



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Alternativas sostenibles en inseminación artificial de équidos

Sustainable alternatives for equine artificial insemination

Autor/es

Marina Amela Moreno

Director/es

Lydia Gil Huerta/ Noelia González Ortí

Facultad de Veterinaria

2023

---

ÍNDICE:

---

1. RESUMEN/SUMMARY .....	4
2. INTRODUCCIÓN .....	5
2.1 LOS PLÁSTICOS QUE NOS RODEAN .....	5
2.2 EFECTOS DE LOS PLÁSTICOS SOBRE EL MEDIO AMBIENTE Y LA SALUD.....	6
2.3 ALTERNATIVAS AL USO DE PLÁSTICO .....	8
2.4 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN LA YEGUA .....	9
2.5 OBTENCIÓN DE MUESTRAS SEMINALES Y CONTRASTACIÓN SEMINAL.....	10
2.6 PRESERVACIÓN ESPERMÁTICA .....	11
2.7 ENVASES Y SISTEMAS DE SELLADO ALTERNATIVOS A LAS PAJUELAS TRADICIONALES .....	12
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	12
4. MATERIAL Y MÉTODO .....	13
4.1 MATERIALES .....	13
4.1.1. <i>Material biológico</i> .....	13
4.1.2. <i>Material laboratorial</i> .....	13
4.2. MÉTODO.....	14
4.2.1 <i>Material bibliográfico</i> .....	14
4.2.2 <i>Preparación de pajuelas y sistemas de sellado</i> .....	14
4.2.3 <i>Procesado del semen</i> .....	15
4.2.4 <i>Evaluación de la calidad espermática</i> .....	16
4.2.5 <i>Estudio estadístico</i> .....	17
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	17
6. CONCLUSIONES.....	22
7. VALORACION PERSONAL.....	23
8. BIBLIOGRAFÍA .....	24

## Índice de gráficos

GRÁFICO 1: CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS EN DIFERENTES TIPOS DE SELLADO Y CON ADICIÓN DE CALOSTRO.....	21
--	----

## Índice de figuras

FIGURA 1: DOSIS SEMINALES .....	13
FIGURA 2: DILUYENTE EQUIPLUS Y PLACAS PETRIFILM® AC Y PETRIFILM® EB .....	13
FIGURA 3: MATERIAL DE ENVASADO. PAJITAS DE SEMILLA DE AGUACATE BIOFASE.....	14
FIGURA 4: MATERIAL DE SELLADO. FILTROS DE TABACO BIODEGRADABLES RAW Y AGAR .....	14
FIGURA 5: EXPOSICIÓN DE LA PAJUELA AL CALOR.....	15
FIGURA 6: SELLADO TÉRMICO DE LA PAJUELA CON UN CLAMP INTESTINAL .....	15
FIGURA 7: PAJUELA DE AGUACATE TERMOSELLADA .....	15
FIGURA 8: CONTENIDO RECUPERADO EN RECIPIENTE VIDRIO .....	15
FIGURA 9: BOQUILLAS DE CELULOSA ESTÉRILES.....	15
FIGURA 10: BOQUILLA SELLANDO PAJUELA.....	15
FIGURA 11: AGAR ESTERILIZADO EN PLACA PETRI.....	15
FIGURA 12: AGAR SELLANDO LA PAJUELA .....	15
FIGURA 13: SISTEMA DE ANÁLISIS COMPUTERIZADO ISAS.....	16
FIGURA 14: PLACAS PETRIFILM® EN ESTUFA .....	16
FIGURA 15: DISEÑO EXPERIMENTAL.....	16

## Índice de tablas

TABLA 1: VALORES MEDIOS DE LOS PARÁMETROS SEMINALES .....	10
TABLA 2: EFECTO DEL TIEMPO SOBRE LAS VARIABLES DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA .....	18
TABLA 3: EFECTO DEL TIPO DE CIERRE DE LA PAJUELA SOBRE LAS VARIABLES DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA.....	19
TABLA 4: ASOCIACIÓN DEL CALOSTRO CON DISTINTAS VARIABLES DE CALIDAD ESPERMÁTICA.....	20
TABLA 5: ASOCIACIÓN DEL TIEMPO CON DISTINTAS VARIABLES DE CALIDAD ESPERMÁTICA .....	20

## **1. RESUMEN/SUMMARY**

---

La problemática ambiental, y más concretamente el uso masivo de plásticos, es una cuestión que se extiende a todos los ámbitos. El reciclaje de este material no supone una solución, y por lo tanto lo conveniente es reducir su uso o emplear alternativas biodegradables. En la reproducción equina se emplean muchos plásticos de un solo uso, desde los envases de recogida seminal hasta los catéteres de inseminación.

En este trabajo se plantea el uso de pajitas biodegradables de hueso de aguacate para sustituir las pajuelas tradicionales de plástico. Para ello se han estudiado dos tipos de sellado térmico junto con filtros de tabaco de celulosa biodegradable o agar. Estos dos métodos no han presentado diferencias significativas respecto a la calidad de la muestra y han mostrado un resultado favorable respecto al almacenaje de la dosis. No se han observado pérdidas de volumen tras mantener las muestras 72 horas en refrigeración (5°C). También se ha valorado la adición de un 20% de calostro de yegua al diluyente para determinar su efecto de este sobre las dosis seminales. Los resultados de calidad seminal de las muestras diluidas con calostro han sido negativos frente a las muestras sin calostro. Igualmente, se ha realizado un control microbiológico sobre las muestras seminales que no ha mostrado diferencias significativas ante el uso de boquilla y agar en el sellado; sin embargo, las muestras con calostro han tenido más crecimiento de microorganismos aerobios.

### **ABSTRACT**

---

The environmental problem, and more specifically the massive use of plastics, is an issue that extends to all areas. Recycling this material is not a solution, and therefore it is advisable to reduce the use of plastics or use biodegradable alternatives. Many single-use plastics are used in equine reproduction, from semen collection containers to insemination catheters. In this work, the use of biodegradable avocado pit straws is proposed to replace traditional plastic straws. To this end, two types of heat sealing with biodegradable cellulose tobacco filters or agar have been studied. These two methods have not presented significant differences regarding the quality of the sample and have shown a favorable result regarding the storage of the dose. No volume losses have been observed after keeping the samples refrigerated for 72 hours (5°C). A 20% mare colostrum solution has also been added to extender to assess its effect on the dose. The semen quality results of the samples diluted with colostrum have been negative compared to the samples without colostrum. Likewise, a microbiological control has been carried out on the seminal samples that has not shown significant differences with the use of tobacco filter or agar; however, the samples with colostrum have suffered more growth of aerobic microorganisms.

## 2. INTRODUCCIÓN

---

Cuando se piensa en la reproducción asistida, lo primero en lo que se considera como veterinarios son asuntos relacionados con la calidad seminal, los crioprotectores a emplear, la inseminación artificial o el momento del ciclo en que se encuentra la yegua. Sin embargo, hay una cuestión que, aunque no sea esencial para estos procesos, toma cada vez más relevancia en el contexto global de la problemática medioambiental, más específicamente, el uso de plástico que conllevan estas biotecnologías reproductivas.

Durante el desarrollo de técnicas científico-sanitarias se emplean incalculables cantidades de plásticos de un solo uso. No obstante, resulta imposible prescindir de ellos puesto que estos ofrecen propiedades que a otros materiales les cuesta ofrecer, como por ejemplo la flexibilidad, la transparencia, la biocompatibilidad, la facilidad de limpieza y desinfección, la resistencia, la ligereza, la asequibilidad económica... Por todo ello resulta complicado plantearse un mundo sin plástico. Sin embargo, esto implica proponer alternativas y una correcta gestión de residuos para evitar la contaminación medioambiental de la que este material es, en mayor medida, responsable. Actualmente, 8 millones de toneladas de plástico son arrojadas al mar por año, teniendo éstas un impacto devastador sobre la fauna y la flora e, indirectamente, sobre el ser humano.

En este trabajo se van a ofrecer alternativas al uso de plásticos en el ámbito de la inseminación artificial en la especie equina.

### 2.1 Los plásticos que nos rodean

La problemática del uso masivo de plásticos es ampliamente conocida; ante esto, el reciclaje de este material se presenta como un rayo de esperanza y una solución para acabar con las toneladas de residuos que se desechan diariamente.

El plástico obtenido del reciclaje es más barato en comparación con la materia prima, puesto que se necesita menor gasto energético para su producción. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el porcentaje de plástico que no puede reciclarse es muy alto, debido a que muchos están mezclados con otros residuos (resinas, aluminio y pegamentos), y a otras cuestiones que impiden su reutilización. Aun así, la cantidad de residuos debería quedar reducida en mayor medida (*d'Ambrières, 2019*) y la realidad es que no es así. Tan solo el 9% de los residuos plásticos se recicla, el 50% acaba en vertederos, el 19% se incinera y el 22% evade los sistemas de gestión y termina en entornos no controlados (*Retema, 2022*). Esto es debido a diversas cuestiones (*Syberg, 2022*):

- El plástico debe separarse para reciclarse. Esto encarece el proceso.
- El plástico reciclado suele tener peores propiedades que el virgen porque éste se ha degradado durante su uso y reacondicionamiento.
- Hay productos muy difíciles de reciclar ya que debido a su pequeño tamaño no resulta rentable seleccionarlos y reciclarlos.
- El diseño y color de determinados envases reducen el mercado de reciclado.
- Las características del plástico reciclado son variables, es difícil garantizar un producto de aspecto uniforme.

Por ello las multinacionales prefieren no usar materiales reciclados, a excepción de pequeños porcentajes de envases que poseen poco valor en comparación al mercado en general (*Arandes et al., 2005*).

Existen varias formas de clasificar los tipos de plásticos. El código de identificación de resinas (RIC), emplea un triángulo con tres flechas y un número del 1 al 7, conocido como triángulo de Möbius. Esto identifica el material con el que está elaborado el envase, así como la posibilidad de ser reciclado para nuevos productos. Según la facilidad de reciclaje (código de reciclaje) se ordenan de mayor a menor grado de reciclabilidad en:

**Grado 1.** Los PET (Tereftalato de polietileno) o PETE (Polietileno de alta densidad) se usan sobre todo para la fabricación de botellas, paquetes de comida y otros usos farmacéuticos. Las características principales de este tipo de plástico son su seguridad, manejabilidad, ligereza, transparencia y fortaleza (Cobos, 2016). Aunque actualmente su inocuidad está siendo motivo de debate, sigue considerándose uno de los materiales más seguros (Feron, 1994). Una de sus propiedades más destacables es la facilidad de reciclaje, siendo ésta considerada la mayor dentro de los distintos tipos de plásticos. El reciclaje de este material puede realizarse en más de una ocasión (según las indicaciones de cada producto) y permite ahorrar el 84% de la energía necesaria para su fabricación por cada kilogramo de PET (Cobos, 2016).

**Grado 2.** El HDPE (Polietileno de alta densidad) se utiliza para la fabricación de envases no transparentes como botellas de leche y aceites de motor. Dentro de sus particularidades están no solo la rigidez y la alta resistencia física, sino también ante agentes químicos como ácidos y disolventes (Zou et al., 2004). El polietileno de alta densidad reciclado (rHDPE) reduce hasta un 88% la huella de carbono frente al material virgen (IDE, 2022).

**Grado 3.** PVC (Policloruro de vinilo), usado en la fabricación de tarjetas de crédito, tuberías, pieles sintéticas y elementos de construcción (Hidalgo, 1997).

**Grado 4.** LDPE (Polietileno de baja densidad), empleado en la fabricación de botellas flexibles, filmes adhesivos, bolsas de la compra y aislamiento de cableado.

**Grado 5.** PP (Polipropileno), usado en la confección de tapones, tupperwares, piezas de automóviles y jeringuillas (Willett, 1994).

**Grado 6.** PS (poliestireno), empleado para fabricar vasos para bebidas calientes, envases de yogur, cubiertos de plástico y bandejas de comida. El principal inconveniente de éste es que al ser reciclado libera estirenos, posible carcinógeno humano.

**Grado 7.** Dentro de este grupo se engloban varios tipos de plásticos que se consideran no reciclables. Suelen ser mezclas de los mencionados con anterioridad o por sus características tecnológicas resulta imposible reciclarlos. Los más representativos del grupo son el policarbonato y el ABS (Acrilonitrilo Butadieno Estireno).

A pesar de la posibilidad (real o irreal) del reciclaje de los plásticos, cada vez resulta más evidente que debe disminuirse el uso de éstos y encontrarles alternativas ecológicas. Pero hoy por hoy, tanto los plásticos como los micro y nanoplásticos siguen estando presentes en nuestro mundo, ya que además la contaminación que suponen está afectando a la salud humana y de los animales de casi todos los ecosistemas.

La diferencia entre microplásticos y nanoplásticos radica en su tamaño: los nanoplásticos oscilan entre 0,001 y 0,1µm y los microplásticos varían entre 0,1 y 100µm. Estos, a su vez, se diferencian entre primarios (producidos originalmente con ese tamaño) y secundarios (fragmentación de desechos plásticos en el medio ambiente). Los primarios suponen entre el 15% y 30% de los microplásticos presentes en los océanos. Los microplásticos secundarios se encuentran en el medio ambiente por la degradación de objetos de naturaleza plástica de gran tamaño como bolsas de plástico, botellas...Estos suponen entre el 69% y 81% de los microplásticos que se encuentran en los océanos (AESAN 2021).

## 2.2 Efectos de los plásticos sobre el medio ambiente y la salud

Los ríos y la lluvia facilitan el transporte de los residuos plásticos hacia los océanos. En la superficie del agua estos plásticos se agregan entre ellos, se hunden y son ingeridos por organismos (Hale et al., 2020). Habitualmente el destino final de estos residuos es el lecho marino. La cantidad de estos materiales aumenta conforme el tamaño de estos disminuye, así como la capacidad de que otros organismos los ingieran.

La inclusión en la dieta de pescado y marisco que ha consumido estos nanoplásticos es la principal ruta de acceso al humano de estos materiales. La ingesta de pescado eviscerado no previene de los efectos adversos de los microplásticos y nanoplásticos, puesto que los aditivos y contaminantes nocivos quedan vehiculizados a través de la carne. El marisco, sin embargo, suele consumirse entero y por lo tanto también los residuos plásticos (Mercogliano et al., 2020).

En entornos acuáticos los microplásticos se recubren de sustancias orgánicas tales como microorganismos, algas e invertebrados (Zettler et al., 2013). Esto permite la formación de biofilms, los cuales en sí mismos no suponen ningún problema. Sin embargo, esta formación les confiere a los microorganismos protección además de facilidad de nutrición, incrementando la supervivencia y multiplicación de éstos (Watnick et al., 2000). Es habitual que la composición de microorganismos en los biofilms de los microplásticos difiera de los microorganismos presentes en el agua circundante (Zettler, 2013). Por ello son propicios a desarrollar un desequilibrio en las comunidades acuáticas. Estos contaminantes pueden servir como vector de microorganismos patógenos como las bacterias del género Vibrio, las cuales crecen sin complicación en la superficie de los microplásticos (Crawford et al., 2017), lo mismo que cepas virulentas de E. Coli (Silva, 2019) y del género Pseudomonas. Estos microorganismos no podrían haberse diseminado independientemente de otra forma (Silva, 2019). Por otra parte, hay estudios que teorizan sobre la posibilidad de que exista una transferencia horizontal de genes entre bacterias distintas que conviven en un mismo biofilm y que promueva la transferencia de la resistencia a los antibióticos (Costerton et al., 1995).

Los microplásticos además pueden estar contaminados por una serie de elementos: PCB's (bifenilos policlorados) compuestos organoclorados, hidrocarburos poliaromaticos, insecticidas DDT (dicloro difenil tricloroetano) y HCH (Hexaclorociclohexano), metales pesados (cobre, arsénico, cadmio) y antibióticos (Mammo et al., 2020).

Aunque en el mar la concentración de aditivos liberados por los microplásticos es en proporción baja, existe una bioacumulación en la cadena trófica que puede suponer un riesgo para la salud humana y animal. Estudios como *Review of the toxic effect of microplastics on terrestrial and aquatic plants* (Ge et al., 2021), aseguran que los microplásticos tienen un efecto nocivo sobre las plantas acuáticas afectando principalmente a la semilla y al rizoma.

Y no sólo existen aspectos tóxicos, están también presentes aspectos físicos que conllevan una problemática propia. Los daños físicos producidos en grandes animales, en este caso por macroplásticos, son abrasiones externas e internas, como úlceras y bloqueo del aparato intestinal que pueden causar la inanición y otras repercusiones físicas. Eso puede afectar a las costumbres reproductivas y a la alimentación de estos animales (Gregory, 2009). Los mismos efectos pueden aparecer en organismos de menor tamaño incluyendo invertebrados (Franeker, 2011). Hay que valorar, además, que los microplásticos tienen la capacidad de acumularse en el organismo, tal como asegura el estudio *The physical impacts of microplastics on marine organisms*, donde se comprobó que tras una ingesta de 20µg de microesferas de plástico, éstas persistieron en el tubo digestivo durante 48 horas. En el 2016, la EFSA (Autoridad Europea de salud alimentaria) concluyó en una "Declaración sobre la presencia de microplásticos y de nanoplásticos en los alimentos, con especial énfasis en los productos del mar" que la presencia de microplásticos y nanoplásticos en los alimentos no suponían un riesgo muy elevado para la salud humana debido a su baja exposición. Sin embargo, en el informe se declara que es necesario desarrollar mejores métodos analíticos para evaluar y cuantificar la presencia de plásticos en los alimentos, así como conocer la exposición real de los consumidores. Hoy en día no existe ninguna legislación que regule la presencia de microplásticos y nanoplásticos como contaminantes en los alimentos. Sin embargo, existen métodos para identificación y cuantificación de microplásticos en los mismos (AESAN, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2023).

Existen numerosos estudios que relacionan la presencia de microplásticos y nanoplásticos con el mal funcionamiento de órganos reproductivos en mamíferos. Esto se relaciona con una inducción de toxicidad reproductiva producida por estrés oxidativo, así como la activación de las vías de señalización de p38 MAPK (Xie et al., 2020). El estrés oxidativo se produce porque se incrementan las citoquinas proinflamatorias, que son moléculas de señalización celular (secretadas por células inmunitarias como las células T colaboradoras y los macrófagos) y que promueven la inflamación (Filella et al., 2002). Los espermatozoides son susceptibles al estrés oxidativo debido al alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados de su membrana, además de disponer de poco contenido de citoplasma, lo cual limita la cantidad de enzimas antioxidantes. Esto induce a la alteración de su membrana, así como a la fragmentación de su ADN en los genomas nucleares y mitocondriales (Paparella et al., 2015).

### 2.3 Alternativas al uso de plástico

Descritos todos los problemas que el uso de plásticos provoca, queda patente la necesidad de establecer alternativas al uso de éstos. Los biopolímeros serían una opción a plantear, puesto que tienen origen biológico (no petroquímico) y una vez cumplida su función, pueden descomponerse en subproductos naturales que no dañan el medio ambiente. Estos materiales pueden tener diferente origen y función, pero deben cumplir un requisito esencial: ser estables y duraderos mientras dure su vida útil (Vroman et al., 2009).

Los agropolímeros pueden componerse a base de almidones o de proteínas animales (Bastioli et al., 2005). Estos materiales pueden sustituir al plástico en muchos ámbitos como por ejemplo el de los envases alimenticios, puesto que son seguros y cómodos. Sin embargo, su eficacia en el ámbito sanitario no está probada. El plástico biodegradable a base de almidón es un material muy semejante al plástico tradicional tanto en resistencia como en aspecto. El almidón puede obtenerse a partir de patata, maíz o hueso de aguacate.

Para la fabricación de materiales, los principales polisacáridos de interés son la celulosa y el almidón, pero se está prestando cada vez más atención a los polímeros de carbohidratos más complejos producidos por bacterias y hongos, especialmente a polisacáridos como xantano, curdlan, pululano y ácido hialurónico. Otros biopolímeros empleados en embalajes biodegradables son los hidrocoloides, lípidos y películas de colágeno (Villada et al. 2007). Algunos de los biopolímeros más utilizados son los siguientes:

**Almidón:** es un polímero que se encuentra ampliamente en las plantas. Los principales cultivos utilizados para su producción son la patata, el maíz y el arroz. Las películas de almidón poseen baja permeabilidad y, por lo tanto, son materiales atractivos para el envasado de alimentos. Al entrar en contacto con los microorganismos del suelo, se degrada de forma no nociva (Chandra y Rustgi., 1998).

Otra fuente de obtención de almidón es el hueso de aguacate. El biopolímero a base de hueso de aguacate resulta interesante no sólo porque aprovecha los desechos que de otra forma se hubiesen eliminado, también podría resultar beneficioso en cuanto a la conservación del semen. Hay estudios que demuestran que el uso de extracto de semilla de aguacate adicionado a diferentes diluyentes seminales mejora la motilidad espermática progresiva hasta en un 20% respecto al método tradicional. Por otra parte, los hallazgos indican que el extracto de aguacate mejora el índice de estrés oxidativo y espermático (Olamitibo et al., 2016). Además de inhibir la oxidación proteica y lipídica, el aguacate tiene actividad antimicrobiana (Rodríguez, 2011).

**Celulosa:** es el polímero más abundante y se considera una fuente casi inagotable de materia prima (Cao et al., 2009). Aunque la biodegradación de la celulosa es complicada debido a su coexistencia con la lignina, la celulosa pura es degradada por una amplia variedad de microorganismos (Chandra y Rustgi., 1998). Actualmente se están usando filtros de tabaco de este material para que las colillas sean biodegradables.

**Fibras:** las fibras naturales de origen vegetal son de naturaleza lignocelulósica y están compuestas de celulosa, hemicelulosas, lignina, pectina y sustancias cerosas (Kabir et al., 2012). Estas se obtienen principalmente de tallos, hojas, semillas, madera y paja de cereales. En la mayoría de los casos son totalmente insolubles e hidrofóbicas. Ese material tiene diversas aplicaciones, como por ejemplo la fabricación de materiales para la construcción, aislamiento, alimentación animal, elaboración de cosméticos (Sanjay et al., 2016) y aplicaciones médicas como microtubos biodegradables para la reparación de vasos sanguíneos (Abbas y Jeon 2020). Actualmente se están empleando fibras naturales como la paja para fabricar pajitas de bebida. En la actualidad se está estudiando el uso de cápsulas biodegradables para la criopreservación de semen de pescado, de hecho los espermatozoides criopreservados en dichas cápsulas han mostrado una alta capacidad fecundante, por lo que podrían ser una alternativa a las pajuelas plásticas tradicionales para la criopreservación de esperma (De Souza et al., 2023).

#### 2.4 Inseminación artificial en la yegua

La inseminación artificial (IA) es una práctica antigua, con sus orígenes en el año 1780 cuando Lazzaro Spallanzani planteó la técnica de inseminación en perras. A finales del siglo XIX se establecieron los primeros programas de IA en équidos, tomando mucha más relevancia al terminar la segunda guerra mundial (Aurich, 2012).

En los últimos años la IA en équidos se ha establecido como una de las prácticas más ampliamente extendidas debido a la necesidad de inseminar yeguas con material genético de razas específicas. El porcentaje mundial de potros nacidos como resultado de la inseminación con semen refrigerado o congelado es de aproximadamente el 90% (Nath et al., 2010); sin embargo, en Europa es sólo del 45% (Kowalczyk et al., 2019). Esta discordancia de datos es debida a que se sigue considerando que la monta natural es más efectiva que la IA. Sin embargo, hay muchos factores que alteran los resultados en cuanto a las tasas de preñez de las yeguas. Primordialmente, muchas de las muestras seminales utilizadas en la IA son de mala calidad. Es necesario la aplicación de técnicas de valoración seminal para evaluar objetivamente la fertilidad de un semental antes de que se emplee como reproductor (Battut et al., 2016). Esto sumado a problemas en el envasado o el transporte, puede derivar en bajas tasas de natalidad. Sin embargo, esta técnica es rentable no sólo para el ganadero que vende las pajuelas, sino también para el cliente.

Las estadísticas muestran que en Europa el uso de semen refrigerado ha aumentado en yeguas de deporte, mientras que en yeguas reproductoras ha sido el uso de semen congelado (Kowalczyk et al., 2019). En España la IA es una práctica cada vez más aceptada por los ganaderos (Rodríguez 2009). En el mundo equino es común la adquisición de material genético de localizaciones lejanas a la yegua, lo que permite la implementación de caracteres a la descendencia que de otra forma no sería posible, puesto que resulta inviable el traslado de los animales en el mismo espacio temporal (Giraldo et al., 2022). Además de que es más económico, esto evita el contacto entre el macho y la hembra y, a su vez, previene accidentes físicos y contagio de patologías (Rodríguez, 2009).

La mayoría de los materiales necesarios para llevar a cabo la IA en yeguas, desde el momento de la recogida seminal hasta la propia inseminación, conllevan el uso de plástico: vagina artificial, recipiente para la recogida de semen, catéter de inseminación, envases de envío de dosis, guantes de exploración y las pajuelas con las dosis seminales, además de otros materiales que se puedan utilizar para preparar a la yegua y al propio semental. Existen varias alternativas “ecofriendly” para algunos de los materiales empleados en la IA. La empresa Magapor ha elaborado catéteres de inseminación porcina cuya sonda es biodegradable. IMV Technologies dispone en su catálogo de guantes de palpación biodegradables (Green Air). Sin embargo, no hay ninguna alternativa biodegradable para las pajuelas de inseminación.

## 2.5 Obtención de muestras seminales y contrastación seminal

Las muestras seminales se pueden obtener tanto de animales que han tenido que ser sacrificados o han fallecido, mediante el lavado de sus epidídimos, o bien de eyaculados de animales vivos que han sido entrenados para la recogida seminal.

En el caso de la recogida seminal, toma especial relevancia la higiene del manipulador a la hora de recolectar el semen. Debe llevarse ropa y calzados adecuados y debe tenerse en cuenta la higiene del equipo de recogida. Las estrategias de higiene estricta durante la recogida de semen reducen la contaminación bacteriana del eyaculado (Morrell, 2014). El lavado del pene antes de la recolección del semen y la eliminación del plasma seminal por filtración son efectivos para reducir la contaminación bacteriana y preserva la calidad del semen (Ramires et al., 2015).

Antes de su utilización, una muestra seminal debe de ser contrastada para determinar si su calidad es apropiada previamente a su utilización. Para valorar la misma es necesario emplear una serie de parámetros que tengan en cuenta la funcionalidad e integridad de los espermatozoides. La contrastación seminal clásica incluye pruebas tanto macroscópicas: volumen, aspecto, color, viscosidad y pH, como microscópicas: valoración de la motilidad (total y progresiva), concentración, vitalidad, presencia de morfoanomalias o integridad de la membrana espermática (Tabla 1).

**Tabla 1:** Valores medios de los parámetros seminales (Buzón 2013)

pH	7.2-7.4
Volumen total (mL)	60-120
Volumen libre de gel (mL)	30-100
Concentración (Espermatozoides/mL)	50-150x10 <sup>6</sup>
Morfología normal	15-66%
Vitalidad	9-65%
Motilidad progresiva	9-68%
Motilidad total	15-53%

La **motilidad** de los espermatozoides es, sin embargo, la base de la evaluación rutinaria. Esta se determina usando un microscopio óptico y estima el porcentaje de células en movimiento (Love et al., 2003). Hay diversos factores intrínsecos y extrínsecos que pueden afectar al movimiento de los espermatozoides. Ejemplo de lo primero lo constituyen la raza y determinadas alteraciones testiculares o prostáticas. Entre los factores extrínsecos se encuentran la frecuencia de recogida, el tiempo transcurrido entre el análisis y la recogida, la temperatura y los componentes del diluyente. La repetitividad de las evaluaciones del movimiento espermático es mayor cuando se usa semen diluido en lugar de semen fresco y, por lo tanto, resulta favorable realizar estimaciones una vez diluida la muestra (Restrepo et al., 2013).

Es importante conocer la **concentración** espermática, no solo para valorar la capacidad fecundante, sino también para definir la tasa de dilución y, por tanto, la cantidad de espermatozoides necesarios para la inseminación artificial. Esta, al igual que otros parámetros, también tiene una gran variabilidad respecto a individuos de la misma especie. Factores como el tamaño de los testículos, método de recogida, edad o raza del semental, influyen sobre este parámetro (Dowsett y Knott, 1996).

El semen promedio presenta aproximadamente un 50% de **morfología normal** en sus espermatozoides, pero esto varía según la temporada reproductiva. Es importante que no haya mucha cantidad de gotas citoplasmáticas, que son remanentes del citoplasma que quedan adheridos al espermatozoide después de la espermatogénesis, puesto que ello indica que el semental tiene problemas al madurar los espermatozoides (Amann et

al., 1993) o se está haciendo un uso excesivo del mismo en cuanto al ritmo de recogida seminal, lo que impide que complete el ciclo de maduración espermática.

Aun así, la fertilidad depende de otros factores ajenos a la calidad seminal, puesto que los parámetros evaluados en un análisis convencional tienen sus limitaciones en cuanto a la obtención de gestaciones a término (Giraldo et al., 2022).

## 2.6 Preservación espermática

Para el traslado de las dosis seminales de un lugar a otro es preciso criopreservar las muestras seminales, y para ello, en función del tiempo que transcurre desde la preparación de la muestra hasta su uso, se dispone de dos sistemas. Para tiempos de conservación elevados, está indicada la congelación, que implica el almacenamiento de las muestras seminales a una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ , bien en  $\text{LN}_2$  (nitrógeno líquido) o en nitrógeno seco, de cara al envío al comprador. Para tiempos de conservación menores se emplea la refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante un máximo de tres días. Estos procesos, junto con la adquisición del semen y su posterior distribución, deben llevarse a cabo en Centros Autorizados, los cuales deben seguir una serie de requisitos impuestos por el Gobierno y plasmados en el *Real Decreto 841/2011*.

Sin la criopreservación es imposible plantear la IA; no obstante, es una técnica que no está exenta de producir daños sobre los espermatozoides. Las bajas temperaturas pueden afectar negativamente a la capacidad fecundante de un eyaculado. A partir de los  $14^{\circ}\text{C}$  la membrana sufre alteraciones (Alemán et al., 2006). Se ha demostrado que la criopreservación induce la liberación de especies reactivas al oxígeno (EROs) que afectan a la estabilidad de la membrana, a la integridad de los receptores de la membrana y al ADN nuclear de la membrana (Grialdo et al., 2022). Estos daños conducen principalmente a la pérdida de la motilidad, la funcionalidad de la membrana plasmática y la integridad del acrosoma de los espermatozoides (Watson, 2000). Gran parte de estos efectos perjudiciales ocurren al principio y al final de los protocolos, cuando se agregan y eliminan agentes crioprotectores (Johnson et al., 2000), pero también puede ocurrir durante la congelación y descongelación a velocidades de enfriamiento y calentamiento lentas a moderadas. En la congelación, la supervivencia de las células se reduce si la velocidad de enfriamiento utilizada es subóptima. Si las células se enfrían demasiado rápido, el agua intracelular se congelará y se formarán cristales de hielo intracelulares. Sin embargo, si los espermatozoides se enfrían lentamente, se produce una deshidratación celular excesiva, lo que provoca daños irreversibles en los compartimentos celulares (Moore et al., 2006). Aunque la probabilidad de sobrevivir después de la descongelación varía de una especie a otra e incluso de un espécimen a otro, los métodos actuales solo protegen alrededor del 50 % de los espermatozoides de la criolesión (Sharafi et al., 2022). Para tratar de minimizar estos daños se utilizan diluyentes que garantizan la calidad seminal durante todo el proceso, además de aumentar el volumen del eyaculado (Valencia, 2006).

La función principal de los diluyentes es mantener la célula espermática viable y lo mejor posible durante un período de tiempo determinado. En general, las principales funciones de los diluyentes son: proporcionar energía, neutralizar los residuos metabólicos, mantener el equilibrio osmótico y estabilizar las membranas de los espermatozoides (Cuenca y Avellaneda, 2017). Los principales componentes de los diluyentes son: glucosa, tampones como HEPES y MOPS, sales de iones inorgánicos y antibióticos.

Durante la preparación de la muestra suele añadirse antibióticos a los diluyentes con el objetivo de retrasar o eliminar el crecimiento bacteriano. Se ha demostrado que la combinación de penicilina potásica con sulfato de amicacina mantiene el mayor nivel de motilidad, además de cubrir un amplio espectro de actividad antimicrobiana. Aun así, el efecto del antibiótico sobre el eyaculado va a depender también de la flora bacteriana presente en la muestra (Brinsko et al., 2000a). La adición de antibióticos puede afectar negativamente a la motilidad espermática (Restrepo, 2013).

## 2.7 Envases y sistemas de sellado alternativos a las pajuelas tradicionales

Actualmente, las pajuelas de conservación seminal están fabricadas con plástico PETG, que es una combinación entre PET y glicol mediante un proceso de glicolización. Esto proporciona al material modificado más estabilidad térmica y resistencia (Latko-Duralek et al., 2019). Aunque este material puede reciclarse, el uso de materiales biodegradables es más positivo para el medioambiente.

El sellado de las pajuelas de IA se efectúa con el objetivo de evitar la pérdida del contenido de éstas, además de propiciar un ambiente lo más higiénico posible para la muestra. Esta maniobra puede realizarse de forma automatizada mediante envasadoras y selladoras, que emplean el ultrasonido para garantizar un sellado uniforme y seguro. Esta técnica utiliza calor que sólo va a generarse en los materiales que se van a unir. En los sistemas manuales o semi-automáticos se emplean bolas de cristal o de metal. Otra forma de sellado manual es el polvo de sellado, compuesto principalmente por polivinilo. El otro extremo de la pajuela, el que está presente previamente a su llenado, suele encontrarse sellado mediante una combinación de un trenzado de algodón y polvo sellador.

Para el método de sellado propuesto en este trabajo se ha usado agar y filtros de tabaco biodegradables. Estos últimos están fabricados principalmente de celulosa extraída de subproductos de la fabricación del papel. Los filtros empleados para la IA en caballos también están hechos de ese material, por lo que se presupone que no van a suponer un riesgo para la calidad seminal. Derivados de la celulosa, como la metilcelulosa, se han utilizado como crioprotectores con resultados positivos (Phillips et al., 1996). Sin embargo, se debe evaluar esta hipótesis y comparar los resultados con otros materiales, como puede ser el agar. Los envases que se usan en este trabajo como alternativa a las pajuelas de plástico tradicional son pajitas de hueso de aguacate. También se ha adicionado calostro, que es la primera leche producida por la glándula mamaria y que ofrece varios beneficios, como son su mayor cantidad de inmunoglobulinas y de otras sustancias, como lisozimas, lactoferrinas, oligosacáridos con funciones antibióticas, antiinflamatorias y antioxidantes (Álvarez et al., 2020), para valorar su efecto sobre las muestras seminales en este tipo de pajuelas biodegradables.

## 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

Actualmente la crisis climática está a la orden del día. Si bien el reciclaje se presenta como una solución definitiva al uso indiscriminado de plástico, se ha demostrado que éste no es eficaz y que por lo tanto resulta conveniente plantearse el empleo de alternativas más ecológicas. El uso de materiales biodegradables podría suponer un punto final a la gran mayoría de contaminación ambiental que se acumula en océanos y ríos, y, por lo tanto, de los efectos indeseables de este material en el medioambiente. La gran cantidad de plástico utilizado en la inseminación artificial en la especie equina podría quedar reducido mediante el uso de otros materiales biodegradables.

Es por ello por lo que el **objetivo** de este trabajo es ofrecer alternativas al uso de plástico en el almacenamiento de semen equino garantizando un resultado óptimo.

## 4. MATERIAL Y MÉTODO

### 4.1 MATERIALES

#### 4.1.1. Material biológico

Se utilizaron 18 dosis seminales refrigeradas de caballos ubicados en el Centro Militar de Cría Caballar de Zaragoza. Fueron caballos de raza Hispano-Bretón, PRE (Pura Raza Español) y PRA (Pura Raza Árabe), de 10 años y con fertilidad espermiática probada.

Los eyaculados se obtuvieron mediante vagina artificial y una vez evaluada su calidad mediante el sistema computarizado ISAS Proiser (Valencia, España) se procedió a preparar las dosis con el diluyente EquiPlus® sin antibióticos, en una dilución 1:1. Seguidamente, en una jeringuilla de 20 ml, se envasaron las muestras para su traslado al laboratorio en una caja de refrigeración (Figura 1).



Figura 1: Dosis seminales

El calostro utilizado fue obtenido de yeguas recién paridas en el periodo comprendido en las primeras 6 horas y con una calidad de 26<sup>a</sup> Brix.

#### 4.1.2. Material laboratorial

El trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de la Unidad de Reproducción y Obstetricia del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, que cuentan con todo el material inventariable y fungible necesario en un laboratorio de tecnología seminal. El agar empleado fue suministrado por Sigma-Aldrich (S.A. Química Madrid, España), y el diluyente de refrigeración fue EquiPlus® (Minitube, España). Para el control microbiológico se emplearon kits de 3M Placas Petrifilm® (3M, Barcelona, España) para el recuento de aerobios y el recuento de enterobacterias (Figura 2).



Figura 2: Diluyente EquiPlus y Placas Petrifilm® AC y Petrifilm® EB

Como sistema de envasado de las muestras se usaron pajitas de bebida de hueso de aguacate, que fueron subministradas por la empresa Biofase. El material del que están compuestas procede de semillas de aguacate de residuos de empresas que producen aceite de guacamole y aguacate (Figura 3).

Para el sellado se testaron las boquillas de tabaco de celulosa (15x6mm) subministrados por la casa comercial RAW y Agar esterilizado de la casa Sigma Aldrich (España) (Figura 4).



Figura 3: Material de envasado. Pajitas de semilla de aguacate BIOFASE



Figura 4: Material de sellado. Filtros de tabaco biodegradables RAW y Agar



## 4.2. MÉTODO

### 4.2.1 Material bibliográfico

Para conocer el estado del arte del uso de los plásticos, contaminación que originan, su relación con la reproducción y en especial con las biotecnologías reproductivas en la especie equina, se usaron motores de búsqueda como Google Scholar (<https://scholar.google.es/>) y Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>).

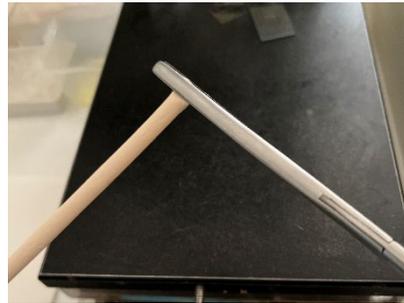
### 4.2.2 Preparación de pajuelas y sistemas de sellado

Se realizaron unas experiencias previas donde se analizó el material de dos tipos de pajitas: aguacate y bambú. Las pajitas de bambú resultaron friables y al someterlas a alguna presión se rompían y perdían el contenido. Por ese motivo se optó por las **pajitas de aguacate**, las cuales tienen una consistencia y resistencia parecida a la del plástico.

Se observó que estas pajitas al ser sometido al calor de la llama directa se fundían (Figura 5), y con ayuda de un clamp intestinal caliente (Figura 6) y juntando los dos extremos de las pajitas, éstas se soldaban (Figura 7). Para comprobar que se mantenían herméticas se midió su contenido líquido tras verterlo en un recipiente transcurrido un tiempo de 72h en refrigeración. Tras varios días sometidas a diferentes temperaturas, se observó que el contenido de las pajitas se mantenía en su interior sin pérdidas (Figura 8).



**Figura 5:** Exposición de la pajuela al calor.



**Figura 6:** Sellado térmico de la pajuela con un clamp intestinal



**Figura 7:** Pajuela de aguacate termosellada



**Figura 8:** Contenido recuperado en recipiente



**Figura 9:** Boquillas de celulosa estériles



**Figura 10:** Boquilla sellando pajuela

Tras comprobar que el sellado era efectivo, se planteó la posibilidad de añadir un material intermedio entre la muestra seminal y el extremo a sellar con el objetivo de impedir el contacto con el extremo más caliente y así evitar daño a la muestra. Este material debía ser biodegradable para garantizar que el 100% del residuo tras la inseminación fuera biodegradable. Este material intermedio debía acoplarse al extremo de la pajita. Debido a su forma cilíndrica se optó por las boquillas de celulosa biodegradable (Figura 9) las cuales al introducirse en la pajita (Figura 10) se humedecían con la muestra, pero evitaban que ésta entrara en contacto con el extremo superior.

Otro sistema de material intermedio probado fue el agar previamente esterilizado (Figura 11). Aprovechando el vacío creado a partir del primer sellado, se pudo girar la pajita abierta sobre una placa de agar sin perder el contenido de ésta. El agar formó un tapón con la forma de la pajita, cumpliendo la misma función que las boquillas de celulosa (Figura 12). Se realizaron dos experiencias para confirmar que no existía pérdida de contenido y además la calidad seminal no se vio afectada.



**Figura 11:** Agar esterilizado en placa petri



**Figura 12:** Agar sellando la pajuela

#### 4.2.3 Procesado del semen

A la llegada al laboratorio se le realizó sobre las dosis una primera valoración de la motilidad y concentración espermática mediante un sistema de análisis computerizado (ISAS®; Proiser, Valencia, España). Para ello, se depositó un volumen de 5  $\mu\text{L}$  en un portaobjetos atemperado a 37 °C, capturándose tres campos por muestra con un mínimo de 200 espermatozoides en cada una de ellas. Los espermatozoides con una velocidad promedio (VAP)  $\geq 20\mu\text{m/s}$  fueron considerados móviles, mientras que aquellos con una VAP  $\leq 10\mu\text{m/s}$  fueron considerados inmóviles, de acuerdo con los parámetros establecidos por el programa. El índice de rectitud (STR) fue de 75 %. Seguidamente se procedió a preparar las muestras heteroespermicas para seguir con el procesamiento

Las muestras se diluyeron hasta una concentración de  $50 \times 10^7$  esp/ml y se dividieron en dos tubos en función del sistema de cierre que se iba a utilizar. Posteriormente, se centrifugaron a 600 g durante 10 min a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y cada pellet obtenido se resuspendió con el diluyente Equiplus® (Minitub España), con o sin suplementación del 20 % de calostro en función de la experiencia, hasta alcanzar una concentración final de  $100 \times 10^6$  espermatozoides por ml.

#### 4.2.4 Evaluación de la calidad espermática

Una vez cargadas las pajuelas con la muestra de semen, éstas se mantuvieron en refrigeración a 5°C durante 72h, realizando el control de la calidad seminal a las 24-48-72 horas para comprobar de qué manera la calidad se podía ver influenciada por el uso del sellado utilizado. También se valoró si la adición del calostro en el medio tenía un efecto positivo sobre las muestras seminales. La calidad espermática fue evaluada mediante el sistema de análisis seminal computerizado ISAS (Figura13). Se recogieron datos de motilidad total y progresiva, así como de diferentes parámetros cinéticos de motilidad: velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL); velocidad promedio (VAP); índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), índice de oscilación (WOB), y la amplitud media de desplazamiento (amplitud lateral de la cabeza: ALH y frecuencia de batida: BCF). Para el estudio de estos parámetros fueron capturados al azar 3 campos diferentes de cada muestra.

Se realizaron controles microbiológicos, tanto para bacterias aerobias como anaerobias. Para ello se hizo una dilución 1/100 de las mismas en suero fisiológico y se realizó la siembra en las placas de Petrifilm® AC y Petrifilm® EB, se conservaron en una estufa de 37°C (Figura 14) y se comprobó posteriormente la presencia de crecimiento bacteriano.

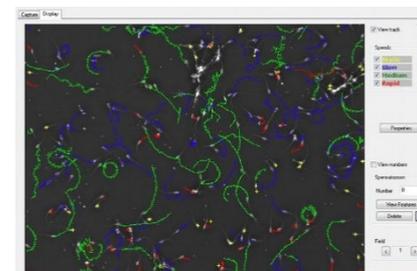


Figura 13: Sistema de análisis computerizado ISAS



Figura 14: Placas Petrifilm® en estufa

En la Figura 15 se describe de forma esquemática el diseño experimental de este trabajo.

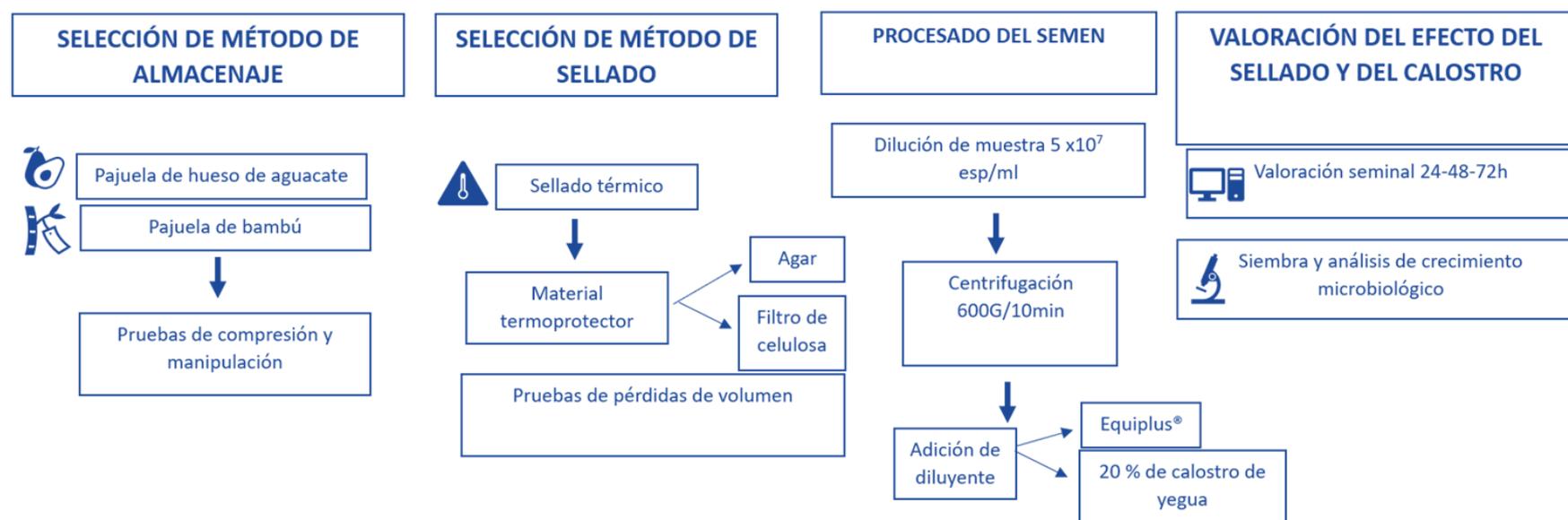


Figura 15: Diseño experimental

#### 4.2.5 Estudio estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 22.0. Se realizó en un primer estudio un GLM (Modelo lineal Generalizado) cuyos factores fueron tiempo y tipo de cierre (boquilla o Agar) y posteriormente se procedió a realizar un GLM de medias repetidas para determinar el efecto del calostro, tiempo y tipo de cierre

Cuando la significación era  $<0,050$  y la potencia  $>0,800$  nos indicaba que existían claramente diferencias, descartando igualdad de medias y confirmando la diferencia entre medias. Cuando la significación estaba muy cercana a 1 y la potencia  $<0,200$  indicaba que no había efecto y la probabilidad de que fueran iguales era muy alta y la probabilidad de que fueran diferentes era bajas.

### 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Para valorar nuestros resultados se hizo un GLM donde se buscó el efecto del tiempo de conservación y el tipo de cierre de las pajuelas (Tablas 2 y 3) y la existencia de diferencias estadísticas en la motilidad y los parámetros de movimiento.

En este trabajo se usaron exclusivamente pajuelas de hueso de aguacate debido a que en un trabajo anterior (*Peñalosa, 2022, datos no publicados*) se comprobó la eficacia de diferentes pajitas biodegradables frente al almacenaje de eyaculado equino. Los diferentes materiales testados fueron: bambú, aguacate, papel, hierba y trigo.

La motilidad total presentó diferencias significativas en cuanto al tipo de pajuela, presentando los mejores resultados la pajuela de hueso de aguacate en todos los tiempos de conservación en los que ésta fue contrastada; de hecho, a las 24 horas el valor fue muy superior al control. El principal problema de este método de almacenaje era el tipo de sellado, puesto que con el que se estaba usando en ese momento (corcho, cera de abeja y arroz) había pérdidas de contenido. Por ello, el principal objetivo de este trabajo ha sido conseguir un método de sellado eficaz y sencillo para este tipo de pajuelas. El uso de pajitas de aguacate y sus beneficios en la conservación venía refrendado por los estudios de *Olamitibo et al.*, quienes observaron que el uso de extracto de semilla de aguacate adicionado a diferentes diluyentes seminales mejoraba la motilidad espermática progresiva hasta un 20% respecto al método tradicional a la que se sumaba (*Olamitibo et al., 2016*). Además, los estudios de *Rodríguez*, indicaban que el aguacate tiene actividad antimicrobiana e inhibía la oxidación proteica y lipídica (*Rodríguez, 2011*).

Analizando los resultados obtenidos (Tabla 2), observamos que el factor tiempo sólo presentaba un efecto significativo en el parámetro de motilidad WOB (Índice de oscilación) y que su valor se reducía a medida que pasaban las horas de conservación, así como la BCF (Frecuencia de batida) con diferencias altamente significativas ( $p<0,001$ ) incrementándose a lo largo de tiempo. Tanto la motilidad total como progresiva junto con el resto de los parámetros no presentaron diferencias significativas a lo largo del tiempo, pero observando las potencias únicamente se puede concluir que la motilidad progresiva se mantenía a lo largo del tiempo ( $p=0,801$  y potencia observada=0,107)

Prolongar la función de los espermatozoides mientras se mantienen en refrigeración sigue sin estar claro (*Gibb et al., 2016*). Se ha visto que existe una variabilidad entre sementales en la motilidad tras el almacenamiento en refrigeración (*Hartwig et al., 2014*), pero no se ha informado del porcentaje de sementales cuya función espermática aparece muy reducida después del almacenamiento refrigerado a 4°C. Este descenso en la función de los espermatozoides se atribuye entre otros factores al "choque frío" inducido por velocidades de enfriamiento rápidas entre 19 y 8° C (*Moran et al., 1992*).

**Tabla 2:** Efecto del tiempo sobre las variables de motilidad espermática (Media±Error estándar)

Variable	n	0h	24h	48h	72h	p-value	Potencia observada
<b>Mt</b>	6	85,50±7,01	71,77±9,92	65,43±7,01	63,67±8,59	<b>0,162</b>	<b>0,428</b>
<b>Mp</b>	6	20,38±3,51	25,62±4,97	21,47±3,51	19,47±4,30	<b>0,801</b>	<b>0,107</b>
<b>VCL</b>	6	104,93±9,47	121,45±13,39	95,02±9,47	95,02±11,59	<b>0,334</b>	<b>0,284</b>
<b>VSL</b>	6	39,62±4,46	55,20±6,31	38,62±4,46	40,21±5,46	<b>0,172</b>	<b>0,416</b>
<b>VAP</b>	6	72,68±7,12	85,33±10,07	59,94±7,12	68,40±8,72	<b>0,236</b>	<b>0,354</b>
<b>LIN</b>	6	37,67±2,67	45,13±3,78	41,47±2,67	35,31±3,27	<b>0,205</b>	<b>0,382</b>
<b>STR</b>	6	55,32±2,91	63,73±4,11	65,08±2,91	60,39±3,56	<b>0,123</b>	<b>0,480</b>
<b>WOB</b>	6	68,53±2,42 <sup>b</sup>	70,15±3,43 <sup>b</sup>	63,19±2,42 <sup>ab</sup>	58,19±2,97 <sup>a</sup>	<b>0,030</b>	<b>0,709</b>
<b>ALH</b>	6	3,80±0,25	4,13±0,36	4,08±0,26	4,39±0,31	<b>0,545</b>	<b>0,185</b>
<b>BCF</b>	6	8,07±0,68 <sup>a</sup>	11,47±0,96 <sup>bc</sup>	10,71±0,68 <sup>b</sup>	13,14±0,84 <sup>c</sup>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,981</b>

Diferentes superíndices en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Test de Duncan

También la centrifugación previa al enfriamiento del semen para retirar el plasma seminal sería una de las causas que contribuirían en la reducción de la calidad (*Brinsko et al., 2000b*). En nuestro estudio los sementales tenían fertilidad probada, y su uso fue exclusivamente para preparar dosis seminales que se mantenían en refrigeración a 4° C.

Nuestros resultados de motilidad a las 0 horas coinciden con valores obtenidos por *Lozano et al., (2011)* cuyo valor se situaba en  $83,3\% \pm 7,6\%$ . Sin embargo, a las 72h los valores son inferiores a los observado por *Oliveira et al., (2017)*, quienes con semen refrigerado obtienen una motilidad total del 80%. Esta discrepancia de resultados pudo ser debida entre otros factores la raza, la edad del semental, el sistema de análisis espermático incluso el sistema de almacenamiento donde las muestras se almacenaron en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml a 5 °C en un refrigerador.

En un estudio reciente donde se valoraba la adición de glucosa en el medio de preservación y utilizando el mismo método de procesado de las muestras espermáticas que el nuestro (*Hernández-Avilés et al, 2018*), los valores de motilidad total y progresiva encontrados en el medio control eran inferiores en los mismos tiempos de conservación. Los valores que obtuvieron estaban sobre el 70% a las 0 horas, y en un 10 % de motilidad total a las 72. Los valores de motilidad progresiva que obtuvieron fueron del 40, 30 y 5 % a las 24 ,48 y 72 horas de conservación, respectivamente, siendo valores inferiores a los observados en nuestro estudio. Nuestros resultados ponen de manifiesto que el tiempo de refrigeración no influye sobre el tipo de pajuela, permitiéndonos conservar los espermatozoides en pajuelas de aguacate conservando la motilidad total y progresiva junto con los parámetros de motilidad a lo largo del tiempo.

En relación a la eficacia del sellado, éste es importante para evitar la contaminación de la muestra y garantizar unos buenos índices de fertilidad. En este trabajo se utilizaron agar y filtros de celulosa esterilizados junto con sellado térmico. Ambos materiales se utilizaron para evitar el contacto entre la parte sellada térmicamente con la muestra seminal, proporcionando un aislamiento térmico. En ambos sistemas de cierre no se observaron pérdidas de volumen en las pajuelas de hueso de aguacate.

Analizados los resultados del factor tipo de cierre, agar o boquilla, ambos materiales no presentaron diferencias significativas en cuanto a los parámetros de calidad seminal tal como se puede ver en la tabla de resultados señalados en la tabla 3:

**Tabla 3:** Efecto del tipo de cierre de la pajuela sobre las variables de motilidad espermática (Media±Error Estándar)

<b>Variable</b>	<b>n</b>	<b>Boquilla</b>	<b>Agar</b>	<b>p-value</b>	<b>Potencia observada</b>
<b>Mt</b>	6	79,07±5,81	64,12±5,81	<b>0,079</b>	<b>0,421</b>
<b>Mp</b>	6	24,57±2,91	18,90±2,91	<b>0,179</b>	<b>0,265</b>
<b>VCL</b>	<b>6</b>	114,03±7,85	105,1±7,85	<b>0,427</b>	<b>0,122</b>
<b>VSL</b>	6	44,98±3,70	41,85±3,70	<b>0,554</b>	<b>0,089</b>
<b>VAP</b>	6	73,97±5,91	69,2±5,91	<b>0,572</b>	<b>0,086</b>
<b>LIN</b>	6	39,57±2,22	40,22±2,22	<b>0,920</b>	<b>0,055</b>
<b>STR</b>	6	61,30±2,41	60,96±2,41	<b>0,920</b>	<b>0,051</b>
<b>WOB</b>	6	64,46±2,01	65,57±2,01	<b>0,698</b>	<b>0,067</b>
<b>ALH</b>	6	4,32±0,21	3,88±0,21	<b>0,153</b>	<b>0,294</b>
<b>BCF</b>	6	11,02±0,56	10,66±0,56	<b>0,658</b>	<b>0,072</b>

La ausencia de diferencias significativas en motilidad total o progresiva entre ambos tipos de cierre no nos permitió afirmar que los dos tipos de cierre eran igualmente válidos al observar las potencias observadas en el GLM. No obstante, los parámetros LIN (Linealidad), STR (Índice de rectitud), WOB (Índice de oscilación) y BCF (Frecuencia de batida) por la probabilidad obtenida y la potencia observada nos confirmaron la igualdad entre ambos sistemas.

La no existencia de estudios similares al nuestro nos llevó a comparar con otros estudios como el de *Rusell et al., (1997)*. En este estudio se evaluaba la eficacia del sellado térmico tradicional de pajuelas de plástico y el sellado con polvos de alcohol polivinilo (PVA). Las pajuelas se rellenaban de azul de metileno como control y se observó un grado significativo de pérdida, que probablemente estaba asociado con la estanqueidad del tapón de sellado del polvo. Las pajuelas que habían sido cerradas con la técnica convencional de calor no mostraron fugas detectables. Estos resultados coinciden con los nuestros donde se ha combinado el calor, método convencional, y el cierre con boquilla de tabaco o agar esterilizado que impedían las pérdidas de volumen de la muestra.

Observando los resultados obtenidos por *Gacem et al., (2021)*, que utilizaban el sellado de las pajuelas por el método tradicional, se puede ver que presentaban unos valores de linealidad (25,94 %), índice de rectitud (35,85 %) y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (1,25 µm) inferiores a los observados en este estudio con el sellado de agar o boquilla de tabaco, y unos valores superiores del índice de oscilación (72,5%) y frecuencia de batida (38,32 Hz) a los nuestros, lo que confirmaba que los tipos de sellado utilizados en nuestro estudio eran tan válidos como los sistemas convencionales.

Finalmente quisimos evaluar el efecto de la adición del calostro en relación al tiempo de conservación y el tipo de cierre. Para ello se realizó un GLM de medias repetidas, realizando la prueba post hoc de subconjuntos homogéneos. En relación al tipo de cierre de las pajuelas, agar o boquilla, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con respecto a la adición de calostro y el método de sellado, lo que confirma lo anteriormente observado. Al valorar el efecto de la adición de calostro y el tiempo de conservación en refrigeración sí se pudieron determinar diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) (Tablas 4 y 5).

En nuestro estudio la adición de calostro en los diluyentes de preservación espermática resultó ser desfavorable. En estudios anteriores, su utilización protegía a los espermatozoides frente al shock térmico y se consideraba como una alternativa como agente crioprotector en los diluyentes (Álvarez *et al.*, 2020). En la Tabla 4 se recogen los resultados observados. Todos los parámetros presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras sin y con calostro, siendo las muestras con calostro de menor calidad en las motilidades y en la mayoría de los parámetros de motilidad, lo que se contradice con los estudios realizados por Álvarez *et al.* (2020), en los cuales los resultados fueron muy positivos con la adición de un 20% de calostro de yegua en el diluyente de conservación. Esta discordancia de datos entre nuestro trabajo y el de Álvarez puede ser debida al tipo de recogida de las muestras de calostro utilizado a pesar de que su calidad era de 26<sup>a</sup>Brix, y consideramos que era independiente del tipo de almacenamiento, pajitas de aguacate, o del tipo de cierre de las mismas, siendo una posible causa la posible contaminación del mismo en el momento de su recogida, circunstancia no controlada por nosotros.

**Tabla 4:** Asociación del calostro con distintas variables de calidad espermática (Media±Error estándar)

Calostro	n	Calostro <sub>sin</sub>	Calostro <sub>con</sub>	p-value
Mt	6	70,62±5,82	51,94±5,38	<b>0,032</b>
Mp	6	17,44±2,33	11,16±1,18	<b>0,041</b>
VCL	6	96,35±7,04	70,84±3,44	<b>0,008</b>
LIN	6	38,37±2,19	42,19±1,00	<b>0,038</b>
WOB	6	62,51±2,03	66,57±1,17	<b>0,039</b>
ALH	6	4,06±0,21	3,66±0,07	<b>0,044</b>
BCF	6	11,48±0,57	9,10±0,50	<b>&lt;0,001</b>

Realizar el GLM de las medias marginales sobre el tiempo de preservación de las muestras cuando se adicionaba calostro, permitió observar diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) (Tabla 5), siendo independiente del tipo de sellado. Las motilidades, total y progresiva, no presentaban diferencias significativas a lo largo del tiempo. Sí que se observaron diferencias significativas en las velocidades rectilíneas y de la trayectoria media que decrecían con el tiempo de conservación, aumentando el índice de rectitud y la frecuencia de batida. Estos resultados los podemos considerar inferiores a los obtenidos por otros autores, pudiendo estar asociado a componentes presentes en las fracciones del eyaculado o contaminación de los diluyentes utilizados que pueden dañar la viabilidad espermática porque alteren el pH e influyen en los parámetros de motilidad (Kareskoski *et al.*, 2006).

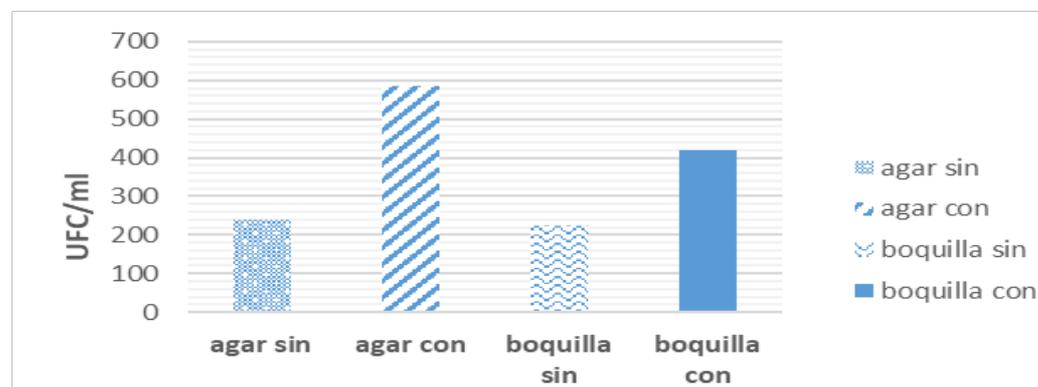
**Tabla 5:** Asociación del tiempo con distintas variables de calidad espermática (Media±Error Estándar)

Tiempo	n	0h	24h	48h	72h	p-value
VSL	6	32,01±2,39 <sup>a</sup>	41,67±2,93 <sup>b</sup>	31,61±2,39 <sup>a</sup>	26,93±2,92 <sup>a</sup>	<b>0,019</b>
VAP	6	60,53±3,68 <sup>c</sup>	63,84±4,50 <sup>bc</sup>	48,14±3,68 <sup>ab</sup>	43,09±4,50 <sup>a</sup>	<b>0,010</b>
STR	6	53,77±2,63 <sup>a</sup>	65,11±3,22 <sup>b</sup>	66,14±2,63 <sup>b</sup>	64,45±3,22 <sup>b</sup>	<b>0,018</b>
BCF	6	7,65±0,79 <sup>a</sup>	11,21±0,97 <sup>b</sup>	10,97±0,79 <sup>b</sup>	11,32±0,97 <sup>b</sup>	<b>0,019</b>

Diferentes superíndices en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) test de Duncan

Para confirmar la presencia de contaminación que pudiera influir en los resultados obtenidos tras la adición de un 20 % de calostro se realizaron siembras en placas de Petrifilm® para cultivo de gérmenes aerobios y anaerobios. Se sabe que las bacterias presentes en la piel de los animales colonizan la mucosa genital y por lo tanto se transfieren al eyaculado. En general éstas no son patógenas y no suponen un problema para el semental a no ser que su concentración sea muy grande. Sin embargo, la calidad seminal si se ve afectada por la presencia de determinados microorganismos. Además, las yeguas inseminadas podrían afectarse negativamente por la presencia de bacterias en el eyaculado (Al-Kass, et al., 2020). Según Kotilainen (1994), la neutrofilia inducida en el útero post inseminación es debida a los espermatozoides más que por las bacterias del eyaculado, y la intensidad de esta depende de la concentración y del volumen del eyaculado. Esto no ha sido probado con el sistema de almacenaje propuesto en este trabajo. Sin embargo, se ha tenido en cuenta a la hora de plantear las pajuelas biodegradables que el proceso fuese inocuo para la yegua.

Alguno de los efectos negativos de contaminación bacteriana son la disminución de la motilidad y viabilidad de los espermatozoides, reacción acrosomal prematura o aglutinación de los espermatozoides. La inseminación con esperma contaminado puede estar asociada con secreción vulvar, muerte embrionaria o fetal, endometritis, infección sistémica y tamaño reducido de la camada (Morrell et al., 2014). Klebsiella spp y Pseudomonas spp. afectan negativamente a la integridad de la membrana espermática, así como a la supervivencia de los espermatozoides (Bennett et al., 1986). Por lo tanto, se ha tenido especial interés en que el sellado fuera lo más higiénico posible y también estanco para evitar la entrada de microorganismos durante el almacenaje. No obstante, las siembras realizadas en nuestro estudio (Gráfico 1) han puesto de manifiesto que el mayor crecimiento bacteriano correspondía a los medios a los que se les habían adicionado calostro, en ambos tipos de cierre de las pajuelas de aguacate, confirmando nuestras sospechas de la contaminación del calostro.



**Gráfico 1:** Crecimiento de microorganismos aerobios en diferentes tipos de sellado y con adición de calostro

Hoy en día el uso de antibióticos está cada vez más controlado debido en gran medida a la generación de resistencias por su mal uso. Hay estudios que aseguran que ya se han encontrado las primeras resistencias de muestras seminales en équidos (Malaluang et al., 2021). Debido a las resistencias, es necesario evaluar nuevas combinaciones de antibiótico con gran efecto sobre las bacterias y poco sobre los espermatozoides (Gloria et al., 2014). En este trabajo se ha utilizado diluyente sin antibiótico, EquiPlus® y adicionando en el mismo calostro por su poder bactericida para evitar el uso de antibióticos, circunstancia que no pudimos confirmar como queda reflejado en la gráfica donde se observan valores inferiores de crecimiento en el diluyente sin calostro.

En nuestro estudio, las siembras para control de contaminación se realizaron a las 72 horas de conservación y aunque evidenciaban el efecto perjudicial del calostro en relación al número de UFC/ml (unidades formadoras de colonias/ml) estos valores eran muy inferiores a los obtenidos por *Hernandez-Aviles et al. (2018)* a las 0 y 24 horas ( $24818 \pm 5872$  y  $18478 \pm 4374$  UFC/ml). Este estudio indicaba que el almacenamiento en frío del semen se asocia con una disminución de la carga bacteriana, datos similares a lo observado en otros estudios (*Alvarenga et al., 2012*) que indicaban esta reducción del crecimiento bacteriano al almacenar a 5° C las dosis seminales en comparación con las muestras almacenadas a 20° C o 15 ° C. Este descenso en el crecimiento bacteriano podría explicarse simplemente por una restricción metabólica ejercida por la temperatura o por un efecto sinérgico de la temperatura y el antibiótico sobre el diluyente seminal (*Pappa et al., 2008*) lo que nos llevaría a pensar que realmente había cierto efecto bactericida del calostro al combinarse con el efecto de la temperatura de conservación.

## 6. CONCLUSIONES

---

1. El uso de boquillas de tabaco y de agar esterilizado para el sellado de pajuelas de hueso de aguacate permite conservar la calidad seminal a lo largo del tiempo de refrigeración a 4 °C, no presentando diferencias significativas entre ambos sistemas.
2. Las boquillas de tabaco y el agar esterilizado son dos sistemas válidos para sellar las pajuelas de aguacate. Sin embargo, teniendo en cuenta la manejabilidad de la técnica y la característica biodegradable, se determina que las boquillas de tabaco son la mejor opción para el sellado.
3. No se ha podido confirmar que la adición de un 20% de calostro en el diluyente EquiPlus® sin antibióticos suponga una baja calidad seminal, así como una disminución del crecimiento bacteriano. No obstante, los resultados indican una reducción sustancial de dicho crecimiento en comparación a otros estudios lo que confirmaría su efecto beneficioso.

## CONCLUSIONS

1. The use of tobacco mouthpieces and sterilised agar for sealing avocado straws preserves semen quality throughout the cooling time at 4 °C, with no significant differences between the two systems.
2. Tobacco and sterilised agar mouthpieces are two valid systems for sealing avocado straws. However, taking into account the manageability of the technique and the biodegradable characteristics, it is determined that tobacco mouthpieces are the best choice for sealing.
3. It could not be confirmed that the addition of 20% colostrum in EquiPlus® extender without antibiotics leads to a lower semen quality as well as a decrease in bacterial growth. However, the results indicate a substantial reduction in bacterial growth compared to other studies, which would confirm its beneficial effect.

## 7. VALORACION PERSONAL

---

En este trabajo he podido aplicar muchas de las técnicas empleadas en el ámbito de reproducción equina, más concretamente en el preparado de muestras para la inseminación artificial. Gracias a esto he podido adquirir conocimientos y práctica en un ámbito que me resulta interesante de cara a mi futuro laboral y estoy agradecida de haber podido disponer tanto de un laboratorio perfectamente equipado como de la indispensable ayuda de mis tutoras. Considero que el objetivo de este trabajo ha podido lograrse con éxito, puesto que se ha podido resolver la hipótesis inicial con resultados favorables.

Soy consciente de que el uso de materiales innovadores en un ámbito como el de la reproducción equina en el que se emplea gran cantidad de capital requiere de más investigación y desarrollo. Sin embargo, también creo que cuando sea preciso prescindir de los plásticos de un solo uso, va a ser indispensable encontrar alternativas eco-friendly para subsidiar dichas carencias. Por lo tanto, la experimentación con materiales biodegradables va a resultar un indispensable en un futuro, y por ello considero que este trabajo resulta relevante para dicho propósito.

Asimismo, este proyecto también me ha permitido comprender y asimilar muchos conceptos adquiridos durante mis años de estudiante, además de emplear la creatividad. El uso de bibliografía ha resultado indispensable en la elaboración de este trabajo. Por ello he priorizado el uso de motores de búsqueda de estudios publicados, aplicando criterios de búsqueda mediante palabras clave, autores relevantes, año de publicación... Esto me ha ayudado a adquirir soltura en la búsqueda de información relevante, cuestión indispensable para actualizar mis conocimientos como requiere una carrera como la de veterinaria.

Por último, me gustaría agradecer al Centro de Cría Caballar por la cesión de las dosis seminales y al profesor Nacho de Blas por la realización de la estadística.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. AESAN (2021) *Microplásticos y nanoplásticos*. aesan.gob.es. Disponible en: [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/gestion\\_riesgos/microplasticos\\_nanoplasticos.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/microplasticos_nanoplasticos.pdf) [Consulta 15 de agosto de 2023]
2. Alemán, D., Alfaro, M., y Hurtado, E. (2006). “Efecto de la temperatura del semen sobre la respuesta reproductiva de cerdas”. *Idesia*, 24(3), 33–37. Disponible en: <https://doi.org/10.4067/s0718-34292006000300005> [Consulta 15 de agosto de 2023]
3. Al-Kass, Z., Guo, Y., Vinnere Pettersson, O., Niazi, A., y Morrell, J. M. (2020). “Metagenomic analysis of bacteria in stallion semen”. *Animal Reproduction Science*, 221(106568), 106568. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106568> [Consulta 15 de agosto de 2023]
4. Alvarenga MA, Papa FO, Carmo MT, Kievitsbosch T, Castro Chaves MMB, y Ramires Neto C. (2012) “Methods of concentrating stallion semen.” *J Equine Vet Sci* 2012; 32:424–9. doi: 10.1016/j.jevs.2012.06.003
5. Álvarez, C. (2020). *Nuevas estrategias para mejorar la calidad espermática en la criopreservación de la especie equina*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza
6. Amann, R., Hammerstedt, R., y Veeramachaneni, D. (1993). “The epididymis and sperm maturation: a perspective.” *Reproduction, Fertility, and Development*, 5(4), 361. Disponible en: <https://doi.org/10.1071/rd9930361> [Consulta 15 de agosto de 2023]
7. Arandes, J., Bilbao, J., y López, D. (2005). “Reciclado de residuos plásticos”. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5(1). Disponible en: <https://arpet.org/docs/Reciclado-de-residuos-plasticos-Revista-Iberoamericana-de-Polimeros.pdf> [Consulta 15 de agosto de 2023]
8. Aurich, J. (2012). “Artificial insemination in horses more than a century of practice and research”. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(8), 458–463. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.06.011>[Consulta 15 de agosto de 2023]
9. Bastioli, E., Catia D. (2005). “Handbook of biodegradable polymers”. *Shawbury: Rapra Technology* Disponible en: [https://www.academia.edu/4243818/Handbook\\_of\\_Biodegradable\\_Polymers](https://www.academia.edu/4243818/Handbook_of_Biodegradable_Polymers). [Consulta 15 de agosto de 2023]
10. Battut I., Kempfer A., Becker J., Lebailly L., Camugli S., Chevrier L. (2016) “Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry.” *Theriogenology*. 2016; 86:1111–1131. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.001
11. Bennett, D. G. (1986). “Therapy of endometritis in mares.” *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 188(12). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3528094/> [Consulta 15 de agosto de 2023]
12. Brinsko, S., Varner, D., y Blanchard, T. (2000a). “Transport of equine semen. Recent Advances in Equine Reproduction”, *International Veterinary Information Service*. Disponible en: [https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5102130/mod\\_resource/content/1/Brinsko%2C%20S.P.%20et%20al.%20MANUAL%20OF%20EQUINE%20REPRODUCTION.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5102130/mod_resource/content/1/Brinsko%2C%20S.P.%20et%20al.%20MANUAL%20OF%20EQUINE%20REPRODUCTION.pdf) [Consulta 15 de agosto de 2023]
13. Brinsko S., Crockett E., Squires E.(2000b) . “Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage.” *Theriogenology* .doi: 10.1016/S0093-691X(00)00331-9
14. Cao, X., Habibi, Y., y Lucia, L. (2009). “One-pot polymerization, surface grafting, and processing of waterborne polyurethane-cellulose nanocrystal nanocomposites.” *Journal of Materials Chemistry*, 19(38), 7137. Doi: 7137-7145

15. Carrington, D. (2022). "Microplastics detected in meat, milk and blood of farm animals." *The-guardian*. Disponible en: <https://www.theguardian.com/environment/2022/jul/08/microplastics-detected-in-meat-milk-and-blood-of-farm-animals>[Consulta 15 de agosto de 2023]
16. Chandra, R. y Rustgi, R. (1998) "Biodegradable Polymers." *Progress in Polymer Science*, 23, 1273-1335 Doi:10.1016/S0079-6700(97)00039-7.
17. Cobos, R. (2016). "El polietilén tereftalato (PET) como envase de aguas minerales." *Dialnet*. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6737668>[Consulta 15 de agosto de 2023]
18. Cortés-Vidauri, Z., Aréchiga-Flores, C., Rincón-Delgado, M., Rochín-Berumen, F., López-Carlos, M., y Flores-Flores, G. (2018). "Revisión: El Ciclo Reproductivo de la Yegua." *Abanico veterinario*, 8(3), 14–41. Disponible en: <https://doi.org/10.21929/abavet2018.83.1> [Consulta 15 de agosto de 2023]
19. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., y Lappin-Scott, H. M. (1995). "Microbial biofilms." *Annual Review of Microbiology*, 49(1), 711–745. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>[Consulta 15 de agosto de 2023]
20. Crawford, C.; Quinn, B. (2017) "The biological impacts and effects of contaminated microplastics." In *Microplastic Pollutants*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 159–178. Doi: 10.1016/B978-0-12-809406-8.00007-4
21. Cuenca, M. y Avellaneda C., "Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina REDVET." *Revista Electrónica de Veterinaria*, vol. 18, núm. 9, septiembre, 2017, pp. 1-11 Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63653009012.pdf> [Consulta 15 de agosto de 2023]
22. d'Ambrières, W. (2019). "Plastics recycling worldwide: current overview and desirable changes." *Field Actions Science Reports, Special19*, 12–21. Disponible en: <https://journals.openedition.org/factsreports/5102?lang=en> [Consulta 15 de agosto de 2023]
23. De Souza, T., Gomes, I. C., Sanches, E. A., Atehortúa, M. P., Teixeira, N. D. S., Rodrigues, R. B., De Freitas, T. R., Benato, J. L., Marques, L. S., De Souza, A. R. S., y Streit, D. P., Jr. (2023). "Fish sperm cryopreservation using biodegradable containers: new low-cost and environment-friendly methodology." *Reproduction*, 166(2), 89-97. Disponible en: <https://doi.org/10.1530/rep-23-0046> [Consulta 15 de agosto de 2023]
24. Abbas, M., y Jeon, H. (2020). "Generation, development and modifications of natural fibers." *IntechOpen eBooks*. Disponible en: <https://doi.org/10.5772/intechopen.78111>[Consulta 15 de agosto de 2023]
25. Dowsett, K. F., y Knott, L. M. (1996). "The influence of age and breed on stallion semen." *Theriogenology*, 46(3), 397-412. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(96\)00162-8](https://doi.org/10.1016/0093-691x(96)00162-8) [Consulta 15 de agosto de 2023]
26. Feron, V., Jetten, J., De Kruijf, N., y Van Den Berg, F. (1994). "Polyethylene terephthalate Bottles (PRBs): a health and safety assessment." *Food additives and contaminants*, 11(5), 571-594. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/02652039409374258>[Consulta 15 de agosto de 2023]
27. Filella, X., Molina, R., y Ballesta, A. (2002). "Estructura y función de las citocinas." *Medicina Integral*, 39(2), 63–71. Disponible en <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-estructura-funcion-citocinas-13026682> [Consulta 15 de agosto de 2023]
28. Franeker, J., Blaize, C., Danielsen, J., Fairclough, K., Gollan, J., Guse, N., Hansen, P.-L., Heubeck, M., Jensen, J.-K., Le Guillou, G., Olsen, B., Olsen, K., Pedersen, J., Stienen, E., y Turner, D. (2011). "Monitoring plastic ingestion by the northern fulmar *Fulmarus glacialis* in the North Sea." *Environmental Pollution*, 159(10), 2609–2615. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.06.008>[Consulta 15 de agosto de 2023]
29. Gacem, S. A., Valverde, A., Catalán, J., Yáñez-Ortiz, I., Soler, C., y Miró, J. (2021). "A new approach of sperm motility subpopulation structure in donkey and horse." *Frontiers in Veterinary Science*, 8. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.651477>[Consulta 15 de agosto de 2023]

30. Ge, J., Li, H., Liu, P., Zhang, Z., Ouyang, Z., y Guo, X. (2021). "Review of the toxic effect of microplastics on terrestrial and aquatic plants." *The Science of the Total Environment*, 791(148333), 148333. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148333>[Consulta 15 de agosto de 2023]
31. Gibb Z, Aitken RJ.(2016). "Recent developments in stallion semen preservation." *J Equine Vet Sci* 2016; 43:S, 29e36. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080616301290> [Consulta 15 de agosto de 2023]
32. Giraldo, N. A., Correa J.E (2022). Evaluación del efecto de la refrigeración sobre la calidad del semen equino. [en línea] [Consulta 15 de agosto de 2023] Disponible en: <https://repository.ces.edu.co/handle/10946/6615>
33. Gloria, A., Contri, A., Wegher, L., Vignola, G., Dellamaria, D., & Carluccio, A. (2014). "The effects of antibiotic additions to extenders on fresh and frozen-thawed bull semen." *Animal Reproduction Science*, 150(1-2), 15-23. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.08.012>[Consulta 15 de agosto de 2023]
34. Gregory, M. R. (2009). "Environmental implications of plastic debris in marine settings entanglement, ingestion, smothering, hangers on, hitchhiking and alien invasions." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1526), 2013-2025. Disponible en: <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0265> [Consulta 15 de agosto de 2023]
35. Hale, R. C., Seeley, M. E., La Guardia, M. J., Mai, L., y Zeng, E. Y. (2020). "A global perspective on microplastics." *Journal of Geophysical Research. Oceans*, 125(1).Disponible en: <https://doi.org/10.1029/2018jc014719>[Consulta 15 de agosto de 2023]
36. Hartwig F., Lisboa F., Hartwig F., Monteiro G., Maziero R., Freitas- Dell`Aqua P., Alvarenga MA, Papa FO, Dell`Aqua JA.(2014) "Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an alternative for bad cooler stallions." *Theriogenology* 2014;81: 340e6. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.10.003
37. Hernandez-Aviles,C ., Serafini,R., Love, C., Teague, S., LaCaze K.A., Lawhon, S.D., Wu J., Blanchard. T.L., Varner, D.(2018) "The effects of antibiotic type and extender storage method on sperm quality and antibacterial effectiveness in fresh and cooled-stored stallion semen." *Theriogenology* 122 (2018) 23-29. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.08.022> <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.08.022>
38. Hidalgo, M. (1997). *Polímeros entrecruzados a base de PVC: síntesis, caracterización y propiedades*. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=15350>
39. IDE [en línea] [consulta: 26/08/23]. Disponible en: <https://ide-e.com/>
40. Johnson, L., Weitze, K., Fiser, P., y Maxwell, W. M. (2000). "Storage of boar semen." *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 143-172. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00157-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00157-3) [Consulta 15 de agosto de 2023].
41. Kabir, M. J., Wang, H., Lau, K., y Cardona, F. (2012). "Chemical treatments on plant-based natural fibre reinforced polymer composites: an overview." *Composites Part B-engineering*, 43(7), 2883-2892. Disponibe en: <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2012.04.053> Consulta 15 de agosto de 2023]
42. Kareskoski A, Reilas T, Andersson M, Katila T. (2006)" Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage." *Reprod Domest Anim* 2006; 41:33-8. doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00647. x.
43. Kotilainen, T., Huhtinen, M., & Katila, T. (1994). "Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus." *Theriogenology*, 41(3), 629-636. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(94\)90173-g](https://doi.org/10.1016/0093-691x(94)90173-g) [Consulta 15 de agosto de 2023].
44. Kowalczyk, A., Czerniawska-Piątkowska, E., y Kuczaj, M. (2019). "Factors influencing the popularity of artificial insemination of mares in Europe." *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 9(7), 460. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ani9070460>[Consulta 15 de agosto de 2023].

45. Latko-Durałek, P., Dydek, K., y Boczkowska, A. (2019). "Thermal, rheological and mechanical properties of PETG/rPETG blends." *Journal of Polymers and the Environment*, 27(11), 2600–2606. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01544-6>[Consulta 15 de agosto de 2023].
46. Love, C., Thompson, J., Brinsko, S., Rigby, S., Blanchard, T., Lowry, V., y Varner, D. (2003). "Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry." *Theriogenology*, 60(6), 1127–1138. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00122-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00122-5)[Consulta 15 de agosto de 2023].
47. Lozano, D.; Gil, L.; Álvarez, C. (2011). "Efecto de la adición de plasma seminal en el semen equino descongelado." *Sanidad Militar* 67(3):284-290. Doi: 10.4321/S1887-85712011000400005
48. Magapor. (2020). Magapor lanza iGreen, el primer catéter con tubo biodegradable | Disponible en: <https://magapor.com/sala-prensa/magapor-lanza-igreen-el-primer-cateter-biodegradable/>[Consulta 15 de agosto de 2023].
49. Malaluang, P., Wilén, E., Lindahl, J., Hansson, I., y Morrell, J. M. (2021). "Antimicrobial resistance in equine reproduction." *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 11(11), 3035. Doi: 10.3390/ani11113035.
50. Mammo, F. K., Amoah, I. D., Gani, K. M., Pillay, L., Ratha, S. K., Bux, F., y Kumari, S. (2020). "Microplastics in the environment: Interactions with microbes and chemical contaminants." *The Science of the Total Environment*, 743(140518), 140518. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140518> [Consulta 15 de agosto de 2023].
51. Mercogliano, R., Avio, C., Regoli, F., Anastasio, A., Colavita, G., y Santonicola, S. (2020). "Occurrence of microplastics in commercial seafood under the perspective of the human food chain. A review." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(19), 5296–5301. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01209>[Consulta 15 de agosto de 2023].
52. Moran DM, Jasko DJ, Squires EL, Amann RP (1992). "Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa." *Theriogenology* 1992; 38:999-1012. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X92901147>[Consulta 15 de agosto de 2023].
53. Moore, A., Squires, E., Bruemmer, J., y Graham, J. (2006). "Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa." *Journal of Equine Veterinary Science*, 26(5), 215–218. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2006.03.003>[Consulta 15 de agosto de 2023].
54. Morrell J., Klein C, Lundeheim N, Erol E, Troedsson MH. (2014). "Removal of bacteria from stallion semen by colloid centrifugation." *Anim Reprod Sci* 145: 47-53. Disponible en: doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.01.005[Consulta 15 de agosto de 2023].
55. Nath L., Anderson G., McKinnon A. (2010) "Reproductive efficiency of Thoroughbred and Standardbred horses in north-east Victoria." *Aust. Vet. J.* 2010; 88:169–175. doi: 10.1111/j.1751-0813.2010.00565. x.
56. Olamitibo, D., Dayo, O., Abioja, M., Mathew, A., Olowofeso, O., Emmanuel, O. O., Oluwafemi, A. E., Amidu, S., y Ayobami, I. (2016). "Effects of avocado seed extract in different trisextenders on sperm and oxidative stress indices of vitrified goat spermatozoa." *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*, 61(4), 359-374. Disponible en: <https://doi.org/10.2298/jas1604359o> [Consulta 15 de agosto de 2023].
57. Oliveira, R., Scarlet, D., Ille, N., y Aurich, C. (2017). "Cooled-storage of equine semen does not induce major changes in sperm DNA methylation." *Theriogenology*, 89, 289–294. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.009>[Consulta 15 de agosto de 2023].
58. Papa F., Melo C., Fioratti E., Dell'Aqua J., Zahn F., Alvarenga M.(2008). "Freezing of stallion epididymal sperm." *Anim Reprod Sci* 2008; 107:293–301. doi:10.1016/ j. anireprosci.2008.05.003.

59. Paparella, C., Pavesi, A., Feldman, R., y Bouvet, B. (2015). "Importancia de la evaluación del estrés oxidativo en el semen humano." *Archivos de medicina interna (Montevideo, Uruguay)*, 37(1), 7–14. Disponible en: [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1688-423X2015000100002](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-423X2015000100002)[Consulta 15 de agosto de 2023].
60. Pappa, O., Chochlakis, D., Sandalakis, V., Dioli, C., Psaroulaki, A., y Mavridou, A. (2020). "Antibiotic Resistance of Legionella pneumophila in Clinical and Water Isolates—A Systematic Review." *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(16), 5809. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijerph17165809>[Consulta 15 de agosto de 2023].
61. Peñalosa, A. (2022). Búsqueda de materiales biodegradables para su uso en los sistemas de preservación espermática en la especie equina. Trabajo de Fin de grado. Universidad de Zaragoza.
62. Phillips, J., Bramwell, R., y Graham, J. (1996). "Cryopreservation of rooster sperm using methyl cellulose." *Poultry Science*, 75(7), 915–923. Disponible en: <https://doi.org/10.3382/ps.0750915>[Consulta 15 de agosto de 2023].
63. Quiñones, C. (2022). Análisis del efecto de la estacionalidad en la fragmentación del ADN espermático y caracterización de la flora microbiana seminal del caballo. Dialnet. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=312381> [Consulta 15 de agosto de 2023].
64. Ramirez Neto, C., Sancler da Silva, Y., Resende, H., Guasti, P., Monteiro, G., Papa, P., Dell'aqua Júnior, J., Puoli Filho, J., Alvarenga, M., y Papa, F (2015). "Control methods and evaluation of bacterial growth on fresh and cooled stallion semen." *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(4), 277–282. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.01.014>[Consulta 15 de agosto de 2023].
65. Restrepo, G., Ocampo, D. y Velásquez, A. (2013). "Evaluación de la movilidad del semen criopreservado de caballos criollo colombiano por un sistema analizador de clase." *Revista Udca Actualidad y Divulgacion Científica*, 16(2), 445–450. Disponible en: <https://doi.org/10.31910/rudca.v16.n2.2013.917>[Consulta 15 de agosto de 2023].
66. Retema Solo el 9% de los residuos plásticos generados en el mundo se recicla, según la OCDE [en línea] [Consulta 15 de agosto de 2023] Disponible en: <https://www.retema.es/actualidad/solo-el-9-de-los-residuos-plasticos-generados-en-el-mundo-se-recicla-segun-la-ocde>
67. Rodríguez, I. (2009). Inseminación artificial o monta dirigida en la yegua. *Producción Animal. com*. Disponible en: [https://produccionanimal.com.ar/produccion\\_equinos/produccion\\_equina\\_en\\_general/70-Inseminacion\\_artificial.pdf](https://produccionanimal.com.ar/produccion_equinos/produccion_equina_en_general/70-Inseminacion_artificial.pdf)
68. Rodríguez, J. (2011). *Utilización de subproductos de aguacate para la mejora de las características nutricionales y la estabilidad oxidativa de hamburguesas de cerdo*. Dialnet. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=180843>[Consulta 15 de agosto de 2023]
69. Russell, P., Lyaruu, V., Millar, J. D., Curry, M., y Watson, P. (1997). "The potential transmission of infectious agents by semen packaging during storage for artificial insemination." *Animal Reproduction Science*, 47(4), 337-342. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(97\)00017-1](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(97)00017-1)[Consulta 15 de agosto de 2023].
70. Sanjay, M., Arpitha, G., Naik, L., Gopalakrishna, K., y Yogesha, B. (2016). "Applications of natural fibers and its composites: An overview." *Natural Resources*, 07(03), 108–114. Disponible en: <https://doi.org/10.4236/nr.2016.73011>[Consulta 15 de agosto de 2023].
71. Sharafi, M., Borghei-Rad, S. M., Hezavehei, M., Shahverdi, A., y Benson, J. D. (2022). "Cryopreservation of semen in domestic animals: A review of current challenges, applications, and prospective strategies." *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 12(23), 3271. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ani12233271>[Consulta 15 de agosto de 2023].

72. Silva, M., Maldonado, G., Castro, R., de Sá Felizardo, J., Cardoso, R., Anjos, R. dos, y Araújo, F. de. (2019). "Dispersal of potentially pathogenic bacteria by plastic debris in Guanabara Bay, RJ, Brazil." *Marine Pollution Bulletin*, 141, 561–568. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.02.064>[Consulta 15 de agosto de 2023].
73. Syberg, K. (2022). "Why recycling isn't the answer to the plastic pollution problem." *Scientific American*. Disponible en: <https://www.scientificamerican.com/article/why-recycling-isnt-the-answer-to-the-plastic-pollution-problem/>. [Consulta 15 de agosto de 2023].
74. Valencia (2006) Elaboración de diluyentes de semen porcino. [en línea] [Consulta 15 de agosto de 2023] Disponible en: <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/2640>
75. Villada, H., Acosta, H., y Velasco, R. (2007). "Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables." *Temas agrarios*, 12(2), 5-19. Disponible en: <https://doi.org/10.21897/rta.v12i2.652>[Consulta 15 de agosto de 2023].
76. Vroman, I., y Tighzert, L. (2009). "Biodegradable polymers." *Materials*, 2(2), 307–344. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ma2020307>[Consulta 15 de agosto de 2023].
77. Wang, F., Wong, C. S., Chen, D., Lu, X., Wang, F., & Zeng, E. Y. (2018). "Interaction of toxic chemicals with microplastics: A critical review." *Water Research*, 139, 208–219. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.003> [Consulta 15 de agosto de 2023].
78. Wang, H., Sui, Q., Zhao, J., Sun, X., Zhu, L., Chen, B., Qu, K., y Xia, B. (2023). "Ocean acidification enhances the embryotoxicity of CuO nanoparticles to *Oryzias melastigma*." *Journal of Hazardous Materials*, 453(131361), 131361. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131361>[Consulta 15 de agosto de 2023].
79. Watnick, P., y Kolter, R. (2000). "Biofilm, city of microbes." *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2675–2679. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/jb.182.10.2675-2679.2000>[Consulta 15 de agosto de 2023].
80. Watson, P. (2000). "The causes of reduced fertility with cryopreserved semen." *Animal Reproduction Science*, 60–61, 481–492. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00099-3)[Consulta 15 de agosto de 2023].
81. Webb, G., Dean, M., Humes, R., y Heywood, J. (2009). "A Comparison of the Ability of Three Commercially Available Diluents to Maintain the Motility of Cold Stored Stallion Semen." *Journal of Equine Veterinary Science*, 29(4), 229–232. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2009.03.003>[Consulta 15 de agosto de 2023].
82. Willett, J. (1994). "Mechanical properties of LDPE/Granular starch composites." *Journal of Applied Polymer Science*, 54(11), 1685-1695. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/app.1994.070541112>[Consulta 15 de agosto de 2023].
83. Xie, X., Deng, T., Duan, J., Xie, J., Yuan, J., y Chen, M. (2020). "Exposure to polystyrene microplastics causes reproductive toxicity through oxidative stress and activation of the P38 MAPK signaling pathway." *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110133. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110133>[Consulta 15 de agosto de 2023].
84. Zettler, E., Mincer, T., y Amaral-Zettler, L. (2013). "Life in the "plastisphere": Microbial communities on plastic marine debris." *Environmental Science & Technology*, 47(13), 7137–7146. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/es401288x>[Consulta 15 de agosto de 2023].
85. Zou, Y., Feng, Y., Wang, L., y Liu, X. (2004). "Processing and properties of MWNT/HDPE composites." *Carbon*, 42(2), 271-277. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2003.10.028>[Consulta 15 de agosto de 2023].

