

Títol del treball:

**STUDY OF THE APPLICABILITY OF I₂-COSAN AS A PRESERVATIVE FOR BOAR SEMEN
ESTUDI DE L'APLICABILITAT DEL I₂-COSAN COM A PRESERVANT DEL SEMEN PORCÍ**

Nom estudiant: MARGALIDA CABRER FRAU

Correu electrònic: margalidacabrerfrau@gmail.com

Grau en: BIOLOGIA

Nom del tutor: MARGARITA MARTÍNEZ MEDINA

Correu electrònic: marga.martinez@udg.edu

Nom del cotutor* (en cas de places externes):

Correu electrònic:

Empresa / Institució:

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat realitzat en col·laboració de l'empresa Batallé S. L. (Girona, Catalunya), que s'ha encarregat de subministrar les diferents mostres seminals utilitzades.

Voldria agrair a la meva tutora Margarita Martínez tot l'esforç, paciència i dedicació que ha mostrat al llarg de tot el treball, i a l'Eva Bussalleu i la Mailo Briz, per l'ajuda incondicional al laboratori. També agrair l'ajuda de la Clara Viñas en la redacció de la memòria. Sense elles aquest treball no hauria estat possible.

M'agradaria fer una dedicació especial a la Jana Ausió i l'Aida Martínez, per haver estat amb mi des de primer de carrera, creant una amistat que perdurarà per sempre, i a la Júlia Jiménez per l'enorme suport rebut per part seva. Agrair també a la meva família tot l'esforç que han fet perquè em pogués treure la carrera i perquè tingués un futur. Moltes gràcies a tots.

RESUM

Les dosis seminals necessiten ser conservades en un diluent amb antibiòtics per tal d'evitar la contaminació bacteriana, que pot causar infeccions en la femella, afectar la fecundació i els paràmetres de qualitat espermàtica, tot i que la necessitat d'aquestes dosis no és únicament per inseminació artificial, sinó també per veterinària i medicina humana. L'augment de les resistències als antibiòtics és una problemàtica que ha portat a l'increment de la investigació de nous compostos antimicrobians que puguin fer front als bacteris multiresistents. En un estudi previ, s'ha demostrat l'activitat bactericida del metal-lacarborà I₂-COSAN *in vitro*. Amb l'objectiu d'estudiar l'aplicabilitat d'aquest compost com a preservant del semen porcí, en aquest treball s'ha estudiat l'efecte del I₂-COSAN en la qualitat espermàtica de mostres no infectades i mostres infectades amb *Staphylococcus aureus* MRSA i *Escherichia coli* BLEE, així com la seva activitat antimicrobiana en aquestes mostres. Per a l'estudi de l'impacte en el semen porcí, s'ha estudiat l'efecte a nivell de motilitat, viabilitat i morfologia a través de CASA (*Computer-assisted sperm analysis*). L'estudi de l'activitat antimicrobiana s'ha realitzat quantificant les cèl·lules viables a diferents temps (0h, 24h i 48h). El compost no afecta la viabilitat dels espermatozoides, però sí que afecta la seva motilitat. També s'ha fet una posada a punt del protocol, descobrint que la centrifugació afecta molt la motilitat dels espermatozoides, la qual cosa serà aplicable en futurs estudis realitzats amb altres compostos similars. En els assajos duts a terme per testar l'efecte antimicrobià del I₂-COSAN en *S. aureus*, es veu un percentatge de reducció de la viabilitat bacteriana similar en tots els tractaments. Pel que fa a *E. coli*, no es van obtenir resultats, a causa del fet que el bacteri es mor a les 24h en les mostres seminals. Això indica que hi ha alguna cosa en les mostres seminals de porc que afecta els bacteris testats, essent *E. coli* més sensible que *S. aureus*. El fet que el compost afecti greument la motilitat espermàtica limita la seva aplicabilitat en la preservació d'aquestes mostres, així que caldria estudiar altres compostos similars, per tal de refutar totalment l'aplicabilitat dels metalacarborans per a la preservació de mostres seminals.

RESUMEN

Las dosis seminales necesitan ser conservadas en un diluyente con antibióticos para evitar la contaminación bacteriana, que puede causar infecciones en la hembra, afectar la fecundación y los parámetros de calidad espermática, aunque la necesidad de estas dosis no es únicamente para inseminación artificial, sino también para veterinaria y medicina humana. El aumento de las resistencias a los antibióticos es una problemática que ha llevado al incremento de la investigación de nuevos compuestos antimicrobianos que puedan hacer frente a las bacterias multiresistentes. En un estudio previo, se ha demostrado la actividad bactericida del metalacarborano I₂-COSAN *in vitro*. Con el objetivo de estudiar la aplicabilidad de este compuesto como preservante del semen de cerdo, en este trabajo se ha estudiado el efecto del I₂-COSAN en la calidad espermática de muestras no infectadas y muestras infectadas con *Staphylococcus aureus* MRSA y *Escherichia coli* BLEE, así como su actividad antimicrobiana en estas muestras. Para el estudio del impacto en el semen de cerdo, se ha estudiado el efecto a nivel de motilidad, viabilidad y morfología a través de CASA (*Computer-assisted sperm analysis*). El estudio de la actividad antimicrobiana se ha realizado cuantificando las células viables a diferentes tiempos (0h, 24h y 48h). El compuesto no afecta la viabilidad de los espermatozoides, pero sí que afecta su motilidad. También se ha hecho una puesta a punto del protocolo, descubriendo que la centrifugación afecta mucho la motilidad de los espermatozoides, lo que será aplicable en futuros estudios realizados con otros compuestos similares. En los ensayos efectuados para testar el efecto antimicrobiano del I₂-COSAN en *S. aureus*, se ve un porcentaje de reducción de la viabilidad bacteriana similar en todos los tratamientos. Por lo que refiere a *E. coli*, no se obtuvieron resultados, debido a que la bacteria se muere a las 24h en las muestras seminales. Eso indica que hay alguna cosa en las muestras seminales de cerdo que afecta las bacterias testadas, siendo *E. coli* más sensible que *S. aureus*. El hecho que el compuesto afecte gravemente la motilidad espermática limita su aplicabilidad en la preservación de estas muestras, así que haría falta estudiar otros compuestos similares, con la finalidad de refutar totalmente la aplicabilidad de los metalacarboranos en la preservación de muestras seminales.

ABSTRACT

Seminal doses need to be preserved in a diluent with antibiotics to avoid bacterial contamination, which can cause infections in the female, affect fertilization and sperm quality parameters, although the need for these doses is not only for artificial insemination, but also for veterinary and human medicine. The increase in antibiotic resistance is a problem that has led to increased research into new antimicrobial compounds that can deal with multiresistant bacteria. In a previous study, the bactericidal activity of metalacarborane I₂-COSAN *in vitro* has been demonstrated. In order to study the applicability of this compound as a preservative for boar semen, the effect of I₂-COSAN on the sperm quality of uninfected samples and samples infected with *Staphylococcus aureus* MRSA and *Escherichia coli* BLEE, as well as its antimicrobial activity in these samples, was studied in this work. For the study of the impact on boar semen, the effect on motility, viability and morphology was studied through CASA (*Computer-assisted sperm analysis*). The study of the antimicrobial activity has been carried out by quantifying viable cells at different times (0h, 24h and 48h). The compound does not affect the viability of spermatozoa, but it does affect their motility. A fine-tuning of the protocol has also been done, finding that centrifugation greatly affects sperm motility, which will be applicable in future studies performed with other similar compounds. In the assays carried out to test the antimicrobial effect of I₂-COSAN on *S. aureus*, a similar percentage reduction of bacterial viability was observed in all treatments. As far as *E. coli* is concerned, no results were obtained, because the bacterium die after 24h in the seminal samples. This indicates that there is something in the boar seminal samples that affects the tested bacteria, being *E. coli* more sensible than *S. aureus*. The fact that the compound severely affects sperm motility limits its applicability in the preservation of these samples, so it would be necessary to study other similar compounds, in order to completely refute the applicability of metalacarboranes in the preservation of seminal samples.

ÍNDEX

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓ | 1 |
| 1.1. ANTIBIÒTICS I RESISTÈNCIA | 1 |
| 1.2. COMPOSTOS ANTIMICROBIANS ALTERNATIUS ALS ANTIBIÒTICS PER PRESERVAR MOSTRES SEMINALS. | 2 |
| 1.2.1. PÈPTIDS ANTIMICROBIANS..... | 3 |
| 1.2.2. COMPOSTOS METAL·LACARBORANS | 4 |
| 1.2.3. COSAN I DERIVATS (I ₂ -COSAN) | 6 |
| 1.2.4. EFECTE ANTIMICROBIÀ DELS METAL·LACARBORANS | 7 |
| 1.3. MEMBRANA DELS BACTERIS GRAM POSITIUS I GRAMNEGATIUS | 8 |
| 2. OBJECTIVES..... | 9 |
| 3. MATERIALS I MÈTODES..... | 10 |
| 3.1. MOSTRES SEMINALS | 10 |
| 3.3. RESUSPENSÍO DE BACTERIS I INFECCIÓ | 12 |
| 3.4. ANÀLISI DE LA QUALITAT ESPERMÀTICA..... | 12 |
| 3.5. EFECTE ANTIMICROBIÀ DEL I ₂ -COSAN EN MOSTRES SEMINALS..... | 13 |
| 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ..... | 14 |
| 4.1. EFECTE DE LA CENTRIFUGACIÓ DE LES DOSIS SEMINALS EN LA QUALITAT ESPERMÀTICA..... | 14 |
| 4.2. EFECTE DEL I ₂ -COSAN EN LA QUALITAT ESPERMÀTICA..... | 16 |
| 4.3. EFECTE DEL I ₂ -COSAN EN LA QUALITAT ESPERMÀTICA DE MOSTRES INFECTADES..... | 18 |
| 4.4. EFECTE ANTIMICROBIÀ DEL I ₂ -COSAN EN MOSTRES SEMINALS..... | 20 |
| 5. CONCLUSIONS | 23 |
| 6. REFLEXIÓ ÈTICA..... | 24 |
| 7. REFLEXIÓ PERSPECTIVA DE GÈNERE | 25 |
| 8. BIBLIOGRAFIA..... | 27 |

1. INTRODUCCIÓ

1.1. ANTIBIÒTICS I RESISTÈNCIA

Les malalties infeccioses continuen essent avui en dia una de les causes principals de mortalitat humana, però l'aparició dels antibiòtics el 1928 va permetre l'augment de la taxa de vida [1] i va permetre lluitar contra els microorganismes causants d'aquestes malalties.

Els antibiòtics es defineixen com una substància química natural (però també pot ser semisintètica o sintètica [2]) produïda per microorganismes capaços d'inhibir o, fins i tot, destruir altres microorganismes [3]. Es caracteritzen per tenir toxicitat selectiva, capacitat que els hi permet afectar negativament els bacteris i altres microorganismes, però no afectar negativament les cèl·lules hoste [4]. La majoria d'aquests presenten espectres diferents d'activitat, essent efectius alguns només contra gramnegatius, altres només contra grampositius, i d'altres contra els dos [5].

Aquests compostos duen a terme la seva funció antimicrobiana a través de diversos models d'acció, principalment: (1) inhibint la formació de la paret cel·lular, com les penicil·lines i cefalosporines, (2) desestabilitzant l'estructura i la funció de les membranes cel·lulars, com els lipopèptids i polipèptids, (3) inhibint la síntesi de proteïnes, com les tetraciclines i els macròlids o (4) prevenint la síntesi d'RNA o DNA, com les quinolines [6].

Malgrat això, els efectes dels antibiòtics es veuen compromesos pel fet que s'han estat usant innecessàriament i en excés, causant un gran augment de la resistència, la qual és superior en aquells països que els utilitzen en més quantitat [7].

Els bacteris poden ser resistents naturalment, però també pot ser que aquesta resistència hagi estat adquirida per mutacions cromosòmiques o per transferència lateral de gens [8]. Per tant, la base genètica d'aquesta resistència a antibiòtics és la plasticitat genètica que presenten els bacteris, que els hi permet adaptar-se a una gran quantitat d'ambients, incloent-hi un ambient on destaca la presència d'antibiòtics [9].

Alguns dels antibiòtics inhibeixen el creixement dels bacteris creuant la membrana cel·lular i interaccionant amb el receptor a una concentració prou elevada per a exercir

un efecte. En aquests passos és on es basen els mecanismes per fer-los front, els quals es poden agrupar, des del punt de vista bioquímic, en mecanismes que modifiquen la diana, o mecanismes que modifiquen el mateix antibiòtic o la seva concentració. La modificació de la diana es pot aconseguir per mutació, reemplaçament, modificació enzimàtica o protecció, mentre que la reducció de la concentració d'antibiòtic es pot aconseguir impedit l'entrada d'aquest o expulsant-lo a través de bombes d'eflux. També hi poden haver mecanismes que canviïn l'estructura de l'antibiòtic, com mutacions en l'enzim que activa un preantibiòtic o la presència d'enzims inhibidors dels antibiòtics [10].

Les diferents resistències que han anat sorgint han donat lloc a l'aparició dels bacteris multiresistents, aquells que són resistents a tres o més classes de drogues i són susceptibles a no més de dues classes [11]. El 2017, l'OMS va publicar una llista dels patògens que estaven desenvolupant aquesta multiresistència, on destaca el grup ESKAPE, el qual va ser designat d'estat prioritari: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* espècies. Malgrat que *Escherichia coli* no estigui present en aquest grup, és identificat com una de les principals causes de les infeccions sanguínies i urinàries, essent un dels principals problemes clínics que afecten la salut humana i animal [12]. A més, és un dels bacteris més estudiats d'ençà que la seva presència en el semen indueix l'aglutinació i la baixa motilitat espermàtica, i pot tenir efectes espermicides sense un ambient acídic [13].

L'augment accelerat dels patògens multiresistents, combinat amb el lent descobriment de nous antibiòtics, és causant d'unes 25.000 morts anuals a Europa, i 700.000 a tot el món. Així que és necessari el desenvolupament de noves classes químiques d'antibiòtics, amb nous mètodes d'acció o interacció amb les dianes [7].

1.2. COMPOSTOS ANTIMICROBIANS ALTERNATIUS ALS ANTIBIÒTICS PER PRESERVAR MOSTRES SEMINALS.

Els antibiòtics tenen una gran importància en la preservació de mostres seminals de porc procedents de granges per tal de garantir una vida llarga i útil dels

espermatozoides, reduir la transmissió de patògens dins del tracte reproductor femení [14] i prevenir la dispersió d'epizoòtics (com brucel·losis, clamídia o leptospirosis) [15].

Per preservar el semen, els antibiòtics addicionats han de presentar les següents qualitats: activitat antimicrobiana amb un ampli espectre, absència de citotoxicitat, no ha d'interferir amb la fertilitat, elevada estabilitat, facilitat d'aplicació i baix cost de producció [15].

Els bacteris es troben freqüentment en els ejaculats porcins acabats de recuperar, sent perjudicials per a la qualitat espermàtica. A més, sembla que la contaminació bacteriana pot tenir efectes sobre la fecunditat en condicions naturals d'aparellament [16]. A banda del tipus i quantitat inicial de gèrmens en el semen, hi ha factors de risc que poden augmentar el contingut d'aquests en ejaculats diluïts, com serien: una taxa de refredament retardada de les mostres de semen acabat de processar, una temperatura elevada durant el transport i emmagatzematge, durada àmplia d'emmagatzematge i la composició dels extensors. La majoria d'aquests bacteris són gramnegatius, de la família de les enterobacteriàcies. Són patògens oportunistes relacionats amb infeccions nosocomials en humans i animals, així que suposen un risc en la propagació de bacteris multiresistents en l'ambient [14].

Els antimicrobians són un component de les extensions seminals que ajuden al control de la contaminació bacteriana i al seu creixement. Els més comuns utilitzats avui en dia per preservar mostres seminals són els aminoglicòsids, a més dels β -lactàmics, lincosamides i macròlids [17].

1.2.1. PÈPTIDS ANTIMICROBIANS.

A causa de l'augment de la resistència als antibiòtics, ha augmentat l'estudi d'alternatives que puguin fer front als bacteris multiresistents.

Un exemple són els pèptids antimicrobians (AMPs), els quals ja s'ha descobert la seva acció antimicrobiana i la seva utilitat en la preservació de mostres seminals. Són unes molècules naturals majoritàriament catióniques i amfipàtiques, la qual cosa afavoreix la interacció amb les membranes bacterianes [15]. La separació espacial entre els constituents catiónics i hidrofòbics és un prerrequisit essencial per la seva interacció efectiva amb les membranes bacterianes. Les interaccions hidrofòbiques permeten

als pèptids introduir-se dins de les regions hidrofòbiques de la bicapa lipídica i, en contrast amb els antibiòtics convencionals, desestabilitza la membrana bacteriana directament [18].

Per a poder aplicar aquests pèptids, és important que tinguin un impacte menor en les cèl·lules eucariotes. La unió dels AMPs en les membranes plasmàtiques eucariotes no és possible d'ençà que els lípids que suporten les càrregues negatives estan localitzats majoritàriament en la cara citoplasmàtica de les cèl·lules eucariotes, en contrast amb les cèl·lules procariotes. A més, la presència de colesterol en les membranes eucariotes limita la inserció a la membrana [18].

A més de l'activitat antimicrobiana, els pèptids antimicrobians participen en la proliferació cel·lular, regeneració cel·lular, angiogènesi i reaccions a les respostes inflammatòries agudes. Això és possible gràcies al fet que són sintetitzats en els mamífers, particularment en el teixit epitelial de la pell, tracte digestiu, sistema respiratori i sistema reproductor [15].

S'ha vist com els bacteris són menys propensos a desenvolupar resistència als AMPs que als antibiòtics convencionals, perquè les vies tòxiques dels AMPs normalment provoquen lisis cel·lulars a través d'una disrupció inespecífica de la bicapa lipídica, en lloc de través d'una interacció amb la seva diana específica [19]. D'altra banda, el fet que els bacteris no hagin estat exposats prèviament a aquests compostos, facilita la seva acció antimicrobiana.

1.2.2. COMPOSTOS METAL·LACARBORANS

Els compostos basats en bor són unes molècules molt estudiades avui en dia com a antimicrobians prometedors que podrien fer front a l'augment de les resistències i a la disminució de l'efectivitat d'alguns antibiòtics.

El bor és un element químic que, juntament amb el carboni, té la propietat d'autoenllaçar-se, formant els clústers de bor. Aquests consisteixen en una estructura polièdrica formada per diferents vèrtexs amb diversos àtoms de bor i heteroàtoms, donant lloc a compostos amb diferents formes i simetries, dintre dels quals s'hi troben els clústers de bor icosaèdrics, que són els més estables [20] i que presenten els

àtoms de C i B connectats per enllaços covalents [21]. El més senzill d'aquests és l'anió dodecarborà $[B_{12}H_{12}]^{2-}$, que consisteix en només àtoms de B i H [20].

Dins dels clústers de bor s'hi troben els clústers híbrids, carborans i metal·lacarborans; cap d'ells existeix naturalment i són purament abiòtics [6]. Són molècules fetes pels humans que tenen propietats importants: estabilitat tèrmica, química i biològica, baixa toxicitat i poden ser hidrofòbics, hidrofílics o amfifílics [22], depenent de si són neutres o aniònics i en aquests darrers, el seu caràcter lipofílic depèn del catió. Aquests clústers presenten aromaticitat 3D [23], elevada rigidesa esquelètica i habilitat per formar enllaços d'hidrogen i dihidrogen [24].

Els carborans són un grup d'heteroàtoms derivats de l'anió dodecarborà, on un o més vèrtexs BH són reemplaçats per un grup CH+. Si presenten un vèrtex CH $[CB_{11}H_{12}]^-$ són anions, mentre que els que tenen dos vèrtexs CH són elèctricament neutres i existeixen en tres formes isomèriques depenent de la posició dels dos vèrtexs de C del clúster dintre de la molècula: *orto-*, *meta-* i *para-*dodecarborà (*Figura 1*). En el cas que presenti els dotze vèrtexs, s'anomena *closo-* i si li falta un BH, *nido-*. Els segons poden ser obtinguts a partir dels primers, fent-los reaccionar amb un nucleòfil, la qual cosa porta a l'eliminació d'un dels vèrtexs BH, donant lloc així a l'aparició dels dicarbollides, que es poden unir fàcilment a metalls, formant els metal·lacarborans [20] (*Figura 1*).

Els metal·lacarborans són uns tipus de clústers inorgànics polièdrics formats per C, B, H i per diverses combinacions d'anions metàl·lics, que estan essent molt estudiats a causa de les seves propietats. Es caracteritzen pel seu moviment rotatori relatiu i estabilitat química i tèrmica deguda a la deslocalització de càrrega [25], que consisteix en el fet que presenten càrrega negativa (1-) distribuïda al llarg dels 45 àtoms, modulant la hidrofobicitat i fent que siguin amfifílics [6]. A més, també mostren activitat superficial i auto-assemblatge en medis aquosos, formant vesícules, micel·les i fases liotròfiques lamel·lars [22]. Poden ser vistos com a complexos de sandvitxos metàl·lics, pel fet que l'ió metàl·lic es troba entre dos enllaços [20].

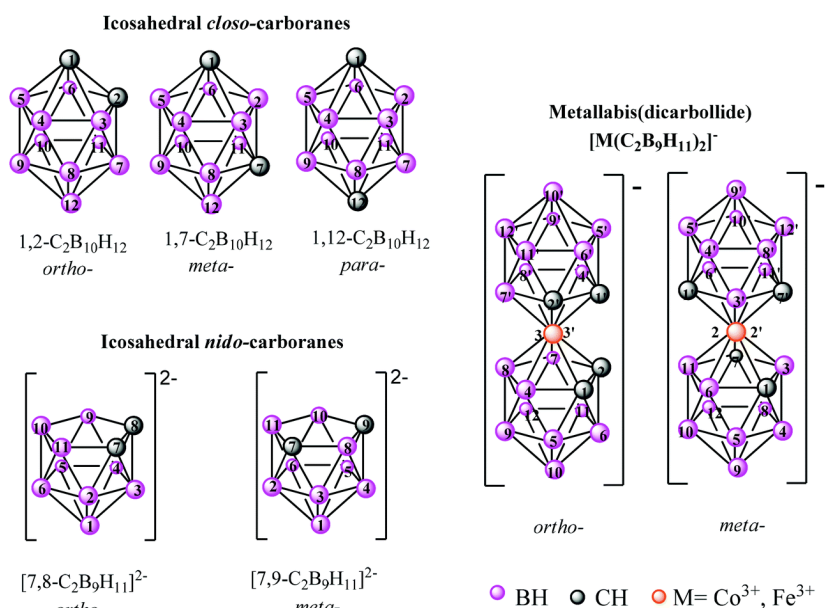


Figura 1: compostos icosaèdrics de bor amb la seva estructura química. Hi ha representats els *closo*-carborans i els seus *nido*-carborans, així com els *metal·lacarborans* (*dicarbollide*). Els cercles liles representen els vèrtex BH, els negres els vèrtex CH i els taronges l'ió metàl·lic, que pot ser cobalt o ferro. Figura extreta de l'article de (Bennour et al., 2022).

1.2.3. COSAN I DERIVATS (I₂-COSAN)

El *metal·lacarborà* millor caracteritzat quant a propietats fisicoquímiques i biològiques és el [COSAN]⁻, cobalt bis (1, 2-*dicarbollide*) [3,3'-Co (1,2-C₂B₉H₁₁)₂]⁻, que presenta un ió cobalt (III) [20].

El COSAN és un anió (1-) que destaca per l'aromaticitat 3D, l'estabilitat química, tèrmica i biològica, la solubilitat en dissolvents polars i apolars, el comportament amfifílic i la distribució de la càrrega negativa per tota la molècula. A més, s'ha vist que pot travessar les membranes lipídiques sintètiques sense alterar la integritat de la membrana, mostra baixa toxicitat *in vitro* i *in vivo* i una alta absorció per cèl·lules canceroses rellevants, acumulant-se *in vitro* dins dels nuclis de les cèl·lules vives [26]. Tot això fa possible la capacitat d'autoassemblar-se formant membranes monocapa en forma de vesícules en solucions aquoses a concentracions per sota de 13 mM, les quals tenen dimensions similars a les membranes biològiques de les cèl·lules, malgrat que en aquest cas, són vesícules amb monocapa [27].

D'altra banda, s'ha descobert que el derivat I₂-COSAN (*Figura 2*), que presenta dos ions de iode en la posició *orto*-, també té la capacitat d'autoassemblar-se i formar les lamel·les a concentracions per sobre de 9 mM, creant vesícules tancades a més baixa concentració [22]. Aquesta molècula presenta més potència en comparació amb el COSAN, perquè s'acumula a l'interior de la cèl·lula en més quantitat i perquè presenta

una major lipofilitat, la qual cosa suggereix que té una major afinitat per l'ambient lipídic [28].

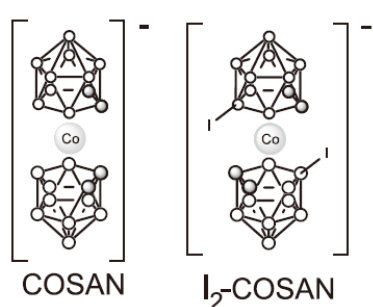


Figura 2: estructura química del compost metal-lacarbonà COSAN i I₂-COSAN, on es veu la seva estructura de sandvitx característica amb un àtom de cobalt (Co) al centre. Es pot diferenciar en el I₂-COSAN la presència de dos àtoms de iode que no estan presents en el compost original. Figura extreta de l'article de (Tarrés et al., 2014).

Les propietats amfifíliques del COSAN i del I₂-COSAN en l'aigua són essencials i tenen aplicacions importants en medicina, com a blocs constructors per drogues o en la *Boron-neutron capture therapy* (BCNT) [21]. La BCNT és una radioteràpia experimental contra el càncer que usa un feix de neutrons epidèrmic. El descobriment dels clústers de bor ha permès aplicar-los com a eines moleculars i drogues potencials en el disseny de nous sistemes bioactius i com a bastides rígides per a la síntesi de nanoestructures 3D amb gran varietat de funcionalitats biològiques [29].

1.2.4. EFFECTE ANTIMICROBIÀ DELS METAL-LACARBORANS

Hi ha una creença creixent de què els compostos de bor són agents antimicrobians prometedors [26] i, de fet, en l'article de Fink & Uchman (2021) es fa una revisió d'alguns d'aquests compostos i la seva activitat antimicrobiana.

En més d'un article, com el de Romero, et al. (2020), es va arribar a la conclusió que el COSAN té efectes contra bacteris grampositius i contra fongs, però no contra bacteris gramnegatius, la qual cosa suggereix que aquests estan naturalment protegits per la membrana externa. Recentment, s'ha demostrat que canvis en l'estructura de la molècula de COSAN, com l'addició de dos grups de iode formant el I₂-COSAN, mostren un efecte millorat contra els bacteris gramnegatius, possiblement degut a canvis en les seves propietats fisicoquímiques en medis aquosos que li permeten una major permeabilitat per travessar la membrana [26]. En aquest estudi també es va mirar la citotoxicitat del compost en cèl·lules eucariotes, calculant la IC₅₀ (concentració que causa el 50% d'inhibició del creixement cel·lular). A partir d'aquest valor i de la MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*), es va veure que aquests compostos

presenten un índex de selectivitat (efecte antimicrobià i baixa toxicitat en cèl·lules humanes i animals) molt elevat, la qual cosa revela que poden ser útils per combatre bacteris multiresistents als antibiòtics.

El fet que aquestes petites molècules es puguin acumular a l'interior de les cèl·lules vives [30], creuin la membrana de les cèl·lules dels mamífers i tinguin activitat antimicrobiana (però baixa toxicitat per les cèl·lules) representa una promesa per a tractar infeccions intracel·lulars bacterianes [26] i combatre l'augment preocupant de les multiresistències.

1.3. MEMBRANA DELS BACTERIS GRAM POSITIUS I GRAMNEGATIUS

Totes les membranes biològiques estan formades per un auto-assemblatge de lípids que es disposen de manera que la seva part polar queda externament, en contacte amb l'ambient aquàtic, i la seva part apolar queda internament, donant lloc així a una barrera hidrofòbica. El manteniment de la integritat de la membrana és essencial pels processos reguladors, com el manteniment de l'homeòstasi [30], i essencial pel control de la distribució dels ions, biomolècules i metabòlits i, quan es trenca, porta a la pèrdua de la viabilitat de la cèl·lula. Per tant, les membranes són les encarregades de relacionar les cèl·lules amb el medi extern [28].

S'han descrit dos tipus de bacteris diferents segons la composició de la seva envolta cel·lular: els gramnegatius i els grampositius (*Figura 3*). Les diferències en l'envolta suposen que els diferents composts interaccionin de manera diferent amb els microorganismes. La resistència intrínseca d'alguns gramnegatius a molts compostos és deguda a la inhabilitat d'aquests agents de creuar la membrana externa [8].

De fet, els bacteris gramnegatius es caracteritzen per presentar una membrana més complexa que els grampositius, ja que presenten tres capes principals: la membrana externa (composta principalment per lipopolisacàrids), la paret cel·lular de peptidoglicà i la membrana citoplasmàtica o interna. Les dues membranes concèntriques delimiten un compartiment cel·lular aquós anomenat periplasma [31]. S'ha vist com aquesta membrana externa constitueix una barrera impermeable per a la majoria dels compostos basats en bor [26].

D'altra banda, els bacteris grampositius es diferencien principalment dels gramnegatius pel fet de no presentar una membrana externa amb lipopolisacàrids (LPS). Això suposa que no tinguin la protecció que aquesta confereix, ja que elimina les molècules tòxiques i proveeixen una estabilitat addicional a la cèl·lula. També cal destacar, que la paret de peptidoglicà que està per sota de la membrana externa en gramnegatius és molt prima, però en grampositius és molt gruixuda, aportant la protecció que no obté a través de la membrana externa [31].

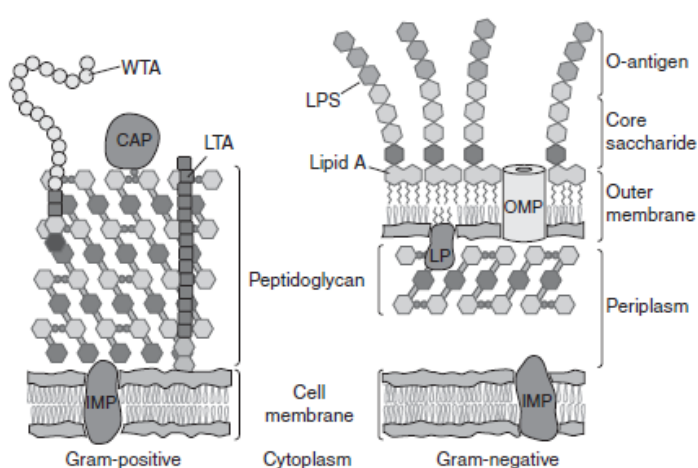


Figura 3: representació de l'envolta dels bacteris grampositius i gramnegatius. Figura extreta de l'article de (Silhavy et al., 2010).

2. OBJECTIVES

There is a need to find new compounds with antimicrobial potential. Since it has been shown that I₂-COSAN has an antimicrobial effect *in vitro*, and low cytotoxicity, the aim of this work was to investigate whether I₂-COSAN would be applicable as an antimicrobial agent in the preservation of seminal doses from boars. The specific objectives were:

OBJECTIVE 1: To analyse the effects of I₂-COSAN at different concentrations on bacterial growth present in seminal doses infected with multiresistant strains of *Escherichia coli* BLEE and *Staphylococcus aureus* MRSA.

OBJECTIVE 2: To check possible cytotoxic effects of different concentrations of I₂-COSAN on boar spermatozoa, looking at different parameters of sperm quality.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. MOSTRES SEMINALS

Es treballa amb mostres seminals de porc de la raça Piétrain, sexualment madurs i que tenen entre 9 i 12 mesos d'edat, procedents de l'empresa Batallé SL (Girona, Catalunya). Es diferencia entre dos tipus de mostra:

- Dosis seminals: es troben en un diluent que conté antibiòtics anomenat Duragen (Batallé SL, Girona, Catalunya), la composició del qual està protegida per patent.
- Ejaculat: es diferencia de les dosis seminals pel fet que el semen, immediatament després de ser recuperat del porc, no es dilueix en Duragen, sinó en *Beltsville Thawing Solution* (BTS), el qual segueix la formulació de Pursel and Johnson (1975) [32]. Aquest no conté antibiòtic, tot i que opcionalment se li pot afegir kanamicina.

Aquestes mostres són aptes per a la comercialització, presentant un mínim de qualitat espermàtica: viabilitat i motilitat total per sobre del 80% i morfologia espermàtica normal per sobre del 85% [33].

Tant les dosis seminals com els ejaculats, s'han fet servir en els diferents assajos duts a terme en aquest estudi (*Taula 1*).

Taula 1: Representació dels assajos fets en aquest estudi. Cada cercle fa referència a un assaig, i els diferents colors indiquen el tipus de mostra emprada. Els negres representen un pool fet a partir de les tres dosis seminals procedents de tres mascles diferents i les grises representen un ejaculat. S'ha testat 4 tractaments: mostra sense tractar (Ø), dues concentracions d'I₂-COSAN, i la mostra tractada amb kanamicina (K+) com a antibiòtic de referència. Aquestes condicions s'han testat a la vegada en mostres contaminades amb un bacteri grampositiu (*Staphylococcus aureus* MRSA soca 182851) i un gramnegatiu (*Escherichia coli* BLEE soca 192348). També s'inclou una mostra sense infectar.

| | Ø I2-COSAN | 4 µg/mL I2-COSAN | 8 µg/mL I2-COSAN | Ø I2-COSAN / K+ |
|--------------------------------------|------------|------------------|------------------|-----------------|
| <i>Escherichia coli</i> BLEE | ● ● ● ● | ● ● ● ● | ● ● ● ● | ● ● ● ● |
| <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA | ● ● ● ● | ● ● ● ● | ● ● ● ● | ● ● ● ● |
| Ø bacteria | ● ● ● | ● ● ● | ● ● ● | ● ● ● |

3.2. PREPARACIÓ DELS TRACTAMENTS

El protocol per a la preparació dels tractaments varia en funció del tipus de mostra que arribi de la granja:

- Dosis seminals: cal centrifugar 15 mL de cada dosi per eliminar el Duragen (1500 rpm, 10'), descartar el sobrenedant, resuspendre en 15 mL BTS sense kanamicina i realitzar un pool de les diferents dosis seminals de les quals disposem, amb la finalitat d'eliminar l'efecte mascle. Es repeteix el procediment, resuspenent en BTS amb kanamicina. Així es tindran uns tractaments amb kanamicina i d'altres sense.

En el cas que es treballi amb dosis seminals, es fa un pool de les tres dosis comprades, procedents de mascles diferents i que es compren de nou en cada assaig.

- Ejaculat: es caracteritza perquè ja està diluït en BTS i no en Duragen, de manera que no és necessària la centrifugació.

Amb aquest tipus de mostra no es realitza un pool, ja que només es compra l'ejaculat d'un únic mascle.

Llavors, es preparen els següents tractaments amb 5 mL de semen diluït en BTS (en alguns casos amb kanamicina i en altres sense kanamicina):

- **Tractament 1**: sense kanamicina (K-) i amb [4 µg/mL I₂-COSAN].
- **Tractament 2**: sense kanamicina (K-) i amb [8 µg/mL I₂-COSAN].
- **Tractament 3**: sense kanamicina (K-) i sense I₂-COSAN.
- **Tractament 4**: amb kanamicina (50 µg/mL) (K+) i sense I₂-COSAN.

En els tractaments en què s'hagi d'afegir I₂-COSAN [1 µg/mL], el volum a addicionar s'ha calculat a partir de la fórmula: $C_o \times V_o = C_f \times V_f$. Així que, si el volum final és 5 mL i es vol el I₂-COSAN a [4 µg/mL], el volum a afegir serà de 20 µL, mentre que si la concentració final és de [8 µg/mL], el volum serà 40 µL.

Els tractaments s'analitzen sense infectar (tractaments C1 a C4) i infectant amb *Escherichia coli* BLEE soca 192348 (tractaments E1 a E4) i amb *Staphylococcus aureus* MRSA soca 182851 (tractaments S1 a S4), dos bacteris que es troben

comunament en el semen i que a més, són multiresistents. Les MIC per cada una són, respectivament: 32 i 4 µg/mL [26].

A banda d'aquests tractaments, també es fa una preparació sense tractar (com en el cas del tractament 3) però que no se centrifuga, ja que es vol comprovar l'efecte de la centrifugació en la preparació de les mostres.

3.3. RESUSPENSÍO DE BACTERIS I INFECCIÓ

A partir d'una placa amb cultiu pur dels bacteris amb els quals s'ha d'infectar es fa una resuspensió d'algunes colònies amb una nansa de Kóle en 2 mL de BTS K-. Llavors, es mira l'absorbància a través d'un espectrofotòmetre i es calcula el volum de bacteris necessari per infectar els tractaments a una concentració aproximada de 10^6 ufc/mL, seguint el protocol d'Althouse et. al (2008), a partir de la fórmula $C_o \times V_o = C_f \times V_f$, i basant-se en la premissa que: 0.2 D.O. $\sim 10^8$ ufc/mL.

Aquests tractaments (infectats o sense infectar), es mantenen en la nevera a 16-17°C durant tot l'experiment, amb la finalitat de mantenir la viabilitat espermàtica, la qual es pot preservar de dies a setmanes a aquesta temperatura [17] i per tal d'evitar el creixement de bacteris contaminants.

3.4. ANÀLISI DE LA QUALITAT ESPERMÀTICA

Tots els tractaments amb els quals s'ha treballat se sotmeten a una anàlisi de la qualitat espermàtica. Els paràmetres que s'analitzen són la morfologia, la motilitat i la viabilitat, tot i que la morfologia només es mesura el primer dia, ja que és un paràmetre que no sol variar gaire i la majoria de canvis són a nivell ultraestructural, de manera que s'hauria de mirar en un microscopi electrònic, del qual no disposem. La resta de paràmetres es mesuren a $t = 0, 24, 48$ i, si cal, a $t = 72$ h.

Anàlisi dels paràmetres:

- MORFOLOGIA: s'utilitza el programa d'ordinador SCA2002 (Micròptic, Barcelona, Catalunya). Es basa en col·locar 10 µL de mostra en un portaobjectes i cobrir amb un cobreobjectes. Es recompten 100 espermatozoides (3 rèpliques) amb un microscopi òptic (MO) de contrast de fases a 200x. Llavors, es classifiquen els espermatozoides segons:

- **Espermatozoides normals.**
- **Anomalies en el cap.**
- **Anomalies en la cua.**
- **Presència de gota citoplasmàtica.**
- **MOTILITAT:** es fa servir el programa d'ordinador SCA2002 (Micròptic, Barcelona, Catalunya). S'agafa el semen (conservat a 16-17°C) i es posa en una estufa a 37°C durant 20 minuts per tal d'activar la motilitat. S'agafen 20 µL de mostra i es posen en una cambra de Makler, la qual es diposita en una placa calefactada a 37°C i s'observa al MO de contrast de fases a 100x. Es duen a terme dos recomptes de 1000 espermatozoides (canviant la gota per evitar repetir camps). Llavors, es classifiquen segons:
 - **Motilitat total.**
 - **Motilitat progressiva:** ràpid progressiu, mitjà progressiu i no progressiu.
 - **Immòbils.**

També es mesura la concentració i si hi ha aglutinació.

- **VIABILITAT:** s'utilitza la tècnica clàssica eosina-nigrosina [34]. Consisteix en posar 10 µL de mostra en un portaobjectes, afegir 10 µL d'eosina i barrejar amb la punta de la micropipeta. Afegir 5 µL de nigrosina (que actua com a contrast) i barrejar. Amb ajuda d'un altre portaobjectes, realitzar una extensió, deixar assecat i mirar en un MO de camp clar a 400x. Llavors, es classifiquen segons:
 - **Viable:** color blanc perquè la membrana està intacta i l'eosina no ha penetrat.
 - **No viable:** color violeta perquè la membrana està alterada i l'eosina ha penetrat.

3.5. EFFECTE ANTIMICROBIÀ DEL I₂-COSAN EN MOSTRES SEMINALS

Un cop es tenen tots els tractaments infectats (E1...E4 per *E. coli* i S1...S4 per *S. aureus*), es realitza un banc de dilucions 1/10 amb Ringer fins a arribar a una concentració de 10⁻⁷ i es plaquegen 100 µL de cada dilució i de la mostra directa (10⁰) en medi BHA. En un dels assajos, la dilució es fa en PBS - *Phosphate Buffer Solution*, però això no suposa cap canvi en els resultats. Es fa una sembra homogènia i per duplicat de cada mostra. També es fa una sembra dels controls (C1...C4), que no es

dilueixen perquè no s'hi espera presència de bacteris. Les plaques es guarden a l'incubador a 37°C durant 24h.

Després de 24h, es duu a terme una nova sembra dels tractaments, els quals s'hauran diluït fins a una dilució més de la que s'hagi obtingut creixement en les plaques sembrades a t = 0h. El mateix per a t = 48 i 72h.

A partir del nombre de colònies de cada placa, es fa el càlcul d'ufc/mL per cada tractament a cada temps diferent, seguint la fórmula de:

$$\frac{\text{ufc}}{\text{mL}} = \frac{\sum \text{colònies}}{V_s(n_1 + 0.1 * n_2)d}$$

V_s = volum de sembra.

n_1 = nº de plaques recomptades de la dilució més concentrada, que es trobin dins del rang de 15-300 colònies.

n_2 = nº de plaques recomptades de la segona dilució més concentrada, que es trobin dins del rang de 15-300 colònies.

d = dilució més concentrada en la que s'ha obtingut recompte. Correspon a n_1 .

S'acaba tenint un recompte de bacteris i unes dades de qualitat espermàtica a t = 0, 24, 48 i, en alguns casos, a 72 h.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Tot i analitzar els paràmetres de morfologia espermàtica i pH, no es parla d'ells en els resultats, ja que no s'han observat variacions significatives en ells. Això ens informa que aquests dos paràmetres no es veuen afectats ni per la presència de I₂-COSAN ni pels bacteris.

4.1. EFECTE DE LA CENTRIFUGACIÓ DE LES DOSIS SEMINALS EN LA QUALITAT ESPERMÀTICA

Es vol estudiar l'efecte de la centrifugació en la qualitat espermàtica per tal de veure si causa canvis en els diferents paràmetres, fet que es vol evitar, ja que només interessa veure els efectes de l'addició del I₂-COSAN i/o la infecció en la qualitat espermàtica del semen porcí.

Es compara la viabilitat, morfologia i motilitat dels espermatozoides entre un pool de tres dosis seminals, les quals han estat centrifugades per treure el medi que conté antibiòtics (pas necessari si es vol treballar amb dosis seminals), i una mostra d'ejaculat (no centrifugada).

Per a aquesta anàlisi, s'utilitzen mostres sense infectar, però afegint I₂-COSAN, de manera que s'han preparat els 5 tractaments diferents esmentats en l'apartat 3.2. per a les dosis, i només els 4 primers per a l'ejaculat. Així que la preparació 5 per a les dosis seria una mostra sense tractar, a la qual no se li afegeix I₂-COSAN ni kanamicina i que tampoc se centrifuga.

Tal com es veu en la *Figura 4*, hi ha un clar efecte de la centrifugació en la motilitat espermàtica degut al fet que, en el pool centrifugat, hi ha un menor % de motilitat comparat amb el pool sense centrifugar i amb l'ejaculat. És important comentar que durant els experiments, s'ha estat utilitzant una centrífuga vella i brusca, que accelera i frena molt ràpidament, la qual cosa pot explicar el gran impacte en la motilitat espermàtica [35].

En canvi, pel que fa a la viabilitat espermàtica, no es considera que la centrifugació afecti aquest paràmetre, tot i que sí que es veu que en el cas del pool centrifugat, la viabilitat és menor que en els altres dos casos.

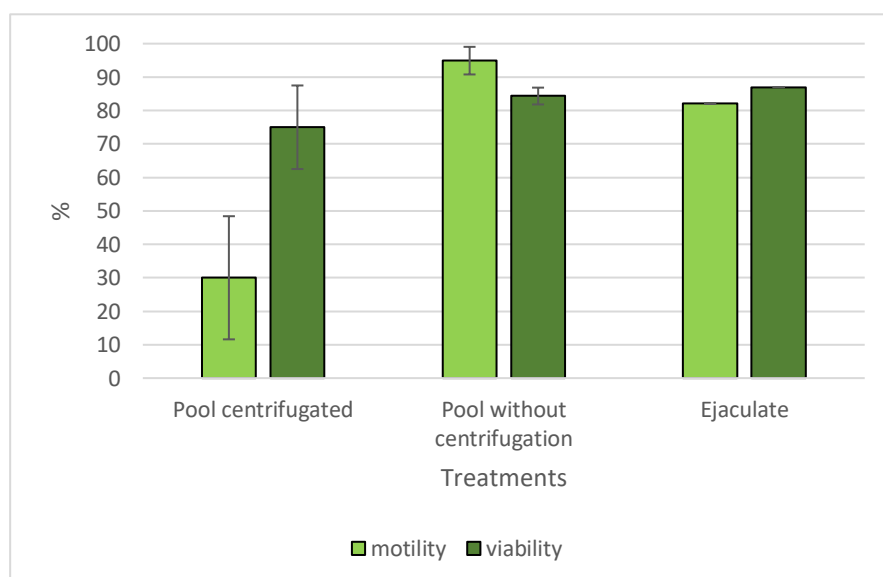


Figura 4: % de motilitat i de viabilitat observat en el pool centrifugat (n=3), el pool sense centrifugar (n=3) i l'ejaculat (n=1). El primer i el segon s'han obtingut fent la mitjana de les dosis dels tres mascles per separat. Tant en el pool centrifugat com en l'ejaculat, s'han agafat els tractaments n°3, ja que no porten ni kanamicina ni I₂-COSAN, fent-los així comparables amb els tractaments n°5 escollits en el pool sense centrifugar. En tots els casos s'han agafat les mostres sense infectar.

Cal destacar que en cap dels assajos realitzats en aquest TFG, s'ha utilitzat una mostra prou gran per a poder fer anàlisis estadístiques que ens permetin comprovar la significança de les dades. Com a molt, s'ha treballat amb dues mesures de motilitat o de viabilitat, però al ser pseudorèpliques i al tenir només dos valors, a l'hora de fer una ANOVA, no es compleix el supòsit d'homoscedasticitat ni de normalitat. Amb un mínim de tres rèpliques, ja seria suficient per a realitzar anàlisis estadístiques, tot i que quan més mostres es tinguessin, millor. Per tenir les tres rèpliques, es podrien utilitzar les tres dosis dels tres mascles per separat, però llavors hi hauria el problema de l'efecte mascle, el qual suposaria una gran variabilitat en les dades. Si es volgués treballar amb mascles per separat, s'haurien d'aconseguir més quantitat de dosis.

De fet, ja s'havia confirmat que la centrifugació té un efecte en els espermatozoides porcins, però encara no hi ha una explicació acceptada sobre com es produeix el dany espermàtic, tot i que hi ha algunes hipòtesis: pot ser a causa d'un efecte mecànic directe a les membranes dels espermatozoides, o a un efecte indirecte causat per la formació dels ROS (Radicals Reactius d'Oxigen), associats a danys a la membrana a través de la peroxidació de lípids [35]. S'ha vist que quan es centrifuga, s'eliminen els antioxidants del plasma seminal, causant així l'augment de la producció de ROS i l'estrès oxidatiu [36]. Tot això pot acabar conduint a la pèrdua de la viabilitat, motilitat i reducció de la fertilitat dels espermatozoides [35].

4.2. EFFECTE DEL I₂-COSAN EN LA QUALITAT ESPERMÀTICA

En aquest apartat del treball, es vol veure com afecta el I₂-COSAN als diferents paràmetres de qualitat espermàtica: motilitat, viabilitat i morfologia. Per veure això, no s'ha realitzat infecció, ja que la presència dels bacteris per si sols ja implica un efecte en la qualitat espermàtica dels espermatozoides porcins.

Un cop mesurats els paràmetres, es pot veure en la *Figura 5* com hi ha un clar efecte del I₂-COSAN sobre la motilitat, degut al fet que hi ha una reducció del percentatge de motilitat en els tractaments que contenen 4 i 8 µg/mL del compost a t = 24h (reducció del 92,40% a 4 µg/mL i del 94,09% a 8 µg/mL), que es manté a t = 48 i 72h. No es veu una clara diferència entre els tractaments a 4 i a 8 µg/mL del metal-lacarborà.

D'altra banda, en els que no contenen I₂-COSAN ni kanamicina (0 µg/mL), la motilitat espermàtica es manté en el temps, tot i que a partir de t = 72h, comença a disminuir (reducció del 26,22% a t = 72h). Això podria ser causat per la dilució en BTS, la qual ja s'ha vist anteriorment que causa una disminució significativa de la motilitat a partir de les 48 h [37].

Per acabar, pel que fa als tractaments amb kanamicina (0 µg/mL + K), es veu una reducció a t = 72h (reducció del 36,16%), per la qual cosa es podria dir que aquest antibiòtic afecta la motilitat espermàtica a partir de les 72h.

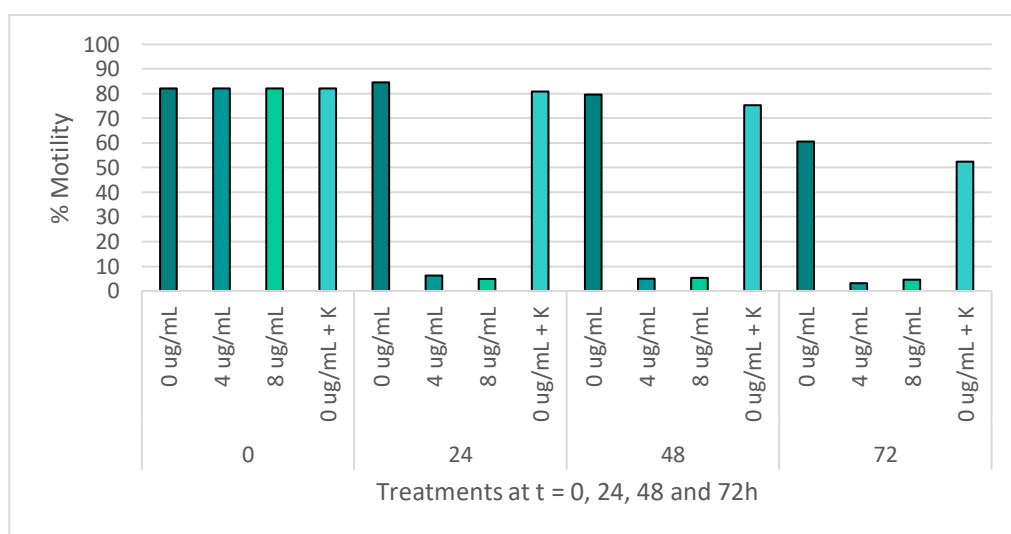


Figura 5: % de motilitat dels tractaments amb diferent concentració de I₂-COSAN a t = 0, 24, 48 i 72h. Valors obtinguts de l'experiment amb l'ejaculat. La K indica la presència de kanamicina.

En relació amb la viabilitat espermàtica (Figura 6), aquesta es manté prou bé al llarg del temps, indicant així que el I₂-COSAN no té efectes sobre aquest paràmetre.

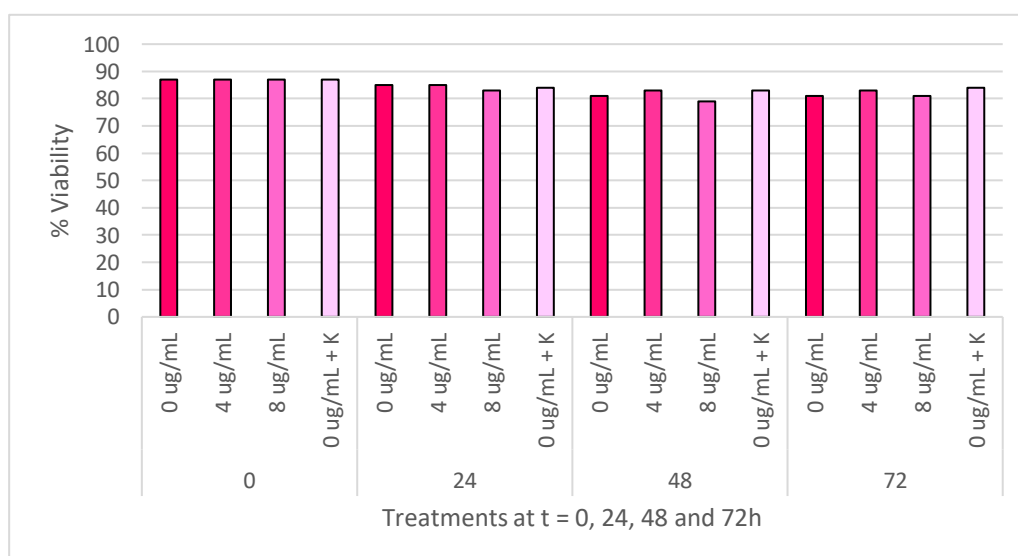


Figura 6: % de viabilitat per als diferents tractaments amb diferent concentració de I₂-COSAN a t = 0, 24, 48 i 72h. Valors aconseguits de l'experiment amb l'ejaculat. La K indica la presència de kanamicina.

4.3. EFFECTE DEL I₂-COSAN EN LA QUALITAT ESPERMÀTICA DE MOSTRES INFECTADES

Un dels principals objectius d'aquest treball ha estat conèixer si el I₂-COSAN té algun efecte negatiu en la qualitat espermàtica en mostres naturals de semen de porc. En l'apartat anterior, fet amb mostres no infectades, s'observa que hi ha un impacte a nivell de motilitat, però no de viabilitat. Les mostres seminals, però, poden estar contaminades o no, i podria ser que la presència de microorganismes per si sol, ja tingués un efecte en la qualitat dels espermatozoides. Per aquest motiu, s'ha estudiat l'efecte de la presència del compost també en mostres infectades amb *Staphylococcus aureus* MRSA soca 182851 i *Escherichia coli* BLEE soca 192348.

Malgrat que es van fer diversos experiments per determinar l'efecte del compost en el semen porcí infectat (*Taula 1*), només es mostren els resultats obtinguts a partir mostres procedents de l'ejaculat, per tal d'evitar l'efecte de la centrifugació, paràmetre que s'ha vist anteriorment que afecta la motilitat espermàtica.

Es torna a veure (*Figura 7*) una gran reducció de la motilitat en aquells tractaments que contenen I₂-COSAN a 4 i 8 µg/mL i que han estat infectats amb *E. coli* BLEE (192348) (reducció del 77,41% a 4 µg/mL i del 83,17% a 8 µg/mL) i *S. aureus* MRSA (182851) (87,96% i 89,03%). Cal destacar que el percentatge de reducció és major en mostres no infectades que en infectades (entre el 1,99% i el 14,99% de diferència), la qual cosa es relaciona amb errors metodològics, de manera que la diferència no és significativa. El fet que aquesta reducció no es vegi únicament en els tractaments infectats, sinó també en els controls sense infectar (*Figura 5*), fa pensar que el compost afecta amb molta evidència la motilitat espermàtica i que la reducció d'aquest paràmetre no és deguda només a la presència de bacteris.

Anteriorment, ja s'ha vist com *S. aureus* juga un paper central en la motilitat espermàtica, causant una reducció d'aquesta gràcies a l'alliberació de factors espermicides solubles com el *sperm immobilization factor* [38]. Així que una de les causes dels efectes en aquest paràmetre en els tractaments inoculats amb *S. aureus*, podria ser l'alliberació d'aquest factor d'immobilització, tot i que això encara està per confirmar.

D'altra banda, els tractaments que no contenen I₂-COSAN mostren també una tendència a la reducció de la motilitat que pot ser causada, com ja s'ha contemplat en altres estudis, per la dilució en BTS [37]. En el cas dels tractaments sense I₂-COSAN ni kanamicina (0 µg/mL), la motilitat es manté a t = 24h i comença a disminuir a partir de les 48h (reducció del 8,88% per *E. coli* i del 1,02% per *S. aureus*), mentre que en els tractaments a 0 µg/mL amb kanamicina, la reducció ja es veu a t = 24h (6,73% per *E. coli* i 3,53% per *S. aureus*).

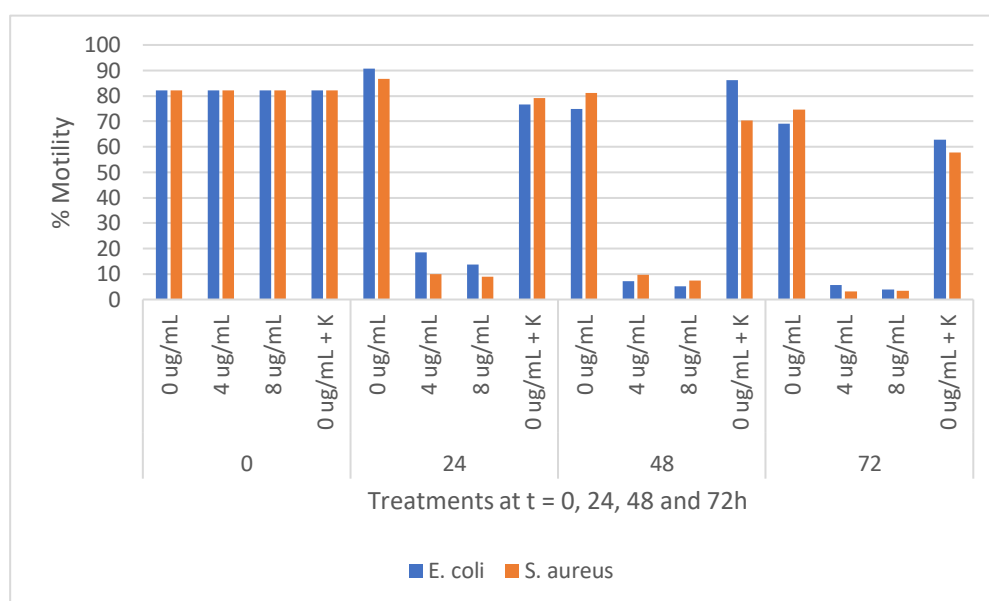


Figura 7: % de motilitat per als tractaments amb diferent concentració de I₂-COSAN a t = 0, 24, 48 i 72 h i infectats amb *E. coli* (color blau) i *S. aureus* (color taronja). Valors obtinguts de l'experiment amb l'ejaculat. La K indica la presència de kanamicina.

En relació amb la viabilitat espermàtica, hi ha una reducció d'aquesta en presència conjunta de I₂-COSAN i bacteris (*Figura 8*) (reducció del 14,94% i 36,78% a 4 i 8 µg/mL amb *E. coli* i del 29,89% i 34,48% amb *S. aureus*), però no es veu una gran disminució en el cas que hi hagi únicament el compost (*Figura 6*) (reducció del 2,30% i 4,60% a 4 i 8 µg/mL). Això es relaciona amb que els bacteris solen causar una reducció de la viabilitat dels espermatozoides, depenent de la concentració i del temps [39], així que no es considera que el compost afecti la viabilitat espermàtica. També s'ha pensat que hi podria haver un efecte sinèrgic del metal·lacarborà amb *E. coli* BLEE (192348) i *S. aureus* MRSA (182851), però això encara està per confirmar.

També s'observa que la viabilitat baixa en un principi, però després s'estabilitza, la qual cosa pot ser deguda al fet que els espermatozoides necessiten un temps per adaptar-se al canvi de diluent [17].

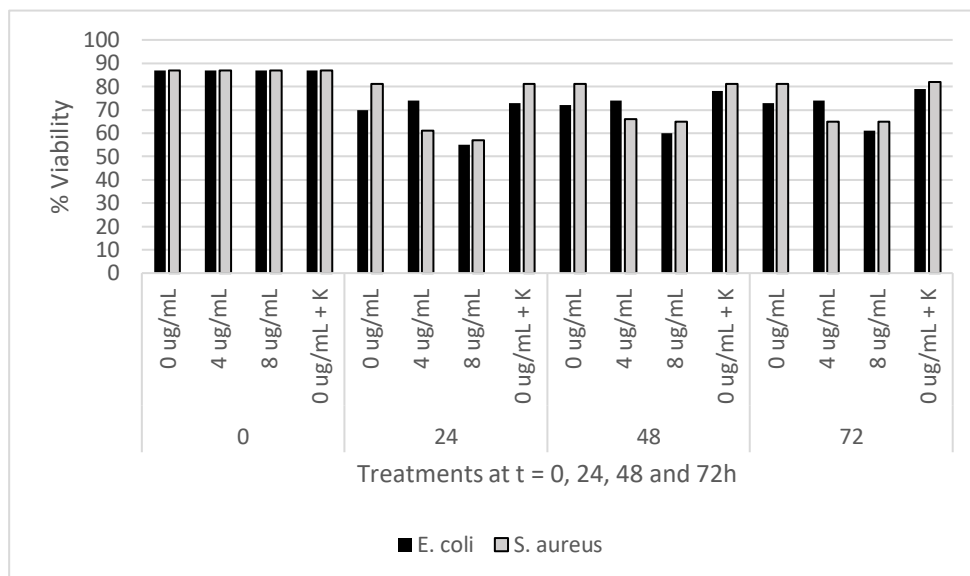


Figura 8: % de viabilitat per als tractaments amb diferent concentració de I₂-COSAN a t = 0, 24, 48 i 72 h i infectats amb *E. coli* (color negre) i *S. aureus* (color gris). Valors obtinguts de l'experiment amb l'ejaculat. La K indica la presència de kanamicina.

Per acabar, destacar que segons l'estudi de Bennour et al. (2022), el compost presenta una MIC de 0,006 μ M (4 μ g/mL) per *S. aureus* MRSA (182851) i de 0,050 μ M (32 μ g/mL) per *E. coli* BLEE (192348), a més d'un índex de selectivitat (IC₅₀/MIC) de 1880, indicant que aquest compost no mostra un efecte citotòxic contra les cèl·lules eucariotes. Amb els resultats obtinguts, es confirma que no té efecte citotòxic contra els espermatozoides porcins, la qual cosa ja s'ha vist prèviament en les cèl·lules T98G (IC₅₀ = 102 μ M/MIC) i V79 (IC₅₀ = 102 μ M/MIC).

4.4. EFECTE ANTIMICROBIÀ DEL I₂-COSAN EN MOSTRES SEMINALS

En un primer assaig per determinar l'efecte antimicrobià del I₂-COSAN, es va treballar amb un pool de tres dosis seminals. Es va veure una gran reducció de la motilitat i molt poc creixement bacterià respecte al que s'esperava. Això es va relacionar amb el fet que un dels mascles va venir contaminat de la granja per bacteris semblants a *Proteus*, ja que *Proteus mirabilis* és un dels microorganismes més comuns que es troben contaminant el semen de porc, causant una reducció en la seva motilitat, tot i que aquesta no és tant significativa com la que causa *S. aureus* o *E. coli* [39]. La contaminació bacteriana en mostres de semen facilita l'aglutinació d'espermatozoides, baixa la motilitat i promou canvis en el pH seminal. Alguns dels microorganismes patògens més comuns en la contaminació del semen porcí, a més de *Proteus mirabilis* [39], són *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* [40].

En un segon assaig realitzat, també a partir d'un pool de tres dosis seminals, s'ha obtingut una elevada contaminació per uns bacteris semblants a *Micrococcus luteus*, sobretot en les plaques de *S. aureus*. Probablement, aquesta contaminació és deguda a un error de manipulació de les mostres o a la contaminació d'alguns dels diluents i/o material emprat en l'assaig. Aquest tipus de bacteri es pot trobar, tot i que rarament, en el semen porcí [17]. Al ser els dos bacteris grampositius, han respost de la mateixa manera al compost i tots van ser comptats com a *S. aureus*, així que els resultats assolits no es poden tenir en compte.

Es mostren els resultats dels últims tres assajos, realitzats a partir d'un pool de tres dosis seminals, en els quals es va infectar un cop amb *S. aureus* MRSA (182851) i tres cops amb *E. coli* BLEE (192348).

Pel que fa als resultats de les mostres infectades amb *S. aureus* MRSA (182851) (*Figura 9*), es va veure que tots els tractaments presenten una reducció del nombre de ufc/mL en el temps. La disminució en el cas del I₂-COSAN a 8 µg/mL és superior que a 4 µg/mL a t = 24h (reducció del 99,70% a 4 µg/mL i del 99,94% a 8 µg/mL), però la diferència no és significativa. També es veu que els tractaments sense I₂-COSAN mostren un % de reducció semblant als que contenen el compost (reducció del 98,41% a 0 µg/mL i del 99,70% a 0 µg/mL + K), quan la preparació sense kanamicina ni sense I₂-COSAN hauria de mantenir-se en el temps, a causa del fet que l'absència d'antibiòtics hauria de permetre el manteniment de *S. aureus*. La reducció en aquest tractament (0 µg/mL) podria ser deguda a la presència de restes d'antibiòtics en el medi. Caldria repetir l'experiment amb un ejaculat, ja que aquest no es compra amb el diluent amb antibiòtics de la granja.

La reducció de la viabilitat de *S. aureus* MRSA (182851), tant en les mostres tractades com en les no tractades, indica que el I₂-COSAN no té efecte en aquest bacteri, sinó que aquests no resisteixen en les mostres seminals de porc. Tot i això, només es té una rèplica d'aquests resultats, de manera que caldria repetir-ho almenys dues vegades més per confirmar-los.

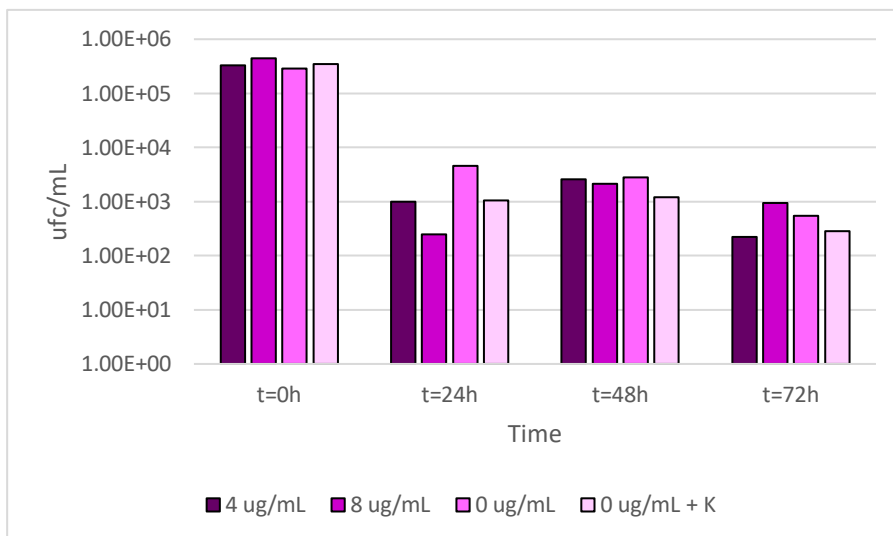


Figura 9: càlcul d'ufc/mL per *Staphylococcus aureus* MRSA (182851) a t = 0, 24, 48 i 72 h, a partir del recompte de colònies sembrades en medi BHA. En diferents colors es representen els tractaments de I₂-COSAN. Les ufc/mL estan representades en escala logarítmica.

Pel que fa als resultats de les mostres infectades amb *E. coli* BLEE (192348) (Figura 10), s'ha observat pels tres assajos realitzats que el bacteri mor a les 24h. No se sap el motiu pel qual això succeeix, però s'ha comprovat que no és degut a un error metodològic i que tampoc és causat per la mala retirada del diluent amb l'antibiòtic de la granja, el qual podria interferir en la viabilitat del bacteri. Això fa pensar que realment hi ha alguna cosa en les mostres seminals de semen porcí que mata els bacteris, essent *E. coli* BLEE (192348) més sensible que *S. aureus* MRSA (182851). Tal vegada, es podria utilitzar un altre bacteri gramnegatiu o una altra soca de *E. coli* per tal de veure si aquest nou bacteri també es mor en aquestes condicions.

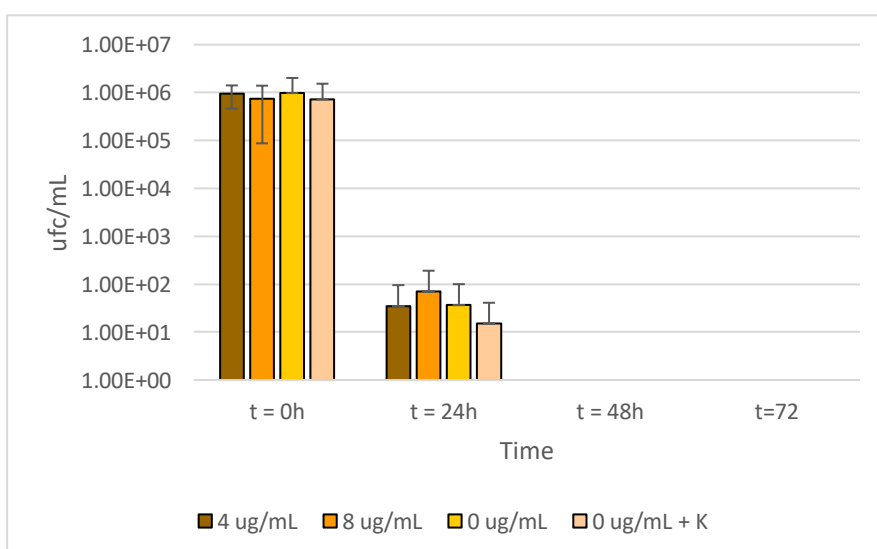


Figura 10: càlcul d'ufc/mL per *Escherichia coli* BLEE (192348) a t = 0, 24, 48 i 72h, a partir del recompte de colònies sembrades en medi BHA. En diferents colors, es representen els tractaments de I₂-COSAN. Les ufc/mL estan representades en escala logarítmica.

5. CONCLUSIONS

The protocol has been optimized, making a fine-tuning of it: the centrifuge used until now can no longer be employed, from the moment that it has been seen it damages the spermatozoa, decreasing their motility. However, it has been seen that centrifugation do not affect sperm viability. Because ejaculates are very expensive samples, centrifugation cannot be ruled out, but perhaps the use of a centrifuge that accelerates and slows down more slowly and is refrigerated could be considered.

After analysing the different parameters of sperm quality, it is concluded that motility is greatly affected by the presence of I₂-COSAN in all the assays performed, suggesting that this compound would not be a promising antibiotic, as we are looking for a compound that affects the contaminating bacteria, but not the spermatozoa. On the other hand, viability and morphology are not altered by the presence of the metallocarborane.

Moreover, a decrease in sperm motility in the samples infected with *S. aureus* MRSA (182851) and *E. coli* BLEE (192348) has been seen, and the percentage of non-viable spermatozoa is higher in those infected samples than in non-infected samples, due to bacteria also affect this parameter.

Preparations that are not centrifugated and do not contain I₂-COSAN also shows a reduction in sperm motility after 48h. Some studies defend that this is due to dilution in BTS.

Kanamycin is a known antibiotic used for the preservation of seminal samples and, in this study, its antimicrobial effect and its innocuity, regarding the different parameters of sperm quality, have been confirmed. Despite this, it has been seen that kanamycin influences sperm motility from 72h.

As regards the analysis of the antimicrobial effect of I₂-COSAN, a reduction in the number of colonies was observed in the treatments infected with *S. aureus*. No differences in the percentage of reduction are shown between the different treatments, which indicates that the compound would not influence the viability of the bacteria, but that the bacteria die in the porcine semen samples.

Regarding *E. coli*, this bacterium died 24h after infections in the three tests performed, and the reason for this is not known. Thus, there is something in the seminal doses that kills the bacteria, with *E. coli* BLEE being less resistant to it than *S. aureus* MRSA.

Therefore, it can be concluded that I₂-COSAN has a negative effect on sperm motility that makes it not a promising compound for boar sperm preservation. So, it would be necessary to test other gramnegative bacteria and continue investigating other promising compounds that could show antimicrobial activity and that do not have a negative effect on spermatozoa. Other types of metallocarboranes, such as other COSAN derivatives, might be tested to see if they could be used as future antimicrobials. In addition, it is necessary to study whether there is anything in the boar seminal samples that has an effect on the viability of the bacteria.

6. REFLEXIÓ ÈTICA

L'experimentació animal és una activitat necessària per a aconseguir grans avanços que haurien estat impossibles a partir d'altres mitjans. Avui en dia, no només s'utilitzen en l'àmbit de la medicina, sinó també en psicologia, indústria militar, cosmètica, educació i formació d'investigadors [41].

El porc és un animal molt utilitzat en la investigació, per la seva similitud fisiològica i anatòmica amb els humans. A més, és un animal domesticable, de creixement ràpid i de reproducció nombrosa, però és molt sensible a situacions d'estrès, així que el seu tractament s'ha de realitzar de manera curiosa per tal d'evitar la seva mort [42]. Per aquest motiu, la utilització de porcs, entre altres animals, per obtenir mostres biològiques i per a dur a terme pràctiques investigadores és una realitat en el món en què vivim actualment.

L'obtenció de mostres seminals és una pràctica duta a terme diàriament, per tal de llavors ser emprades en tècniques de reproducció assistida i per a realitzar diferents tipus d'estudis [18]. El semen extret de porcs de granja segueix una sèrie de normatives per la recollida, emmagatzematge, distribució i comercialització que es troben recollides en el Reial Decret 841/2011, de 17 de juny. També s'ha de considerar la Llei 8/2003 de sanitat animal i la Llei 32/2007 per a la cura dels animals en la seva explotació, transport, experimentació i sacrifici.

El tema de la utilització d'animals per a la investigació ha fet que sorgeixin dos grups en la societat: els defensors de la pràctica i els que estan en contra. Els defensors al·leguen que pràcticament tots els protocols actuals per a la prevenció, curació i control de les malalties, dels antibiòtics, les transfusions de sang, les vacunes, etc., es basen en coneixements obtinguts mitjançant investigació en animals de laboratori, de manera que és necessària aquesta utilització. A més, també defensen que el nombre d'animals utilitzat en investigació científica és relativament baix [43].

D'altra banda, s'hi troben benestaristes (que defensen continuar usant animals sempre que se'ls garanteixi una certa qualitat de vida) i els abolicionistes (que pretenen rebutjar els estatus de propietat de l'animal i, per tant, totes les pràctiques en les quals intervinguin aquests). De fet, han sorgit certes organitzacions en la societat que defensen el dret legítim dels animals a la vida, busquen mètodes alternatius i/o fan campanyes i accions de protesta, intentant posicionar la societat a favor seu [41].

Amb tot això, en el laboratori no s'ha treballat amb cap animal, únicament destacar la compra de mostres seminals a l'empresa Batallé S.L., la qual es responsabilitza de complir amb totes les normes esmentades anteriorment.

En l'àmbit de sostenibilitat, tots els residus generats en utilitzar bacteris van ser llançats a un contenidor de residus biològics, i es va minimitzar l'ús de material per tal de reduir la quantitat de residus. De totes maneres, la Universitat de Girona presenta un pla d'ambientalització del 2021 en el que s'observa com la jerarquia d'aquesta institució tendeix a la prevenció (evitar-ne la generació), seguida de la reutilització i la preparació per a la reutilització, el reciclatge i, finalment, la valorització. La recollida, transport i tractament dels residus és duta a terme per gestors autoritzats.

Finalment, els articles consultats han estat citats segons l'estil APA a través del programa Mendeley i s'ha evitat el plagi, un delictes relatiu a la propietat intel·lectual recollit en l'article 270 del codi penal (Ley Orgánica 10/1995, de 23 de Noviembre, Código Penal).

7. REFLEXIÓ PERSPECTIVA DE GÈNERE

L'escassa presència de les dones en la ciència i la investigació es diu que és deguda a la manca d'interès d'aquestes per aquesta matèria, però això no és així. Un problema

d'equitat i justícia social fa que les dones accedeixin en menor mesura a llocs de treball creatius i vocacionals, concentrant-se en llocs de treball amb poca remuneració [44].

De fet, les dones sempre han viscut a l'ombra dels homes, i clars exemples d'això poden ser la Isabella Helen Lugski, qui va desenvolupar tècniques per determinar l'estructura tridimensional de les molècules per cristal·lografia de rajos X, però el Premi Nobel de Química el van donar al seu home Jerome Karle, o la coneguda Rosalind Franklin, que va descobrir l'estructura de la doble hèlix del DNA i va haver de sofrir comentaris discriminatoris per part dels seus col·laboradors. Destaquen comentaris com: "Estava decidida a no mostrar els seus atributs femenins", "Hauria pogut resultar més guapa si hagués mostrat interès per vestir-se bé", etc. Els van concedir el premi Nobel quan ella ja era morta, i no s'atorga a títol pòstum [45]. Tristament, aquests comentaris continuen existint en la nostra societat i continuen estant presents en l'entorn de treball.

La diferència entre homes i dones en l'àmbit científic pot descriure's amb dades: l'any 2010 en la Unió Europea, per cada 100 homes amb títol universitari, hi havia 151 dones, i en Espanya 137. Tot i això, no s'ha traduït en una presència equitativa, ja que només el 32% d'elles treballaven com a científiques i enginyeres (per aquell mateix any) [44].

En els últims 15 anys, hi ha hagut una evolució en les polítiques d'igualtat en I+D+I a Espanya, influenciada per l'aparició de la Llei Orgànica 3/2007, del 22 de març, per la igualtat efectiva de dones i homes, i també per les directives, iniciatives i recomanacions en el marc de la Unió Europea. Això ha portat a un augment en la presència d'investigadores (41%), en la presència de dones en els treballs de presa de decisions i en la presència de dones segons avança la carrera investigadora [46].

Avui en dia, les dones, tot i fer una carrera en ciències, no progressen al mateix ritme que els seus companys, no participen de manera plena i igualitària en la presa de decisions en el sistema de la ciència, continuen tenint menors taxes d'èxit i reben proporcionalment menys finançament que els homes [46]. D'aquesta manera, cal destacar que la bretxa de gènere encara està present i és significativa.

El meu TFG sobre els efectes del pèptid antimicrobià I₂-COSAN sobre els espermatozoides porcins l'he realitzat en el grup de recerca de la Microbiologia de la Malaltia Intestinal. Aquest grup és una clara mostra de lluita per la igualtat, ja que la seva majoria està formada per dones. El seu treball, esforç i talent ha portat a la publicació d'una gran quantitat d'articles científics, *reviews* i capítols de llibres, entre altres coses, on la majoria d'ells han tingut una autoria majoritàriament femenina. Un exemple d'aquests seria "Una estratègia innovadora per estudiar la capacitat invasiva d'*Escherichia coli* adherent-invasiva mitjançant la utilització de monocapes epitelials derivades d'organoide primari humà", que té un factor d'impacte de 7561 (2020).

L'experiència viscuda durant el TFG en aquest grup de recerca m'ha animat a seguir la meua carrera i a pensar que puc tenir, com a dona, un futur en ella. Tot i això, cal continuar lluitant per la igualtat entre homes i dones, no només en el món de la ciència, sinó en la vida sencera.

8. BIBLIOGRAFIA

- [1] Alós, J. I. (2015). Antibiotic resistance: A global crisis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, 33(10), 692-699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- [2] Mohr, K. I. (2016). *History on antibiotics research*. 499. <https://doi.org/10.1007/82>
- [3] Waksman, S. A. (1947). What is an antibiotic or an antibiotic substance? *Mycologia*, 39(5), 565-569. <https://doi.org/10.2307/3755196>
- [4] Lietman, P. (1986). What is an antibiotic? O N-Acetyl Cel Wall I Vancomyein. *The Journal of Pediatrics*, 108(5), 824-829. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(86\)80752-1](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(86)80752-1)
- [5] Singh, S. B., Young, K., & Silver, L. L. (2017). What is an "ideal" antibiotic? Discovery challenges and path forward. *Biochemical Pharmacology*, 133 (January), 63-73. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.01.003>
- [6] Fink, K., & Uchman, M. (2021). Boron cluster compounds as new chemical leads for antimicrobial therapy. *Coordination Chemistry Reviews*, 431, 213684. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213684>
- [7] Machowska, A., & Lundborg, C. S. (2019). Drivers of irrational use of antibiotics in Europe. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(1). <https://doi.org/10.3390/ijerph16010027>
- [8] Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42-51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- [9] Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2). [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(08\)60495-9](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(08)60495-9)
- [10] Martinez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug*

Discovery Today: Technologies, 11(1), 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>

[11] Woodford, N., Turton, J. F., & Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 736-755. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>

[12] De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3), 1-49. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>

[13] Bussalleu, E., Yeste, M., Sepúlveda, L., Torner, E., Pinart, E., & Bonet, S. (2011). Effects of different concentrations of enterotoxigenic and verotoxigenic *E. coli* on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*, 127(3-4), 176-182. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2011.07.018>

[14] Schulze, M., Dathe, M., Waberski, D., & Müller, K. (2016). Liquid storage of boar semen: Current and future perspectives on the use of cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*, 85(1), 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.016>

[15] Schulze, M., Grobbel, M., Müller, K., Junkes, C., Dathe, M., Rüdiger, K., & Jung, M. (2015). Challenges and Limits Using Antimicrobial Peptides in Boar Semen Preservation. *Reproduction in domestic animals*, 50, 5-10. <https://doi.org/10.1111/rda.12553>

[16] Speck, S., Courtiol, A., Junkes, C., Dathe, M., Müller, K., & Schulze, M. (2014). Cationic synthetic peptides: Assessment of their antimicrobial potency in liquid preserved boar semen. *PLoS ONE*, 9(8), 1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105949>

[17] Althouse, G. C., Pierdon, M. S., & Lu, K. G. (2008). Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen. *Theriogenology*, 70(8), 1317-1323. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.010>

[18] Schulze, Martin, Junkes, C., Mueller, P., Speck, S., Ruediger, K., Dathe, M., & Mueller, K. (2014). Effects of cationic antimicrobial peptides on liquid-preserved boar spermatozoa. *PLoS ONE*, 9(6), 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100490>

[19] Hensel, B., Jakop, U., Scheinpflug, K., Mühlendorfer, K., Schröter, F., Schäfer, J., Greber, K., Jung, M., & Schulze, M. (2020). Low temperature preservation of porcine semen: influence of short antimicrobial lipopeptides on sperm quality and bacterial load. *Scientific Reports*, 10(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70180-1>

[20] Grimes, R. N. (2016). *Carboranes* (Third Edition). Academic Press. Elsevier Inc.

[21] Núñez, R., Romero, I., Teixidor, F., & Viñas, C. (2016). Icosahedral boron clusters: A perfect tool for the enhancement of polymer features. *Chemical Society Reviews*, 45(19), 5147-5173. <https://doi.org/10.1039/c6cs00159a>

[22] Brusselle, D., Bauduin, P., Girard, L., Zaulet, A., Viñas, C., Teixidor, F., Ly, I., & Diat, O. (2013). Lyotropic Lamellar Phase Formed from Monolayered θ -Shaped Carborane-Cage Amphiphiles. *Angewandte Chemie*, 125(46), 12336-12340. <https://doi.org/10.1002/ange.201307357>

[23] Poater, J., Viñas, C., Bennour, I., Escayola, S., Solà, M., & Teixidor, F. (2020). Too Persistent to Give Up: Aromaticity in Boron Clusters Survives Radical Structural Changes. *Journal of the American Chemical Society*, 142(20), 9396-9407. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c02228>

- [24] Goszczyński, T. M., Fink, K., Kowalski, K., Leśnikowski, Z. J., & Boratyński, J. (2017). Interactions of Boron Clusters and their Derivatives with Serum Albumin. *Scientific Reports*, 7(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10314-0>
- [25] Farràs, P., Juárez-Pérez, E. J., Lepšík, M., Luque, R., & Núñez, R. (2012). Metallocarboranes and their interactions: Theoretical insights and their applicability. *Chemical Society Reviews*, 41(9), 3445-3463. <https://doi.org/10.1039/c2cs15338f>
- [26] Bennour, I., Ramos, M. N., Nuez-Martínez, M., Ann, J., Xavier, M., Buades, A. B., Sillanpää, R., Teixidor, F., Choquesillo-Lazarte, D., Romero, I., Martínez-Medina, M. & Viñas, C. (2022). Water soluble organometallic small molecules as promising antibacterial agents: synthesis, physical-chemical properties and biological evaluation to tackle bacterial infections. *Royal Society of Chemistry*, 51(18), 7188-7209. <https://doi.org/10.1039/d2dt01015a>
- [27] Bauduin, P., Prevost, S., Farràs, P., Teixidor, F., Diat, O., & Zemb, T. (2011). A theta-shaped amphiphilic cobaltabisdicarbollide anion: Transition from monolayer vesicles to micelles. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(23), 5298-5300. <https://doi.org/10.1002/anie.201100410>
- [28] Tarrés, M., Canetta, E., Paul, E., Forbes, J., Azzouni, K., Viñas, C., Teixidor, F., & Harwood, A. J. (2015). Biological interaction of living cells with COSAN-based synthetic vesicles. *Scientific Reports*, 5, 1-8. <https://doi.org/10.1038/srep07804>
- [29] Goszczyński, T. M., Fink, K., & Boratyński, J. (2018). Icosahedral boron clusters as modifying entities for biomolecules. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 18(1), 205-213. <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1473369>
- [30] Verdiá-Báguena, C., Alcaraz, A., Aguilera, V. M., Cioran, A. M., Tachikawa, S., Nakamura, H., Teixidor, F., & Viñas, C. (2014). Amphiphilic COSAN and I2-COSAN crossing synthetic lipid membranes: Planar bilayers and liposomes. *Chemical Communications*, 50(51), 6700-6703. <https://doi.org/10.1039/c4cc01283f>
- [31] Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope¹ T. J. Silhavy, D. Kahne and S. Walker, . *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, 1-16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2857177/pdf/cshperspect-PRK-a000414.pdf>
- [32] Pursel, V. G., & Johnson, L. A. (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science*, 40(1), 99-102. <https://doi.org/https://doi.org/10.2527/jas1975.40199x>
- [33] Vilagran, I., Castillo-Martín, M., Prieto-Martínez, N., Bonet, S., & Yeste, M. (2016). Triosephosphate isomerase (TPI) and epididymal secretory glutathione peroxidase (GPX5) are markers for boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*, 165, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.12.001>
- [34] Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. (2016). Eosin-Nigrosin Staining Procedure. *Springer*, 73-77. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-26797-5>
- [35] Carvajal, G., Cuello, C., Ruiz, M., Vazquez, J., Arsenio, E., & Roca, J. (2004). Effects of Centrifugation Before Freezing on Boar Sperm. *Journal of Andrology*, 25(3), 389–396.
- [36] Takeshima, T., Yumura, Y., Kuroda, S., Kawahara, T., Uemura, H., & Iwasaki, A. (2017). Effect of density gradient centrifugation on reactive oxygen species in human semen. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 63(3), 192-198. <https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1294214>

- [37] Dimitrov, S., Atanasov, V., Dichlyanova, E., & Petrova, R. (2009). Comparison of Three Commercial Diluents for Short-Term Storage of Boar Semen. *Trakia Journal of Sciences*, 7(1), 58-62. <http://www.uni-sz.bg>
- [38] Li, J., Li, B., Song, J., Liu, H., Bi, W., Dong, G., & Zhou, T. (2018). Characteristic and mechanism of immobilization effect of *Staphylococcus aureus* on human spermatozoa. *Microbial Pathogenesis*, 119(April 2017), 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.049>
- [39] Yániz, J. L., Marco-Aguado, M. A., Mateos, J. A., & Santolaria, P. (2010). Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. *Animal Reproduction Science*, 122(1-2), 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.006>
- [40] Pérez-Duran, F., Acosta-Torres, L. S., Serrano-Díaz, P. N., Toscano-Torres, I. A., Olivo-Zepeda, I. B., García-Caxin, E., & Nuñez-Anita, R. E. (2020). Toxicity and antimicrobial effect of silver nanoparticles in swine sperms. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 66(4), 281-289. <https://doi.org/10.1080/19396368.2020.1754962>
- [41] Ramírez, B., & Valle, M. del. (2015). *Las organizaciones animalistas en la ciencia: comunicación y participación en el debate sobre la experimentación animal*. 22. [https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/32043/TFM_Mar%EDa del Valle BernardoRam%EDrez.pdf;jsessionid=1DF05549EB98124C6569DD7E76437618?sequence=6](https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/32043/TFM_Mar%EDa%20del%20Valle%20BernardoRam%EDrez.pdf;jsessionid=1DF05549EB98124C6569DD7E76437618?sequence=6)
- [42] Sáenz Medina, J., Asuero de Lis, M. S., Correa Gorospe, C., Cuevas, B., Gómez Dos Santos, V., Linares Quevedo, A. I., Páez Borda, A., Castellón Vela, I., Marcén Letosa, R., Pascual Santos, J., & Burgos Revilla, F. J. (2008). Modelos experimentales para la investigación y el entrenamiento en trasplante renal. *Actas Urológicas Españolas*, 32(1). <https://doi.org/10.4321/s0210-48062008000100009>
- [43] Ansele, M. (2015). *Los científicos españoles defienden la experimentación con animales*. El País. https://elpais.com/elpais/2015/02/19/ciencia/1424361428_621833.html
- [44] Collado, C. C., & Webster, J. (2016). *Género, ciencia y tecnologías de la información*. Editorial UOC, S.L. <https://books.google.es/books?id=fk8tEAAAQBAJ>
- [45] Jorge, J. (11 de febrer de 2019). *Ocho científicas asombrosas cuyo mérito se llevaron los hombres*. Periódico ABC. Recuperat el 19 de maig de 2022. https://www.abc.es/ciencia/abci-mujer-y-nina-ciencia-ocho-cientificas-asombrosas-cuyo-merito-llevaron-hombres-201802091740_noticia.html?ref=https%3A%2F%2Fwww.abc.es%2Fciencia%2Fabci-mujer-y-nina-ciencia-ocho-cientificas-asombrosas-cuyo-merito-llevaron-hombres-201802091740_noticia.html
- [46] Unidad de Mujeres y Ciencia del Ministerio de Ciencia e Innovación. (2021). *Científicas en cifras 2021*. 145. <https://www.ciencia.gob.es/site-web/ca/Secc-Servicios/Igualdad/cientificas-en-cifras.html>