherichia coli</i> (hemolítica)	6.3–12.5	50	25–50
<i>Escherichia coli</i> 26	12.5	25–50	50
<i>Escherichia coli</i> 629	6.3	25	25
<i>Escherichia coli</i> 2078	12.5	25	50
<i>Escherichia coli</i> 2715	12.5	25	25
<i>Enterobacter cloacae</i>	25	25	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12.5–25	25–50	50
<i>Proteus mixofaciens</i>	.100	.100	.100
<i>Proteo vulgar</i>	.100	.100	.100
<i>Bacilo subtilis</i> DSM 347	6.3	6.3	6.3–12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	25	50	.100

Además, también demostraron que los péptidos c-WWW y c-WFW junto con una pequeña cantidad de gentamicina eran más efectivos frente al crecimiento bacteriano. La sustitución completa de los antibióticos por los péptidos quizás no sea posible, pero se podría reducir la cantidad de éstos y con ello limitar la creación de cepas multirresistentes (Speck et al., 2014) (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) establecida para gentamicina vs. gentamicina combinada con los péptidos c-WWW (2 mM) y MK5E (1 mM) (Speck et al., 2014).

bacterias	CIM (mg/ml) determinada para gentamicina	CIM (mg/mL) determinada para gentamicina cuando se combina con	
		c-WWW (2 mM)	MK5E (1 mM)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,45–0,9*	0,6–0,7	0,6–0,8
<i>Escherichia coli</i> DH5a	0.113	0,3–0,5	0,2–0,5
<i>Escherichia coli</i> (hemolítica)	0,45	0,8–0,9	0,9
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,113–0,225	0,2–0,4	0,3–0,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,225–0,45	0,4–0,7	0,5–0,6
<i>Proteus mixofaciens</i>	0,45–0,9	0,7–0,9	0,7–0,9
<i>Proteo vulgar</i>	0,45	0,6–0,8	0,5–0,8
<i>Bacilo subtilis</i> DSM 347	0.113	0,05–0,1	0.1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0,225–0,7*	0,6–0,7	0,5–0,6

Posteriormente, Bussalleu et al. (2017) determinaron el poder antibacteriano de otros péptidos como PR-39 (rico en prolina y arginina), PMAP-36 y PMAP-37 (péptidos mieloides porcinos). Los resultados indicaron que el PMAP-37 a una concentración de 3 mM podría ser una opción de reemplazo de los antibióticos en los diluyentes seminales por su baja interferencia en la calidad espermática y por su capacidad de control bacteriano. Además, el mismo grupo de investigación determinó que el péptido protegrina 1 (PG1) solo era capaz de controlar el crecimiento bacteriano en dosis seminales refrigeradas porcinas cuando era utilizado a concentraciones altas produciendo un efecto citotóxico (Sancho et al., 2017). De manera que es necesario seguir investigando sobre el uso de este péptido como reemplazo a concentraciones intermedias o bajas ya que actualmente no se ha demostrado su completa eficacia. Recientemente, Puig et al. (2018) evaluaron dos péptidos diferentes, las defensinas 1 y 2 porcinas como antimicrobianos, así como su efecto sobre la calidad seminal. Los resultados demostraron que las concentraciones de 1,5 y 3 mM en ambos permitían mantener la funcionalidad espermática y eran efectivos en el control de crecimiento bacteriano. Sin embargo, antes del uso comercial, es importante seguir investigando los efectos sinérgicos entre los PAM y con los antibióticos, así como el impacto sobre los parámetros y rendimientos reproductivos.

### 5.3. Sustancias naturales bioactivas

Actualmente, hay un incremento en la utilización de productos naturales para usos medicinales, farmacéuticos o veterinarios. Las sustancias naturales son un grupo complejo de

estructuras que han evolucionado para interactuar con una amplia variedad de dianas proteicas con fines específicos. Pueden tener efectos antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos, protectores de diferentes órganos y sistemas e incluso antimicrobianos frente a una amplia gama de microorganismos (Omonijo et al., 2018). Este tipo de compuestos suelen tener menos efectos adversos, relativamente bajo coste, amplia aceptación debido a sus aplicaciones tradicionales, capacidad de renovación y mejor biodegradabilidad (Cantón y Morosini, 2011). Existen numerosos extractos naturales que pueden ser obtenidos de diferentes partes de las plantas mediante diversas técnicas en función del compuesto de elección.

Un ejemplo de ello son el ácido gálico y sus ésteres (galatos) los cuales son extraído de la corteza de roble, té verde o negro, la granada y otras plantas y frutas, así como el timol, el carvacrol, el eugenol o el ácido rosmarínico que tienen propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Mazurova et al., 2016). Es por ello que se analizó su efecto frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas en a las dosis seminales porcinas. Las sustancias naturales más eficaces fueron timol y carvacrol con valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) en el rango de 300-600 µg/ml. El ácido gálico tuvo una buena actividad antibacteriana contra cepas de *P. aeruginosa* (valores de CMI de 300-2400 µg/ml), mientras que los rangos de valores de MIC contra *E. coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus sp.* eran más altos. El galato de octilo exhibió una actividad antibacteriana mayor contra estafilococos y enterococos (valores de CMI de 18.8-75 µg/ml) que contra las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Las combinaciones de algunos de ellos como el timol con el carvacrol mostraron ser los más eficaces frente a bacterias que con frecuencia son resistentes a muchos antimicrobianos como son los enterococos (CMI 75-300:150, timol:carvacrol) y *P. aureginosa* (CMI 75-300:300, timol:carvacrol), además son los compuestos que mostraron tener una menor toxicidad sobre la calidad espermática.

Por otra parte, también existen fito-extractos como los aceites esenciales con actividad antibacteriana, cuyo mecanismo de actuación completo a día de hoy todavía no se conoce con exactitud, aunque sí que hay conocimiento acerca de su interacción y efecto sobre la membrana citoplasmática y la disminución en la síntesis de ATP bacteriano (Nazzaro et al., 2013).

Elmi et al. en 2019 determinaron el poder antimicrobiano de dos aceites esenciales: el árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) y el romero (*Rosmarinus officinalis*) ambos ya evaluados en relación a su toxicidad espermática en otro estudio realizado por los mismos autores (Elmi et al., 2017). Los resultados mostraron que ambos aceites a una concentración de 0,4 mg/ml tenían un efecto similar a la ampicilina que utilizaron como muestra control. También se observó que el árbol del té a una menor concentración tiene mayor eficacia que el romero.

La actividad sinérgica usando aceites esenciales mostró una reducción de la dosis mínima efectiva de antibióticos en el tratamiento de infecciones. Es por ello que la combinación de sustancias naturales tiene un efecto aditivo, que podría llegar a utilizarse para el control bacteriano del semen porcino.

## 5.4. Otras alternativas

### 5.4.1. Conservación sin antibióticos a 5 °C

Para aumentar la vida útil de un eyaculado, éste deber ser diluido y almacenado a temperaturas de refrigeración. En el caso del porcino, debido a la especial composición de ácidos grasos y colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide hace menos recomendable su conservación a 5 °C para evitar su alteración. Es por ello, que las dosis seminales porcinas son conservadas a 17 °C hasta su utilización. El almacenamiento hipotérmico del semen podría ser otra alternativa al uso de antibióticos, ya que limitaría en gran medida el crecimiento bacteriano.

Es por ello que Jakel et al. (2021) compararon el crecimiento bacteriano entre muestras seminales porcinas almacenadas a 17 °C con antibióticos y otras almacenadas a 5 °C sin antibióticos. Se utilizaron muestras de semen de 9 verracos sexualmente activos y se dividieron en 3 grupos: en el primero se diluyó el eyaculado con diluyente AndroStar Premium sin antibióticos; en el segundo se utilizó el mismo diluyente con antibióticos; y en el último el diluyente BTS con antibióticos, el cual se utilizó como muestra control al ser el medio más usado en IA porcina. Las muestras que incluían los antibióticos se almacenaron a 17 °C, mientras que las que no los llevaban se almacenaron a 5 °C. Todas ellas se evaluaron a las 24 h, 72 h y 144 h.

Los resultados obtenidos demostraron que las muestras sin antibióticos tuvieron un mayor crecimiento de bacterias en las primeras 24 h, aunque en las suplementadas con antibióticos también aumentaron, pero en menor medida. Hay que destacar que entre las 24 y 72 h hubo una disminución de la contaminación bacteriana en todas muestras, decreciendo en mayor medida en las muestras que contenían antibiótico (Imagen 3). Los niveles de contaminación bacteriana en las muestras sin antibióticos fueron siempre menores de  $10^3/10^4$  UFC/ml, límite que se considera perjudicial para la calidad seminal.

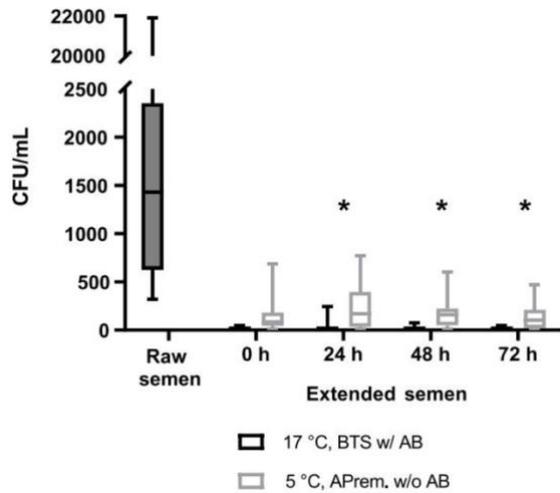


Imagen 3. Niveles bacteriológicos en eyaculados, muestras diluidas en BTS con antibióticos conservadas a 17 °C y muestras diluidas en AndroStar Premium sin antibióticos conservadas a 5 °C en un periodo de tiempo marcado a las 0 h, 24 h, 48 h y 72 h (Jäkel et al., 2021).

El estudio concluyó que el almacenamiento a 5 °C sin antibióticos puede ser una alternativa potencial a la conservación actual con antibióticos, sin embargo, son necesarias medidas de higiene muy estrictas y un seguimiento sanitario de los animales para evitar la entrada de patógenos a las dosis seminales.

#### 5.4.2. Nanopartículas

Las nanopartículas son partículas microscópicas con un tamaño entre 1-100 nanómetros. Actualmente se utilizan en el ámbito de la medicina con diversas aplicaciones; han servido de diagnóstico de tumores y metástasis en órganos como hígado, bazo o ganglios linfáticos, también se han utilizado de manera terapéutica para tratar enfermedades como la anemia o de forma conjunta como diagnóstico y terapia en pacientes con cáncer de tiroides (Dadfar et al., 2019).

Dentro de la variedad de nanopartículas que existen, las de plata (AgNPs) han sido las más estudiadas. Su mecanismo antibacteriano no está del todo definido, pero si se sabe que tiene una actuación a 3 niveles: el primero es a través de la liberación de iones de plata que inhiben la replicación de ADN y la producción de adenosin trifosfato (ATP), siendo ambos necesarios para la vida celular. El segundo mecanismo es la generación de un daño sobre la membrana celular; y, por último, la producción de especies reactivas de oxígeno que producen estrés y muerte celular (Betancur, Hernández y Buitrago, 2016).

Es por ello que se ha determinado la toxicidad de las AgNPs en las dosis seminales porcinas y su capacidad inhibitoria frente al crecimiento bacteriano de *S. aureus* concretamente. En el estudio se añadieron las siguientes concentraciones de AgNPs: 2, 4, 10 y 20 mM y se utilizó

como controles los siguientes antibióticos: estreptomycin, amikacin y tetracycline. Una concentración de 2 mM de AgNPs era capaz de controlar el crecimiento de *S. aureus* de forma muy similar al de los antibióticos estreptomycin y amikacin (Imagen 4). Además, se determinó que las AgNPs no eran citotóxicas en los espermatozoides de verraco, ya que no afectaban a la motilidad ni a la viabilidad espermática (López et al., 2017).

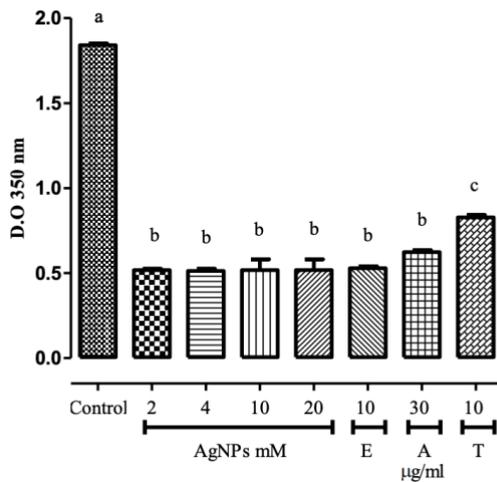


Imagen 4. Crecimiento de *S. aureus* con diferentes concentraciones aplicadas de AgNPs a 2, 4, 10 y 20 mM en comparación con antibióticos como estreptomycin (E), amikacin (A), y tetracycline (T). Valorado mediante la lectura de turbidez a 350nm (López et al., 2017).

Otras nanopartículas en las que se ha evaluado su poder antimicrobiano son las de óxido de hierro ( $Fe_3O_4$ ), las cuales tienen menos probabilidades de desarrollar resistencias microbianas, así como capacidad de inhibición en la formación de biofilms. El mecanismo de acción se debe a la presencia de radicales libres que son tóxicos para las membranas bacterianas al modificarlas electrostáticamente y producir un estrés químico y, en consecuencia, un daño bacteriano.

Tsakmakidis et al. (2020) determinaron que la utilización de nanopartículas de  $Fe_3O_4$  no afectaba a la calidad espermática cuando eran incluidas en las dosis seminales. Además, esas nanopartículas disminuyeron el crecimiento bacteriano en las muestras, aunque no llegaban a eliminarlo por completo. Hubo bacterias como los estafilococos que mostraron mayor sensibilidad y, por tanto, hubo menor concentración en las muestras tratadas con  $Fe_3O_4$  (Tabla 5). Sin embargo, otras como las enterobacterias o enterococos apenas mostraron diferencias.

Tabla 5. Microorganismos aislados en muestras seminales de verraco tras incubarlas en agar sangre 24 y 48 h con nanopartículas de óxido de hierro (Tsakmakidis et al., 2020).

Variable	Control	Fe	Difference (Control-Fe)	p-Value
Blood Agar 24 h	558 ± 455	443 ± 381	115 ± 103	0.03
Blood Agar 48 h	779 ± 651	616 ± 515	164 ± 150	0.03
<i>Staphylococcus</i> spp	314 ± 411	251 ± 380	63 ± 92	0.06
<i>Enterococcus</i> spp	5.4 ± 7.6	4.5 ± 8.7	0.9 ± 7.9	0.72
Enterobacteriaceae	69.9 ± 106.6	60.1 ± 86.5	9.8 ± 27.5	0.29

No obstante, es necesario realizar estudios sobre su efecto en la oxidación espermática y sobre la fertilidad en la cerda (Armijo et al. de 2020)

#### 5.4.3. Probióticos

Los eyaculados de verracos sanos contienen una carga bacteriana fisiológica procedente del tracto reproductor del macho que suele ser de  $10^3$ - $10^4$  UFC/ml (Althouse y Lu, 2005). Dentro de estas bacterias hay un grupo de comensales que no tienen una repercusión negativa, las bacterias ácido lácticas (BAL), entre las que se incluyen algunos géneros como *Lactobacillus*, *Lactococcus* o *Streptococcus*. Las BAL tienen efectos positivos sobre la microbiota intestinal o genital de especies como la cerda o la mujer. Sin embargo, hasta el año 2018 no se estudió su efecto sobre la calidad espermática. Schulze et al. (2018) aislaron e identificaron por primera vez las BAL presentes en el eyaculado de verraco y, además, analizaron la supervivencia de este tipo de bacterias en los diluyentes seminales porcinos y los efectos sobre los parámetros de calidad seminal o crecimiento bacteriano. Los resultados indicaron que este tipo de bacterias a las concentraciones analizadas no eran capaces de controlar el crecimiento bacteriano durante el almacenamiento de las dosis seminales.

#### 5.4.4. Bactibag

La empresa IMV Technologies es una de las compañías referentes en el mercado de la tecnología de la reproducción a nivel internacional. Recientemente, ha desarrollado un sistema de envasado seminal con capacidad bacteriostática para controlar la proliferación bacteriana sin utilizar antibióticos. Se trata de un recubrimiento con una molécula bacteriostática en la parte interna de la bolsa de almacenaje de la dosis seminal en lugar de estar diluida en el medio. La

concentración del antibacteriano es la óptima para evitar la proliferación bacteriana y para no interferir en la calidad espermática.

La tecnología que permite llevar a cabo esta actividad se llama BactiGuard, la cual presenta dos mecanismos de acción: el primero consiste en interrumpir en la estructura de la membrana de las bacterias deteniendo así su crecimiento, y la otra forma de actuar es aumentando la permeabilidad de las membranas de bacterias Gram negativas para una mayor penetración del agente antimicrobiano. Al impedir que haya crecimiento bacteriano de forma indirecta también se evita la liberación de posibles toxinas bacterianas.

Los rendimientos que se han obtenido tras los estudios *in vitro* reflejan un 97 % de reducción de bacterias, un 32 % menos de endotoxinas, permitiendo una conservación de las dosis seminales de hasta 6 días (IMV-Technologies, 2018).

#### 5.4.5. Diluyente comercial sin antibióticos

En la preparación de dosis seminales en la IA porcina se ha estandarizado la adición de antibióticos a los diluyentes de semen. Sin embargo, algunos de los diluyentes más utilizados en el semen de verraco como el BTS, tienen una composición basada en glucosa y sales con un sistema de tampón bicarbonato y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) que les proporciona ciertas propiedades antimicrobianas. Éste poder antibacteriano puede verse aumentado cuando es combinado con el uso de antibióticos (Luther et al., 2021).

Actualmente no es posible una eliminación completa de los antimicrobianos en dosis seminales porcinas almacenadas a 17 °C, pero sí que parece viable una reducción de los mismos al 50 %, ya que controlan de forma eficaz el crecimiento bacteriano debido a las características antibacterianas de algunos componentes de los diluyentes (Luther et al., 2021).

## 6. Conclusiones

- El uso de medidas higiénicas durante la extracción del semen, así como la identificación de los puntos críticos de contaminación de este proceso, reducen de manera considerable la carga microbiana del semen y, por tanto, su contaminación.
- La centrifugación coloidal disminuye la carga bacteriana del eyaculado, pero, debido al coste del producto y al tiempo de procesado, no es una técnica que se aplique comercialmente.
- Algunos péptidos antimicrobianos inhiben la multiplicación bacteriana pero también pueden presentar efectos negativos sobre la calidad espermática.
- A día de hoy, a pesar de las alternativas que se han estudiado no existe ninguna que permita el reemplazo de los antibióticos de forma completa. A falta de datos de fertilidad, podría ser factible una reducción de su concentración al combinarlos con algunas de estas alternativas.

## Conclusions

- The use of hygienic measures during the extraction of semen, as well as the identification of the critical contamination points of this process, will allow to reduce considerably the microbial load of semen and, therefore, its contamination.
- Colloidal centrifugation decreases the bacterial load of ejaculate but, due to the cost of the product and the processing time, it is not a technique that is applied commercially.
- Some antimicrobial peptides inhibit bacterial multiplication but may also have negative effects on sperm quality.
- Today, despite the alternatives that have been studied, there is no one that allows the replacement of antibiotics completely. In the absence of fertility data, a reduction in their concentration may be feasible by combining them with some of these alternatives.

## 7. Valoración personal

La realización de este trabajo me ha permitido ser consciente del panorama de resistencias bacterianas al que nos enfrentamos y ver la gran responsabilidad que tenemos de aquí en adelante el personal sanitario tanto animal como humano sobre el uso responsable de los antibióticos ya que puede tener todavía una mayor repercusión sobre la Salud Pública.

Con respecto al mundo de la reproducción porcina, he visto la movilización que se está llevando a cabo en el sector para poder empezar a utilizar algunas de las alternativas frente a los antimicrobianos. A pesar de que queda camino por recorrer en la investigación de estas, cada vez parece ser que estamos más cerca de dar con la solución.

Por otro lado, el realizar un trabajo como esta revisión bibliográfica ha sido un reto a la hora de tener que buscar información de calidad, contrastarla y generar mi punto de vista personal.

Este trabajo ha sido realizado gracias a la ayuda, el trabajo y el tiempo dedicado por mis tutores Victoria Luño y José Ignacio Martí.

## 8. Bibliografía

- Althouse, G.C., Kuster, C.E., Clarck, S.G. y Weisiger, R.M. (2000). "Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen". *Theriogenology*, 53(5), pp. 1167–1176. DOI: 10.1016/S0093-691X(00)00261-2.
- Althouse, G.C. y Lu, K.G. (2005). "Bacteriospermia in extended porcine semen". *Theriogenology*, 63(2), pp. 573–584. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.031.
- Althouse, G. C., Pierdon, M. S. y Lu, K.G. (2008). "Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen". *Theriogenology*, 70(8), pp. 1317–1323. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.07.010.
- Armijo, L., Wawrzyniec, S., Kopciuch, M., Brandt, Y., Rivera, A., Withers, N., Cook, N., Huber, D., Monson, T., Smyth, H. y Osinski, M. (2020). "Antibacterial activity of iron oxide, iron nitride, and tobramycin conjugated nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms". *Journal of Nanobiotechnology*, 18 (1), p. 35. DOI: 10.1186/s12951-020-0588-6.
- Betancur, C. P., Hernández, V. y Buitrago, R. (2016). "Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio". *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35 (4). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002016000400009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002016000400009) [Consultado 10-06-22].
- Björnsdotter, Y., Morrell, J.M. y González, R. (2013). "Single layer centrifugation-selected boar spermatozoa are capable of fertilization *in vitro*". *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(20). DOI: 10.1186/1751-0147-55-20.
- Bussalleu, E., Sancho, S., Briz, M., Yeste, M. y Bonet, S. (2017). "Do antimicrobial peptides PR-39, PMAP-36 and PMAP-37 have any effect on bacterial growth and quality of liquid-stored boar semen?", *Theriogenology*, 89, pp. 235–243. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.11.017.
- Cancho, B., García, M. y Simal, J. (2000). "El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual", *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3(1), pp. 39–47. DOI: 10.1080/11358120009487647.
- Cantón, R. y Morosini, M. I. (2011). "Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics". *FEMS Microbiology Reviewers*, 35(5), pp. 977-91. DOI: 0.1111/j.1574-6976.2011.00295.x.

- Costinar, L., Herman, V., Pitoiu, E., Iancu, I., Degi, J., Hulea, A. y Pascu, C. (2021). "Boar semen contamination: Identification of gram-negative bacteria and antimicrobial resistance profile". *Animals*, 12(1), pp. 43. DOI: 10.3390/ani12010043.
- Cuenca, M. y Avellaneda, J. (2017). "Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina." *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 18 (9), pp.1-11. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63653009012>. [Consultado 3-05-2022].
- Dadfar, S. M., Roemhild, K., Drude, N.I., Stillfried, S., Knüchel, R., Kiessling, F. y Lammers, T. (2019). "Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications", *Advanced drug delivery reviews*, 138, pp. 302–325. DOI: 10.1016/j.addr.2019.01.005.
- Díaz, I. (2000). Análisis diagnóstico del sector porcino chileno como productor de alimento. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Disponible:<https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131026/Efecto-de-la-concentraci%C3%B3n-esperm%C3%A1tica-por-dosis-en-dos-protocolos>. (Consultado 02-02-2022).
- Elmi, A., Ventrella, D., Barone, F., Filippini, G., Benvenuti, S., Pisi, A., Scozzoli, M. y Bacci, M.L. (2017). "*Thymbra capitata* (L.) Cav. and *Rosmarinus officinalis* (L.) essential oils: *in vitro* effects and toxicity on swine spermatozoa". *Molecules*, 22(12), pp. 2162. DOI: 10.3390/molecules22122162.
- Elmi, A., Prosperi, A., Zannoni, A., Bertocchi, M., Scorpio D. G., Forni, M., Foni, E., Bacci, M.L. y Ventrella, D. (2019). "Antimicrobial capabilities of non-spermicidal concentrations of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on the liquid phase of refrigerated swine seminal doses", *Research in veterinary science*, 127, pp. 76–81. DOI: 10.1016/j.rvsc.2019.10.014.
- EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products). (1995). Oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline. Summary report. EMEA/MRL/023/95-FINAL. Disponible en: <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/002395en.pdf> [Consultado 29-05-2022].
- Errecalde, J. (2004). "Uso de antimicrobianos en animales de consumo". *Estudio FAO: Producción y Sanidad Animal (FAO)*, 1014-1200, pp. 7-26. Disponible en: <https://www.fao.org/3/y5468s/y5468s.pdf> [Consultado 02-02-2022].
- Falcón, N., Ortega, C., Gorniak, S., Villamil, L. C., Ríos, C. y Simón, M. (2010). "El problema de la resistencia a antibióticos en salud pública". Una Salud. *Revista Sapuvet de Salud Pública*, 1(1), pp. 1-14. Disponible en <https://ciencia.lasalle.edu.co/us/vol1/iss1/6/> [Consultado 14-02-2022].

- Gimeno, O. y Ortega, C. (2005). “Antibióterapia y salud pública veterinaria; desarrollo de microorganismos resistentes, mecanismos de resistencia y estrategias para el uso prudente de antibióticos”, *A problemática dos resíduos medicamentosos e contaminantes em produção animal e Saúde Pública*. Universidad de Évora, Polo da Mitra, Évora (Portugal). Disponible en: [https://www.sapuvetnet.org/antigo/Pdf%20Files/antib\\_portugal.pdf](https://www.sapuvetnet.org/antigo/Pdf%20Files/antib_portugal.pdf) (Consultado 02-02-2022).
- Gómez- Coronado, M.T. (2018). *Estudio de nuevos métodos de conservación seminal en el verraco*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Cáceres. Disponible en: <https://dehesa.unex.es/handle/10662/7966> [Consultado 2-04-2022].
- Gonçalves, A.P. (2012). “Factores de riesgo de contaminación de las dosis seminales: cómo optimizar la higiene en la recogida y procesamiento del eyaculado”. *Avances en Tecnología Porcina*, 9 (90), pp. 26-32.
- Gratacós, M. (2008). *Desarrollo de métodos rápidos para el análisis de residuos en producción animal*. Tesis de Doctorado. Universidad de Girona. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10803/7931> [Consultado 02-02-2022].
- IMV-Technologies (2018). Imv-Technologies. Disponible en: <https://www.imv-technologies.es/producto/bacti-bag-1>. [Consultado 31-05-2022].
- Jäkel, H., Scheinpflug, K., Mühlendorfer, K., Gianluppi, R., Schardong, M., Gonçalves A. P., Pandolfo, F. y Waberski, D. (2021). “*In vitro* performance and *in vivo* fertility of antibiotic-free preserved boar semen stored at 5 °C”. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 12(1), pp. 9. DOI: 10.1186/s40104-020-00530-6.
- Jenssen, H., Hamill, P. y Hancock, R. (2006). “Peptide antimicrobial agents”. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), pp. 491–511. DOI: 10.1128/CMR.00056-05.
- López, R., Acosta, L.S., Serrano, P., Avilés, Y.S., Toscano, I. A., Olivo, I. B., Pérez, F. y Núñez, R.E. (2017). “Las nanopartículas de plata impiden el crecimiento bacteriano sin efectos tóxicos en el semen de cerdo”. *AICA*, 10, pp. 34-40. Disponible en: <https://aicarevista.ijimdo.com/n%C3%BAmeros/vol%C3%BAmen-10-2017/>. [Consultado: 23—05-2022].
- Luther, A.M., Nguyen, T.Q., Verspohl, J. y Waberski, D. (2021). “Antimicrobially active semen extenders allow the reduction of antibiotic use in pig insemination”. *Animals*, 10(11), pp. 1319. DOI: 10.3390/antibióticos10111319.
- Maroto, L.O., Cruz, E., De Cupere, F., Van Driessche, E., Echemendia-Blanco, D., Machado, J-M. y Beeckmans, S. (2010). “Bacterial contamination of boar semen affects the litter size”. *Animal Reproduction Science*, 120 (1–4), pp. 95–104. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2010.03.008.

- Martinez, M. J., Morrel, J. M., Gil, M. A., Barranco, I., Maside, C., Alkmin, D. V., Parrilla, I., Martinez, E. y Roca, J. (2013). "Suitability and effectiveness of single layer centrifugation using Androcoll-P in the cryopreservation protocol for boar spermatozoa". *Animal Reproduction Science*, 140(3–4), pp. 173–179. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2013.06.015.
- Mazurova, J., Kukla, R., Rozkot, M., Lustykova, A., Slehova, E., Sleha R., Lipensky, J. y Opletal, L. (2016). "Use of natural substances for boar semen decontamination". *Veterinarni Medicina*, 60(5), pp. 235–247. DOI: 10.17221/8175-vetmed.
- Mesonero, S. (2020). "Reducción de antibióticos desde una perspectiva One Health". *PorciNews, la revista global del porcino*, 40, pp. 62-68. Disponible en: <https://porcino.info/reduccion-antibioticos-desde-perspectiva-one-health/> [Consultado 14-02-2022].
- Morrel J.M., Saravia F., Van Wiene, M., Wallgren, M. y Rodriguez-Martinez, H. (2009). "Selection of boar spermatozoa using centrifugation on a glycidoxypropyltrimethoxy-silane-coated silica colloid". *The Journal of Reproduction and Development*, 55(5), pp. 547-552. DOI: 10.1262/jrd.20243.
- Morrell, J.M. y Wallgren, M. (2011). "Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders". *Animal Reproduction Science*, 123(1–2), pp. 64–69. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2010.11.005.
- Morrell, J.M., Timoney, P., Klein, C., Shuck, K., Campos, J., Troedsson, M. (2013). "Single-layer centrifugation reduces equine arteritis virus titre in the semen of shedding stallions". *Reproduction in domestic animals*, 48(4), pp. 604–612. DOI: 10.1111/rda.12133.
- Morrell, J.M. y Wallgren, M. (2014). "Alternatives to antibiotics in semen extenders: a review", *Pathogens*, 3(4), pp. 934–946. DOI: 10.3390/pathogens3040934.
- Morrell, J.M. (2019) "Effect of colloid centrifugation on boar sperm quality during storage and function *in vitro* fertilization". *Theriogenology*, 137, pp. 122–126. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.046.
- Munita, J.M. y Arias, C.A. (2016). "Mechanisms of antibiotic resistance". *Microbiology spectrum*, 4(2), pp. 125-130. DOI: 10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R. y De Feo, V. (2013). "Effect of essential oils on pathogenic bacteria". *Pharmaceuticals*, 6(12), pp. 1451–1474. DOI: 10.3390/ph6121451.
- O'Neill, J. (2016). "Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations". *Review on Antimicrobial Resistance*, 25, pp. 1-84. Disponible en: <https://apo.org.au/sites/default/files/resource-files/2016-05/apo-nid63983.pdf> [Consultado: 2-06-2022]

- Olascoaga, K. S., Sánchez, G., Carmona, I., Galicia, M., Gómez, A., Islas, S.J. y Castañeda, J. (2019). “Péptidos antimicrobianos, una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas”. *Karger Kompass Neumología*, 1(1), pp. 15–21. DOI: 10.1159/000501946.
- Omonijo, F.A., Ni, L., Gong, J., Wang, Q., Lahaye, L. y Yang, C. (2018). “Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production”. *Animal Nutrition*, 4(2), pp.126-136. DOI: 10.1016/j.aninu.2017.09.001.
- Oromí, J. (2000). “Resistencia bacteriana a los antibióticos”. *Medicina Integral*, 36(10), pp. 367–370. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-resistencia-bacteriana-antibioticos-10022180> [Consultado: 25-05-2022].
- Puig, A., Castillo, M., Pereira, B., Pinart, E., Bonet, S. y Yeste, M. (2018). “Evaluation of porcine beta defensins-1 and -2 as antimicrobial peptides for liquid-stored boar semen: Effects on bacterial growth and sperm quality”. *Theriogenology*, 111, pp. 9–18. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.01.014.
- Real Decreto 1246/2008, de 18 de julio, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y farmacovigilancia de los medicamentos veterinarios fabricados industrialmente. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2008-13682>. [Consultado 02-02-2022].
- Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo de 9 de marzo de 2016 relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal (“Legislación sobre sanidad animal”). Diario oficial de la Unión Europea. 31 de marzo de 2016. [Consultado: 02-02-2022].
- Sancho, S., Briz, M., Yeste, M., Bonet, S. y Bussalleu, E. (2017). “Effects of the antimicrobial peptide protegrin 1 on sperm viability and bacterial load of boar seminal doses”. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(4), pp. 69–71. DOI: 10.1111/rda.13061.
- Schulze, M., Junkes, C., Mueller, P., Speck, S., Ruediger, K., Dathe, M. y Mueller, K. (2014). “Effects of cationic antimicrobial peptides on liquid-preserved boar spermatozoa”. *PLoS one*, 9(6), pp. 35-40. DOI: 10.1371/journal.pone.0100490.
- Schulze, M., Ammon, C., Rüdiger, K., Jung, M. y Grobbel, M. (2015). “Analysis of hygienic critical control points in boar semen production”. *Theriogenology*, 83(3), pp. 430–437. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.10.004.
- Schulze, M., Schäfer, J., Simmet, C., Jung, M. y Gabler, C. (2018). “Detection and characterization of *Lactobacillus spp.* in the porcine seminal plasma and their influence on boar semen quality”. *PLoS one*, 13(9), pp. e0202699. DOI: 10.1371/journal.pone.0202699.

- Sorarrain de Pedro, N. (2020). *Efectos de un tratamiento antibacteriano sin antibióticos sobre la calidad de las dosis seminales de cerdo*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de León. Disponible en: <https://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/1751-0147-55-20#citeas> [Consultado 16-03-2022].
- Speck, S., Courtiol, A., Junkes, C., Dathe, M., Müller, K. y Schulze, M. (2014). "Cationic synthetic peptides: assessment of their antimicrobial potency in liquid preserved boar semen". *PLoS One*, 9(8), pp. e105949 DOI: 10.1371/journal.pone.0105949.
- Tsakmakidis, I.A., Samaras, T., Anastasiadou, S., Basioura, A., Ntemka, A., Michos, I., Simeonidis, K., Karagiannis, I., Tsousis, G., Angelakeris, M. y Boscos C.M. (2020). "Iron oxide nanoparticles as an alternative to antibiotics additive on extended boar semen". *Nanomaterials*, 10(8), pp. 1568. DOI: 10.3390/nano10081568.
- *Topigs Norsvin* (2021). *AIM Ibérica presenta una parte de su trabajo sobre la reducción de antibióticos en la industria porcina*. Disponible en: <https://topignorsvin.es/news-es1/aim-iberica-presenta-una-parte-de-su-trabajo-sobre-la-reduccion-de-antibioticos-en-la-industria-porcina/> [Consultado: el 26-05-2022].
- Úbeda, C., Bucci, V., Caballero, S., Djukovic, A., Toussaint, N., Equinda, M., Lipuma, L., Ling, L., Gobourne, A., No, D., Taur, Y., Jenq, R., Van den Brink, M., Xavier, J. y Pamer, E. (2013). "Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization". *Infection and Immunity*, 81 (3), pp.965-973. DOI: 10.1128/IAI.01197-12.
- Wright, G.D. (2010) "The antibiotic resistome". *Expert opinion on drug discovery*, 5(8), pp. 779–788. DOI: 10.1517/17460441.2010.497535.