



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Búsqueda de nuevos métodos de preservación espermática en la especie equina: Encapsulación

Search for new methods of sperm preservation in the equine species:
Encapsulation

Autor/es

Esther Alba Sánchez

Director/es

Lydia Gil Huerta

Facultad de Veterinaria

2022

ÍNDICE

1.- RESUMEN	3
2.- INTRODUCCIÓN	4
2.1 Antecedentes	5
2.2 Características espermáticas de la especie equina	5
2.3 Epidídimo	6
2.4 Sistemas de preservación espermática	8
2.4.1 Refrigeración.....	9
2.4.2 Congelación	10
2.4.3 Sistemas novedosos de preservación espermática en la especie equina	11
2.5 Encapsulación	12
2.5.1 Antecedentes de la encapsulación	12
2.5.2 Materiales y técnica de la encapsulación.	13
2.5.3 Ventajas de la microencapsulación	14
3.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	15
4.- MATERIAL Y MÉTODOS	15
4.1 Materiales	15
4.1.1 Material biológico.....	15
4.1.2 Material laboratorio	16
4.2 Método	16
4.2.1 Preparación de medios.....	16
4.2.2 Obtención de espermatozoides epididimarios.....	17
4.2.3- Compatibilidad del Alginato, ClBa y Citrato de sodio dihidratado tribásico.	19
4.2.4 Método manual de encapsulación seminal.....	19
4.2.5- Método de encapsulación con máquina encapsuladora B-395 pro (BUCHI)20	
4.3 Estudio estadístico	23
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
5.1 Efecto del ClBa y Alginato al 1,5% en la calidad espermática.	24
5.2 Efecto del Citrato de sodio en la calidad espermática	26
5.3 Experiencia manual de encapsulación	27
5.4 Primera experiencia con máquina encapsuladora B-395 Pro (BÜCHI)	27
5.5 Experiencias con máquina encapsuladora B-395 Pro (BÜCHI) y Citrato sódico. ..	28
6.- CONCLUSIÓN	29
7.- VALORACIÓN PERSONAL	32
8.- AGRADECIMIENTOS	33
9.-BIBLIOGRAFÍA	33

Índice de figuras, tablas y gráficas

Figura 1: Partes de espermatozoide equino (Gadella et al. 2001)	5
Figura 2: Comparación entre especies de secreción proteica en el epidídimo en porcentaje (Dacheux et al., 2003)	7
Figura 3: Técnica de lavado retrógrado (Bruemmer, 2006)	7
Figura 4: Efecto de la congelación/descongelación en la formación de cristales de hielo y daño de la membrana (Hammerstedt et al., 1990)	10
Figura 5: Figura de (Dubey et al., 2009) donde se representan los tipos de microcápsulas	13
Figura 6: Figura extraída de (Bennacef, et al., 2021) donde se representa la estructura de “caja de huevos”	13
Figura 7: Figura de elaboración propia con recopilación del material biológico usado	15
Figura 8: Figura 8: productos utilizados: Alginato de baja densidad, ClBa, Citrato sódico tribásico dihidratado y PB	16
Figura 9: Porcentajes de alginato realizados	17
Figura 10: Pesaje para ClBa 20mM	17
Figura 11: Pesaje para citrato sódico 55mM	17
Figura 12: A. Transporte de testículos. B. Testículos sin diseccionar. C. Epidídimos diseccionados	17
Figura 13: Canalización del conducto deferente e introducción del INRA 96®	18
Figura 14: Cápsulas manuales en placa calefactora a 37°C	20
Figura 15: Mecanismo de elaboración de capsulas core-shell (BÜCHI Labortechnik AG, 2016)	20
Figura 16: Efecto de los parámetros de la encapsuladora B-395 Pro (BÜCHI)	20
Figura 17: Encapsuladora B-395 pro (BUCHI) en funcionamiento	23
Figura 18: Contenido de la esfera captado con el programa ISAS Proiser	23
Figura 19: Elaboración propia donde se representa el experimento final	24
Tabla 1: Características del eyaculado de caballo semental (Busch y Waberski, 2007)	6
Tabla 2: Referencias de estudios sobre microencapsulación espermática (Valenzuela et al., 2013)	12
Tabla 3: Diferentes procesos de microencapsulación (Elaboración propia)	13
Tabla 4: Valores de referencia del programa CASA aplicables al ISAS Proiser (Valencia)	18
Tabla 5: Tamaños de boquillas en función % alginato (Extraída de BÜCHI Labortechnik AG, 2016)	21
Tabla 6: Extraída de (BÜCHI Labortechnik AG, 2016) donde se indican los parámetros a usar	21
Tabla 7: Valores obtenidos de los espermatozoides de la primera experiencia con máquina encapsuladora	28
Gráfica 1: Efecto del ClBa (20mmM) y Alginato 1,5% sobre la motilidad espermática a las 24 y 96 horas	25
Gráfica 2: Efecto del citrato de sodio a diferentes % sobre la motilidad espermática a las 3 y 24 horas.	26
Gráfica 3: Efecto de los diferentes tipos de cápsulas sobre la motilidad a 4°C y 37°C a diferentes tiempos	27
Gráfica 4: N° de espermatozoides en LR (líquido de suspensión) en refrigeración y a 37°C (1h) a las 24 y 96 horas.	29
Gráfica 5: Motilidad del CRS (control) y espermatozoides dentro de la bola tras 1h a 37°C a las 24 y 96 horas	29

1.- RESUMEN

En los últimos años, se ha comenzado a incorporar en el ámbito de la biotecnología reproductiva la técnica de encapsulación para la conservación de semen en diversas especies. Esta técnica consiste en el recubrimiento de células espermáticas con una membrana polimérica semipermeable gelificada por la interacción de los carboxilos del alginato (polímero) y los cationes presentes en los iones como el Ba^{2+} y Ca^{2+} . Esta tecnología ha tenido un crecimiento importante, aumentando cada vez el número de patentes y la publicación de artículos científicos, derivados de la investigación básica y aplicada. La microencapsulación espermática podría ser una técnica innovadora y alternativa para la preservación de espermatozoides en la especie equina, pues su desarrollo permitiría proteger a los espermatozoides frente al medio y su liberación controlada, que ayudaría a una inseminación artificial exitosa, dado que, por su fisiología, los celos de las yeguas son largos y la ovulación difícil de determinar.

Se ha podido comprobar la supervivencia y motilidad de los espermatozoides encapsulados en cápsulas tipo "core-shell" formadas a partir de alginato de sodio de baja densidad al 1% y ClBa 20mM mediante el uso de la máquina encapsuladora B-395 Pro (BÜCHI), lo que genera buenas expectativas en el desarrollo futuro de esta técnica.

In recent years, the encapsulation technique for the preservation of semen in various species has begun to be incorporated into the field of reproductive biotechnology. This technique consists of covering sperm cells with a semi-permeable polymeric membrane gelled by the interaction of the carboxyls of the alginate (polymer) and the cations present in the ions such as Ba^{2+} and Ca^{2+} . This technology has had an important growth, increasing each time the number of patents and the publication of scientific articles, derived from basic and applied research. Sperm microencapsulation could be an innovative and alternative technique for the preservation of spermatozoa in the equine species, since its development would allow spermatozoa to be protected against the environment and their controlled release, which would help a successful artificial insemination, since, due to its physiology, the heats of the mares are long and the ovulation difficult to determine.

It has been possible to verify the survival and motility of sperm encapsulated in "core-shell" type capsules formed from 1% low-density sodium alginate and 20mM ClBa by using the B-395 Pro (BÜCHI) encapsulating machine which generates good expectations in the future development of this technique.

2.- INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial, así como otras técnicas de reproducción asistida han ganado notoriedad a lo largo de las últimas décadas en el mundo de la producción equina (Loomis, 2022). Estas técnicas tienen como objetivo facilitar la distribución del semen, así como evitar la posible exposición a enfermedades y estrés durante el viaje a los que se podrían someter las yeguas y sementales (Hernández Avilés y Love, 2021). Por otro lado, el desarrollo de nuevas biotecnologías reproductivas ha permitido preservar material genético a lo largo del tiempo.

En la industria equina el método más utilizado para transportar dosis seminales es la refrigeración, proporcionando una calidad espermática aceptable hasta las 48 horas (Varela et al., 2018), pero el mayor problema de esta técnica radica en que el tiempo de conservación es muy limitado. Tras el primer nacimiento de un potro mediante dosis de semen congelado en 1957 (Barker y Gandier, 1957), la criopreservación adquirió una gran importancia, permitiendo conservar las dosis durante más tiempo hasta que la hembra estuviera en celo (Miller, 2008) o almacenarlo para su uso posterior.

La mayor limitación de estas técnicas convencionales es que cuando se llevan a cabo, la motilidad y el metabolismo de los espermatozoides se ven irreversiblemente reducidos, así como la membrana plasmática y el acrosoma que aparecen dañados significativamente (White, 1993).

Para evitar estos efectos adversos sobre los espermatozoides, se han ido desarrollando estrategias que los protejan de los factores medioambientales estresantes, como ha sido introducirlos en microcápsulas (Pruß et al., 2022). Esta estrategia tienen como objetivo reducir el daño al que se someten durante la congelación y refrigeración los espermatozoides, así como permitir una liberación lenta de los mismos en el genital de la hembra, dado que por las características de su ciclo reproductivo esta presenta una fase estral de 5 a 7 días, con variaciones según la época del año (Cortés-Vidauri, 2018) que obliga a mantener un seguimiento exhaustivo de toda la fase de forma ecográfica (Rodríguez Artiles, 2010) para realizar la inseminación lo más cercana a la ovulación.

La capacidad de conservación de los espermatozoides equinos presenta variaciones individuales, por lo que debe comprobarse en laboratorio su resistencia frente al enfriamiento y otros procedimientos (Katila, 1997), como son las nuevas técnicas de preservación, en este caso la microencapsulación, antes de usarse con fines comerciales.

2.1 Antecedentes

Los primeros programas de inseminación artificial en caballos comenzaron a finales del siglo XIX, aunque ya se tenía constancia de la práctica de esta técnica siglos atrás (Jörg, 2012). Según Aurich (2012), el pionero en la realización de experimentos sobre inseminación artificial de forma controlada en caballos fue el soviético Elia Iwanoff, quien publicó estudios con resultados satisfactorios donde se comprobaba que los animales obtenidos por esta técnica eran similares a los obtenidos de forma natural.

La yegua, a diferencia de las hembras de otras especies animales, presenta una predicción de la ovulación compleja. Posee una fase folicular de duración variable, así como una ovulación más cercana al momento final del estro que al inicio (i Roig Miro et al., 2004). Debido a estas características fisiológicas, hubo un aumento en la necesidad de desarrollar técnicas de conservación que permitieran preservar las dosis seminales durante más tiempo, con el fin de obtener mejores tasas reproductivas mediante inseminación artificial.

2.2 Características espermáticas de la especie equina

Según Gerlach y Aurich (2000) la especie equina tiene una reproducción de tipo estacional de días crecientes (en primavera), en la cual la liberación de testosterona, la producción de espermatozoides, el tamaño testicular y el comportamiento reproductivo en el macho están más acrecentados. Por otro lado, cabe destacar que en la época no reproductiva los machos de esta especie presentan menor concentración, peor motilidad, mayor número de formas anómalas, así como menor integridad de membrana en los espermatozoides y volumen de gel reducido en el eyaculado (Gamboa et al., 2010).

El eyaculado de caballo tiene un volumen variable entre 50mL-300mL, proveniente de tres fracciones de eyaculado que se liberan en tiempos diferentes (Diaz, 2010). La primera es rica en electrolitos y en componentes estimulantes y procedes de la próstata, la segunda contiene los espermatozoides procedentes de las ampollas de Henle y la última fracción, la cual es la más abundante, tiene características tampón, de protección biológica para los

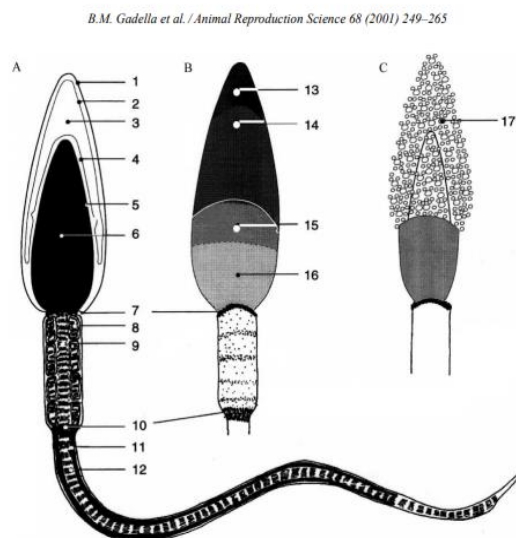


Figura 1: Partes de espermatozoide equino (Gadella et al., 2001)

espermatozoides y proviene de las vesículas seminales (Caiza de la Cueva et al., 1997) (Mottershead, 2000). Según Díaz (2010), el color del eyaculado es variable según la alimentación e individuo, así como por la concentración espermática que esté presente.

Los espermatozoides están formados por 3 regiones muy especializadas, la cabeza que contiene el ADN, la porción intermedia con las mitocondrias que proporcionan energía y el flagelo el cual está implicado en la movilidad (Figura 1) (Gadella et al., 2001). Según Busch y Waberski (2007) los caballos sementales suelen tener una concentración espermática que varía entre 80-350 x 10⁶ espermatozoides/ml con una motilidad mínima del 70% en semen fresco (Tabla1).

Tabla 1: Características del eyaculado de caballo semental (Busch y Waberski, 2007)

	Exigencias mínimas	Zona de fluctuación
Volumen	40 mL	20-120 mL
Fracción gel	-	0-20ml
Valor pH	-	6,5-7,3
Concentración espermatozoides	100 x 10 ⁶ /ml	80-350 x 10 ⁶ /ml
Nº total de espermatozoides	6 x 10 ⁹	5-12 x 10 ⁹
Motilidad total	70%	60-90%
Motilidad Lineal	50%	30-60%
Fracción espermatozoides vivos (FAT)	80%	70-90%
Espermatozoides morfológicamente íntegros	70%	60-80%

2.3 Epidídimo.

El epidídimo es un conducto en el que se distinguen tres partes: cabeza, cuerpo y cola (Little y Reed Holyoak, 1992) y cuya función principal es transportar los espermatozoides del testículo a la uretra permitiendo el desarrollo progresivo de los mismos hasta que alcanzan el potencial para fertilizar (Brooks, 1983). Como indicó Brooks (1983), es en este conducto, en su región más proximal, donde los espermatozoides adquieren la capacidad de mover el flagelo, así como la función de adhesión y reconocimiento de la zona pelúcida y posterior fusión con la membrana plasmática del ovocito (Sostaric et al., 2008).

Los espermatozoides transportados por el epidídimo son almacenados en la cola de este, y son característicos por presentar gota citoplasmática (Little y Reed Holyoak, 1992). Estas se van desplazando por el flagelo del espermatozoide hasta desaparecer al llegar a la cola del epidídimo o en el eyaculado (Busch y Waberski, 2007). Según Torreta (2010) las gotas citoplasmáticas

distales no influyen en la fertilidad de los espermatozoides e indican el grado de maduración de estos.

Cobra importancia la secreción de proteínas a nivel del epidídimo, en concreto, según Dacheux, Gatti y Dacheux (2003) se forman 18 proteínas en las que se incluyen: lactoferrina, clusterina, procatepsina D, proteína de transferencia de colesterol, glutatión peroxidasa, beta-N-acetil-hexosaminidasa

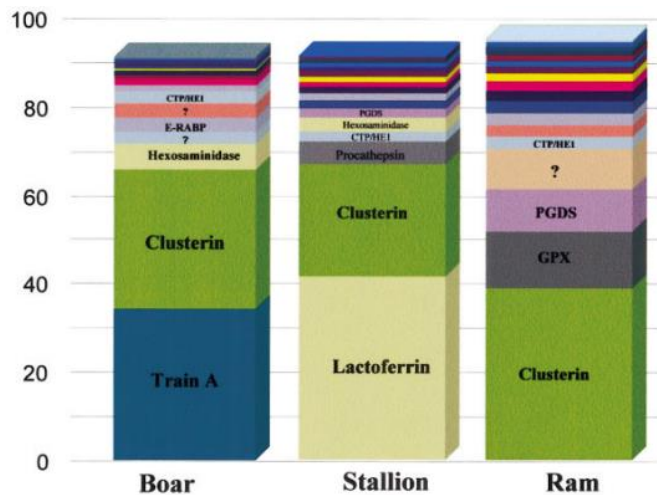


Figura 2: Comparación entre especies de secreción proteica en el epidídimo en porcentaje (Dacheux et al., 2003)

y prostaglandina D2 sintasa (Figura 2). Como indica Sostaric et al. (2008) estas podrían tener diversas funciones, como preservar la integridad de la membrana espermática o incluso modificarla.

Durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo, estos sufren un aumento de la concentración por reabsorción de fluidos desde la cabeza a la cola de este, ya que, en el caso de la especie equina, la secreción de las glándulas accesorias supone el 95% del volumen del eyaculado y es importante que en el eyaculado final se obtenga una concentración espermática adecuada (Vieira, 2013)

2.3.1 Obtención de espermatozoides epididimarios.

En la mayoría de los casos, la obtención de semen epididimario se realiza tras la castración del animal. Según Bruemmer (2006) tras la disección cuidadosa de la cola del epidídimo y el conducto deferente de ambos testículos, los espermatozoides pueden ser recogidos por la técnica de suspensión o mediante lavado retrógrado.



Figura 3: Técnica de lavado retrógrado (Bruemmer, 2006)

En la técnica de suspensión se realizan entre 12-15 cortes sobre la cola del epidídimo y la parte proximal del conducto deferente, y tras esto, se suspenden en un diluyente (5mL) durante aproximadamente 10 minutos para permitir que los espermatozoides floten (Cary et al., 2004). Tras este tiempo, se recoge el líquido suspendido donde se encontrarán los espermatozoides.

Como se explica en el protocolo mencionado por Bruemmer (2006), en el caso de la técnica de lavado retrógrado necesitamos una aguja roma del calibre 16 que se ajusta a una jeringa con medio de lavado y se introduce por la luz del conducto deferente, tras esto, se hace un pequeño corte en el extremo más distal de la cola del epidídimo para poder recoger el semen. Se debe introducir con cierta presión el medio de lavado (Figura 3)

En el caso del semen epididimario (0% de plasma seminal) se recomienda la adición de 5-25% de plasma seminal para mejorar su motilidad, ya que, si se compara con espermatozoides obtenidos de eyaculado, este ya presenta ese porcentaje de plasma que mejora su capacidad de movimiento durante el almacenamiento a 5°C (Braun et al., 1994). Por otro lado, Varner et al. (1987) explican que existen componentes perjudiciales en el plasma seminal que afectan a las células espermáticas durante la conservación *in vitro*, y que estos efectos se pueden evitar centrifugando el semen para eliminar el plasma seminal y añadiendo un diluyente adecuado. Según Morris (2002) el uso de espermatozoides de origen epididimario aún se encuentra con resultados de rendimiento de congelación y fertilidad por debajo de los resultados que se obtienen con muestras de eyaculado, pues tras la descongelación de los espermatozoides epididimarios aumentan las reacciones acrosómicas y se obtiene una menor tasa de concepción respecto al eyaculado.

2.4 Sistemas de preservación espermática

Los espermatozoides equinos se suelen procesar, para su conservación, de tres formas para su uso en la inseminación artificial: semen fresco, refrigerado y congelado (Hernández Avilés y Love, 2021). Actualmente se están desarrollando nuevas técnicas como la vitrificación o liofilización.

Tal como apuntó Graham (1996), la preservación espermática tiene numerosas ventajas en las que se incluye el descenso de transmisión de enfermedades sexuales, la conservación del semen tras la muerte del semental, la capacidad de inseminar muchas más yeguas con un mismo eyaculado, entre otras. Esta técnica no está exenta de ciertas desventajas como son un descenso de las tasas de gestación y el requerimiento de una mayor experiencia y pericia por parte del personal para llevar a cabo tanto la técnica de conservación como más tarde la inseminación artificial.

Por otro lado, el procesado del eyaculado para aumentar la supervivencia espermática *in vitro* provoca un efecto dilución, que genera una actividad acentuada inmediata, pero más tarde supone, pérdida de motilidad y daños en la membrana (Busch y Waberski, 2007). Los diluyentes

más usados durante la dilución y envasado para producir dosis refrigeradas son aquellos que se basan en leche desnatada, y para congelación yema de huevo (Pugliesi et al., 2012), con la intención de aportar ingredientes que compensen la pérdida de componentes esenciales durante la conservación (Busch y Waberski, 2007).

Según Ecot et al. (2005) el semen equino suele centrifugarse tras la dilución para aumentar la concentración espermática, así como para eliminar el plasma seminal, el problema de este proceso es que se pueden perder espermatozoides durante el mismo.

2.4.1 Refrigeración

El almacenamiento de los espermatozoides a una temperatura de 4-5°C permite un manejo más sencillo de los mismos (Pickett y Amann, 1987). Aun así, tal y como indican Busch & Waberski (2007) la conservación en refrigeración es limitada (24-48 horas), pues tanto la capacidad fecundante como motilidad se ven reducidas a lo largo del tiempo y suelen aparecer durante este proceso diversas diferencias individuales según el semental.

La concentración óptima tras la dilución para mejorar la supervivencia espermática durante la refrigeración es de unos 25×10^6 espermatozoides/mL según los estudios de Varner et al. (1987). Aun así, Webb, Ams y Pool (1993) establecieron que también se podrían usar dosis de 100×10^6 espermatozoides/ml.

Según Amann y Pickett (1987), el punto crítico durante la refrigeración se produce con el paso de 18°C a 8°C, y es donde los espermatozoides pueden sufrir “shock por frío” que altere su membrana plasmática. Por otro lado, la fragmentación del ADN también puede influir negativamente en la fertilidad del semen almacenado en refrigeración, pero este efecto no suele aparecer antes de las 48 horas (Aurich, 2008).

Para conservar los procesos metabólicos de los espermatozoides, aportarles energía, evitar los daños producidos por las bajas temperaturas y controlar la contaminación bacteriana, se hace uso de diluyentes basados en: yema de huevo, LDL, leche y lecitina de soja (Ghadeer Sabah y Falah Hasan, 2021). El diluyente INRA96® (un medio comercial) es el más utilizado para la refrigeración de semen equino, el cual ha sido elaborado a partir de fracciones purificadas de leche por Batellier et al. en (1997). En este diluyente, se hace uso de fosfocaseínas de calcio purificado, que protegen en mayor medida a la membrana plasmática de los espermatozoides. Además, contiene azúcares y proteínas que los protegen frente al choque térmico y les aportan energía, además de penicilina y gentamicina que previenen el crecimiento bacteriano y anfotericina B como fungicida.

2.4.2 Congelación

Según indica McGann (1978), aun usando protocolos de congelación perfeccionados y las mejores condiciones, un 40-50% de los espermatozoides no sobrevivirán a la congelación. Por otro lado, la diferencia individual de cada semental también es importante, pues cada individuo puede tener una tolerancia diferente al contacto con el glicerol (Prien y Lacovides, 2016).

Como indicaron Amann y Pickett (1987), durante la congelación se forman cristales y en este proceso se genera un aumento de la osmolaridad del líquido extracelular que provoca una deshidratación de las células espermáticas, y según la velocidad de congelación, se puede favorecer la formación de cristales intracelulares o un aumento de la concentración de sales dentro de los espermatozoides, ambos factores siendo perjudiciales para los mismos.

Por otro lado, según indica Graham (1996) también es de vital importancia las ratios de descongelación según el protocolo de congelación usado. Estos tiempos de descongelación tratan de minimizar el daño que hayan podido sufrir los espermatozoides por la presencia de cristales o movimiento de solutos (Hammerstedt et al., 1990) (Figura 4)

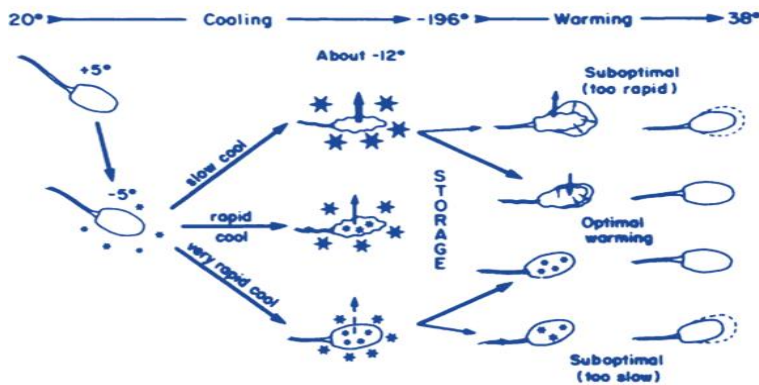


Figura 4: Efecto de la congelación / descongelación en la formación de cristales de hielo y daño de la membrana (Hammerstedt et al., 1990)

Es debido a los motivos anteriores expuestos por lo que se suelen añadir a los diluyentes sustancias con función crioprotectora. Estas sustancias se clasifican en penetrantes y no penetrantes (Graham, 1996). Los penetrantes como el glicerol, evitan la acumulación de electrolitos en el espermatozoide y la formación de cristales, penetrando a través de la membrana celular, por otro lado, los no penetrantes no traspasan la membrana y se asocian a los penetrantes, pues promueven la deshidratación celular (Avila Portillo et al., 2006). Los espermatozoides almacenados a una temperatura de -196°C pueden estarlo indefinidamente (Graham, 1996).

Hoy en día aún no se ha establecido un estándar para las dosis de semen congelado, por lo que La Federación Mundial para Cría de Caballos de Deporte, en un intento de aumentar la uniformidad respecto al número de espermatozoides por dosis, ha establecido un mínimo de

250 x 10⁶ espermatozoides/mL de espermatozoides motiles progresivos por dosis (Cazales Penino et al., 2020).

2.4.3 Sistemas novedosos de preservación espermática en la especie equina

Actualmente están apareciendo sistemas alternativos de conservación espermática en numerosas especies, como puede ser la vitrificación (Díaz-Jimenez et al., 2018) y la encapsulación espermática, cuya finalidad es optimizar la inseminación artificial (Perteghella et al., 2015).

Tal como apuntan Pruß et al. (2022), proporcionar una mayor resistencia y capacidad de almacenamiento a largo plazo de los espermatozoides, supondrá una gran ventaja para la industria de la reproducción, así como para el manejo, transporte e inseminación de dosis seminales.

El proceso de vitrificación busca realizar una congelación ultrarrápida del semen, que evite la formación de cristales que afecten a la supervivencia celular, el problema es que el uso de altas concentraciones de crioprotectores penetrantes como el glicerol, antes necesarios en la congelación convencional, generan un shock osmótico perjudicial para los espermatozoides (Isachenko et al., 2008). Es por este motivo, que se está buscando la concentración de crioprotectores necesaria durante la vitrificación que evite la deshidratación celular por cambio en la osmosis, pero mantenga la capacidad protectora que aportan los mismos (Gilmore et al., 1997).

Además, tal como indica Isachenko, et al. (2003) la vitrificación tiene varias ventajas sobre la congelación convencional, ya que no necesita un equipamiento específico y la congelación-descongelación se realiza en pocos segundos. Aun así, esta técnica de conservación aún se encuentra en desarrollo (Consuegra et al., 2020; Restrepo et al., 2019).

Por otro lado, otro método de conservación seminal en desarrollo es la liofilización, la cual consiste en el secado de material congelado mediante la sublimación del hielo. La limitación de este proceso es que los espermatozoides pierden la motilidad y son incapaces de fertilizar los ovocitos si no es mediante la técnica ICSI, debido a las condiciones de temperatura, presión y secado a las que se ven sometidos (Olaciregui y Gil, 2016).

2.5 Encapsulación

Esta técnica tiene como fundamento la protección de materiales sólidos, líquidos o gaseosos, que se recubren con biopolímeros o polímeros artificiales para su posterior liberación de forma controlada (Valenzuela et al., 2013). Según explica este autor, el proceso de encapsulación en las ciencias veterinarias ha estado encaminado a la investigación dentro de la nutrición animal, diagnóstico, farmacología, vacunología y reproducción.

2.5.1 Antecedentes de la encapsulación

Tal y como indica Gibbs et al. (1999) el proceso de encapsulación se desarrolló sobre los años cincuenta en el mundo de la cocina y nutrición. El inicio de esta se basó en el proceso de coacervación, que consiste en la separación de hidrocolides de una solución inicial y luego la deposición de estos alrededor del ingrediente activo, pudiendo ser necesaria la acción de un reticulante para la formación de la capa de hidrocoloide, pero con el tiempo, se fueron desarrollando nuevos materiales y técnicas que permitieron aumentar la funcionalidad y capacidad de la encapsulación (Gouin, 2004). No fue hasta 1985 que se comprobó su efecto sobre los espermatozoides bovinos y su utilidad para la inseminación artificial (Nebel et al., 1985). Este autor llevó a cabo dos experimentos con diferentes procedimientos para la formación de microcápsulas con espermatozoides bovinos, y a la conclusión que se llegó, es que era posible la encapsulación de células espermáticas sin que estas sufrieran daños severos. Tras estos primeros estudios, otros autores han llevado a cabo experimentos de viabilidad y conservación de espermatozoides en microcápsulas, con semen de diferentes especies (Tabla 2)

Tabla 2: Referencias de estudios sobre microencapsulación espermática (Valenzuela et al., 2013))

Autor (es)	Tipo de micropartícula	Material activo	Uso
(Shah, et al., 2010)	Microcápsulas	Espermatozoides	Conservación de semen canino
(Weber, et al., 2006)	Microcápsulas	Espermatozoides	Protocolos de microencapsulación, criopreservación y liberación de espermatozoides bovinos
(Vigo, et al., 2009)	Microcápsulas	Espermatozoides	Liberación controlada en porcinos
(Thiangthientham, et al., 2020)	Microcápsulas	Espermatozoides	Cationes divalentes y temperaturas optimas de almacenamiento de microcápsulas en ovino
(Pruß, et al., 2022)	Microcápsulas	Espermatozoides	Aumento de la estabilidad de almacenamiento en equinos

2.5.2 Materiales y técnica de la encapsulación.

Dubey et al. (2009) señala que las microcápsulas son estructuras cuyo tamaño varía desde una micra a unos pocos milímetros, las cuales se pueden clasificar en tres tipos: mononúcleo (una sola cámara), polinúcleo (varias cámaras en el interior) y matriz (componentes del interior unidos a la matriz de la cobertura) (Figura 5).

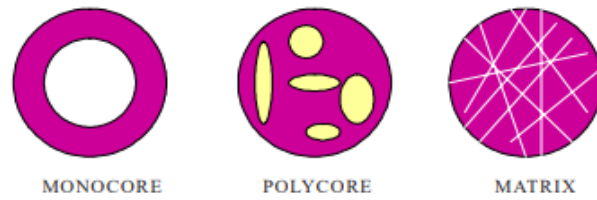


Figura 5: Figura de (Dubey et al., 2009) donde se representan los tipos de microcápsulas

El material más usado para este procedimiento es el alginato, el cual es un polímero natural con gran capacidad gelificante proveniente de las algas (Olabisi, 2014). Según Hu et al. (2021) la gelificación se produce al interaccionar polímeros cargados positivamente como son los grupos carboxilos del alginato con los cationes presentes en iones como H^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} etc.

Tal como indica Bennacef et al. (2021) durante la gelificación, los cationes reemplazan el sodio del alginato para entrecruzar dos cadenas de este y formar una red. Este autor denomina a esta reacción como modelo de “caja de huevos”, pues se forman dos cadenas antiparalelas con zonas de unión al

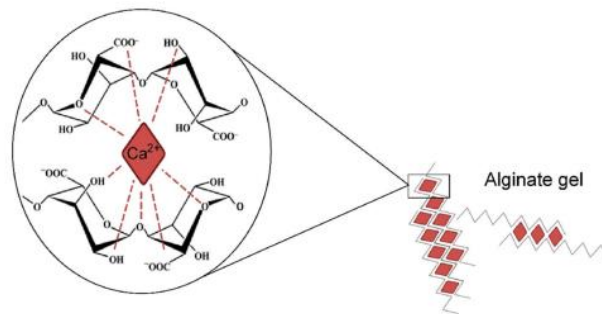


Figura 6: Figura extraída de (Bennacef, et al., 2021) donde se representa la estructura de “caja de huevos”

cación con el que hayan reaccionado (Figura 6). Se debe tener en cuenta que las condiciones de pH, temperatura, concentración de alginato, concentración de solución iónica, fuerza iónica y tiempo de reacción influyen en el proceso (Bennacef et al., 2021).

El proceso de microencapsulación puede llevarse a cabo mediante diferentes técnicas (Nava Reyna et al., 2015) (Tabla 3).

Tabla 3: Diferentes procesos de microencapsulación (Elaboración propia)

FÍSICOS	QUÍMICOS	FISICOQUÍMICOS
Secado por aspersión	Polimerización interfacial	Coacervación
Extrusión	Inclusión molecular	Atrapamiento en liposomas
Recubrimiento por aspersión		Micelas inversas

Según Reyna et al. (2015) cada una de las técnicas indicadas anteriormente presentan sus características concretas, como el uso de diferentes materiales (monómeros o polímeros).

En concreto, la extrusión consiste en el paso de líquidos que forman el núcleo y la cubierta de la microcápsula por conductos concéntricos y la formación de gotas por el efecto de la vibración, más tarde, la superficie se endurece por evaporación, reticulación química o enfriamiento (Dubey et al., 2009). Según Bennacef et al (2021) en este proceso, la esfericidad de las microcápsulas viene determinada por la viscosidad de la solución de alginato, así como por la distancia de caída de las gotas al baño, siendo la distancia óptima entre 7 y 10 centímetros.

Las ventajas que ofrece la extrusión son diversas como: fácil aplicación e industrialización, uso de matrices hidrofílicas, capacidad de encapsulación de multitud de sustancias, protección frente a la oxidación, formación de multitud de tamaños de cápsula, etc (Bennacef et al., 2021).

2.5.3 Ventajas de la microencapsulación

En cuanto a la microencapsulación de células, Murua et al., (2008) explican que el objetivo de esta técnica es la inmovilización de las células dentro de estas microcápsulas para su protección frente a agentes mecánicos, sin evitar la difusión bidireccional entre el interior y el exterior de la microcápsula.

La microencapsulación aún se encuentra en desarrollo, pero podría aportar numerosas ventajas para la preservación y conservación celular (Dubey et al., 2009):

- Separación de componentes incompatibles
- Transformación de líquidos en sólidos
- Aumento de la estabilidad de los componentes activos internos.
- Protección frente al medioambiente
- Liberación controlada de los materiales activos
- Liberación dirigida de los materiales activos

Estas ventajas permitirían mantener la integridad de membrana de los espermatozoides, así como reducir costes derivados de la inseminación estándar, como son: el uso de varias dosis de inseminación, costes de mano de obra y el uso de materiales más baratos como es el alginato (Faustini et al., 2012).

3.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Ho y en día la reproducción asistida equina presenta grandes costes a nivel material, logístico y económico. Es necesaria la implicación de un veterinario durante varios días para controlar el ciclo ovárico de la yegua haciendo uso del ecógrafo, la coordinación precisa con el proveedor de las dosis seminales, el control de las condiciones ambientales durante el transporte de las dosis, y en muchas ocasiones, es requerida la administración de hormonas estimulantes de la ovulación a la yegua.

Debido a estas causas, existe la necesidad de desarrollar métodos alternativos de conservación espermática, como la encapsulación seminal, que simplifiquen y abaraten los costes de la inseminación artificial estándar, protegiendo y conservando de una manera más eficiente a los espermatozoides y permitiendo una liberación controlada de los mismos.

Por todo ello, el **objetivo** de este estudio fue la puesta a punto del método de encapsulación espermática equina haciendo uso de la máquina encapsuladora B-395 Pro (BÜCHI).

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

Los materiales y métodos utilizados en este trabajo de puesta a punto de la microencapsulación son los siguientes.

4.1 Materiales

4.1.1 Material biológico

Se utilizó como material biológico espermatozoides de origen epididimario de 13 caballos sacrificados en el matadero municipal de Zaragoza (Merca Zaragoza). En toda la investigación se hizo uso de 26 testículos en función de las pruebas realizadas (Figura 7).

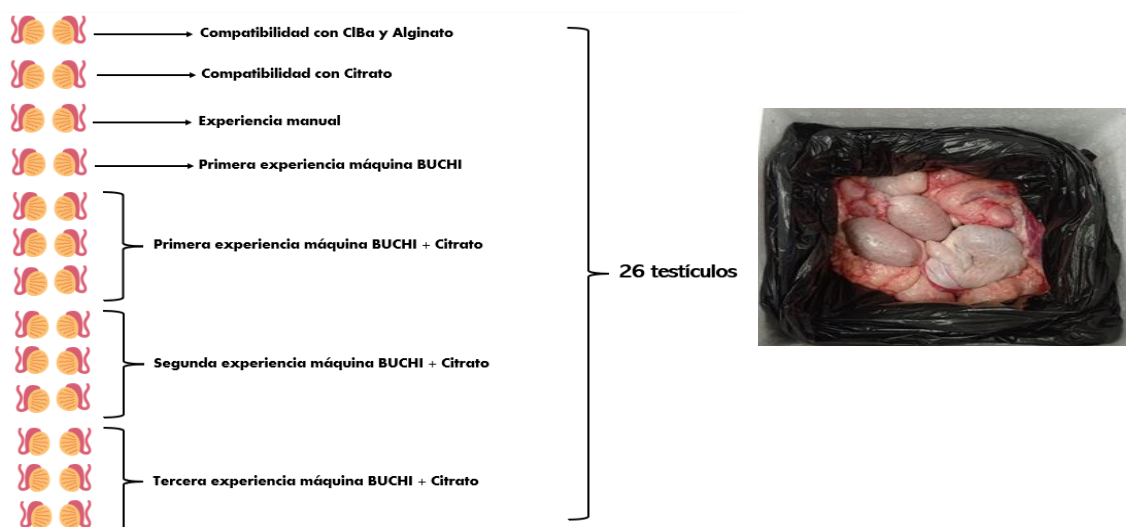


Figura 7: Figura de elaboración propia con recopilación del material biológico usado

Se desconocía el historial sanitario y reproductivo, así como la procedencia de los animales. La calidad seminal fue contrastada y el semen procesado antes de la realización de cada una de las fases experimentales.

4.1.2 Material laboratorio

Los materiales utilizados fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Alemania), salvo que se indique lo contrario (Figura 8). El medio para el procesado del semen, lavado y centrifugado, así como el utilizado durante el lavado y suspensión de las cápsulas fue el INRA 96®, diluyente de refrigeración para semen equino (Minitüb GmbH, Alemania). Se utilizó eosina (colorante vital) para la tinción de la muestra espermática. Como medio de encapsulación se hizo uso de alginato de baja densidad junto con PBS (solución salina tamponada con fosfato) y cloruro de bario (ClBa) junto con INRA 96®. Para la posterior degradación de las cápsulas se utilizó citrato de sodio tribásico dihidratado (citrato de sodio).



Figura 8: Productos utilizados: Alginato de baja densidad, ClBa, Citrato sódico tribásico dihidratado y PBS

También se hizo uso de todo el material necesario en un laboratorio de tecnología seminal, así como de la máquina encapsuladora B-395 Pro (BÜCHI Labortechnik).

Por otro lado, para la evaluación espermática y morfológica de las capsulas se utilizó un microscopio con el programa ISAS Proiser (Valencia) de análisis espermático.

4.2 Método

4.2.1 Preparación de medios

Durante las diferentes experiencias se realizaron varias concentraciones de alginato de baja densidad teniendo en cuenta las concentraciones recomendadas por la máquina de encapsulación B-395 (1%-2%), para comprobar cuál de ellas producía capsulas mejor estructuradas (Figura 9).

Para la disolución de los alginatos se usó un agitador magnético a revoluciones altas al que se le añadió poco a poco el alginato para que este se fuera hidratando y se disolviera de forma más eficiente.

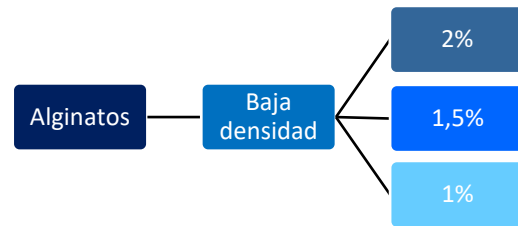


Figura 9: Porcentajes de alginato realizados

En cuanto al ClBa según Pruß et al., (2022) el uso de una concentración de 20mM mostraba buenos resultados, por lo que se decidió realizar ClBa a dicha concentración durante las experiencias (Figura 10). Se pudo ver que el ClBa (20mM) junto con el PBS precipitaba, por lo que se decidió diluirlo también con INRA 96®.

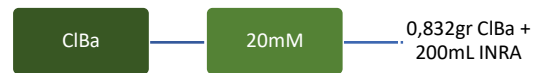


Figura 10: Pesaje para ClBa 20mM

Para comprobar el efecto del citrato sódico en la degradación de las cápsulas se usó una molaridad de 55mM (Défaz Gavilanes y Moreira Cálix, 2017) y se puso en contacto con estas a diferentes concentraciones (0%, 5%, 10% y 15%) (Figura 11).



Figura 11: Pesaje para citrato sódico 55mM

Tras la disolución de estos componentes se comprobó el pH y osmolaridad de las mezclas, ajustándolas a un pH entre 6,8 y 6,9 y una osmolaridad media 280 mOsm en todas ellas.

4.2.2 Obtención de espermatozoides epididimarios

Los testículos procedentes del matadero fueron recibidos en el laboratorio de forma rápida tras el sacrificio de los animales. Fueron transportados en una caja de poliespán para mantener su temperatura.

Se procedió a la disección de los testículos necesarios para el experimento, retirándoles la fascia. Seguidamente, se disecó con tijeras la parte de la cola del epidídimo y el conducto deferente. (Figura 12).



Figura 12: A. Transporte de testículos. B. Testículos sin diseccionar. C. Epidídimos diseccionados

Una vez diseccionados, se canalizó el conducto deferente desde la parte final del mismo con una aguja de 18G y se pinzó con un mosquito para bloquearlo. Tras ello, se realiza un pequeño corte en la parte más distal de la cola del epidídimo.

Acoplamos la aguja a la jeringuilla con el INRA 96® atemperado y lo introducimos ejerciendo presión. La muestra resultante fue recogida en un vaso de precipitado con un pequeño volumen de INRA 96® para evitar la caída directa de los espermatozoides en el vaso (Figura 13).



Figura 13: Canalización del conducto deferente e introducción del INRA 96®

Una vez realizada la recolección, se observó la calidad (motilidad y parámetros de motilidad) así como la concentración espermática obtenida mediante el programa ISAS Proiser (Tabla 4)

Tabla 4: Valores de referencia del programa CASA aplicables al ISAS Proiser (Valencia)

Parámetro	Valor de referencia
VCL (velocidad curvilínea) $\mu\text{m} / \text{seg}$	109,73 \pm 0,30 $\mu\text{m}/\text{s}$
VSL (velocidad rectilínea) $\mu\text{m} / \text{seg}$	62,97 \pm 0,24 $\mu\text{m}/\text{s}$
VAP (velocidad de la trayectoria media) $\mu\text{m} / \text{seg}$	84,90 \pm 0,24 $\mu\text{m}/\text{s}$
STR (índice de rectitud)%	72,04 \pm 0,16%
LIN (índice de linealidad)%	56,80 \pm 0,17%
WOB (índice de oscilación)%	76,59 \pm 0,11%
ALH (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza) μm	3,37 \pm 0,01%
BCF (frecuencia de batida) Hz	6,98 \pm 0,03%

Tras confirmar la concentración espermática inicial se sometió a la muestra, previa dilución, a centrifugación a 1000g durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se retiró el sobrenadante y se añadió el volumen necesario de INRA 96® para obtener la concentración deseada. Tras este procesado se comprobó de nuevo la calidad espermática post-centrifugación.

4.2.3- Compatibilidad del Alginato, ClBa y Citrato de sodio dihidratado tribásico.

En primer lugar, se puso en contacto espermatozoides epididimarios procesados de un caballo junto con alginato de baja densidad al 1,5% y junto con ClBa (20mM) hasta las 96 horas en refrigeración. Tanto a tiempo 0 como a las 24 horas y 96 horas se comprobó el efecto que originaban sobre los espermatozoides y para ello se evaluó su motilidad mediante el programa ISAS Proiser.

En el caso del citrato de sodio tribásico dihidratado, se formularon diferentes concentraciones de este, en concreto: 10%, 15% y 20%. Estas concentraciones fueron expuestas a los espermatozoides procedentes del semen epididimario de un caballo hasta las 24 horas en refrigeración. Su efecto sobre los espermatozoides fue comprobado a las 3 horas y 24 horas de exposición mediante el mismo programa de análisis espermático.

4.2.4 Método manual de encapsulación seminal

En esta parte del trabajo se decidió realizar microcápsulas de forma manual, para comprobar la interacción entre el alginato de baja densidad y el ClBa (20mM) antes del experimento en la encapsuladora B-395 Pro. El semen epididimario de un caballo después de procesado fue teñido con Eosina para poder visualizarlo mejor los espermatozoides en la esfera.

Se decidió elaborar capsulas de diferentes formas:

- Monocapa con 10% y 20% de ClBa (20mM): se creó una capa de alginato en una placa y se inyectó con una pipeta una gota de semen dentro de la misma. Esta se recogió y se dejó caer en una solución de ClBa al 10% y se repitió el mismo proceso, pero con ClBa al 20%.
- Maciza con 10% y 20% de ClBa: se mezcló el semen con el alginato y posteriormente se dejó caer gota a gota en la solución de ClBa al 10% y de igual manera en una solución de ClBa al 20%.
- Inversa (core-shell) con 10% de ClBa: se mezcló el semen con el ClBa (20mM) y posteriormente se dejó caer en el alginato de baja densidad al 1,5%.

Todas las capsulas formadas fueron, una vez lavadas con INRA 96®, conservadas en el mismo medio en refrigeración durante 24 horas. Tras este tiempo, fue evaluado el medio donde estaban suspendidas para comprobar la presencia de espermatozoides que pudieran haberse liberado de la esfera.

Tras la anterior comprobación, las esferas fueron calentadas a 37°C durante 10, 60 y 90 minutos (Figura 14). En estos tres tiempos fue comprobado el medio de suspensión en busca de

espermatozoides que se pudieran haber liberado al medio. A los 90 minutos se decidió romper la bola mediante presión para liberar los espermatozoides del interior y comprobar su motilidad.

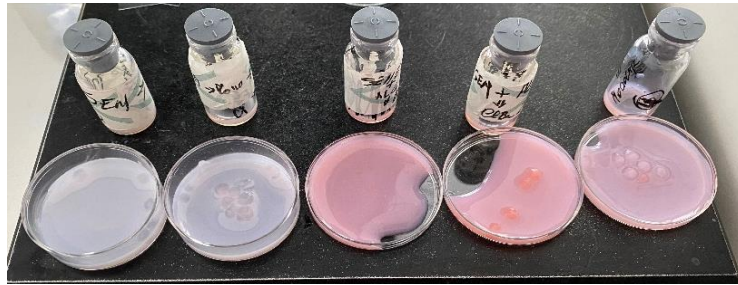


Figura 14: Cápsulas manuales en placa calefactora a 37°C

4.2.5- Método de encapsulación con máquina encapsuladora B-395 pro (BUCHI)

Esta máquina encapsuladora ha sido adquirida por el Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2) y en la actualidad se encuentra instalada en la planta piloto de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Durante este trabajo, hubo que hacer la puesta a punto de esta ya que no había sido utilizada hasta el momento.

Su mecanismo de acción se basa en la formación de esferas por extrusión mediante boquillas concéntricas de diferentes tamaños. Este sistema de boquillas concéntricas es útil para la formación de capsulas de tipo “core-shell”, con una parte exterior de cobertura de alginato y una parte interior en estado líquido con la muestra espermática (Figura 15)

Esta máquina presenta dos sistemas de bombeo, uno con jeringa volumétrica y otro con bombeo por presión de aire. El usado durante nuestra experiencia es el que hace uso de jeringuilla, pues es el que se adapta a volúmenes pequeños, mayor precisión de la velocidad de flujo y menos volumen muerto (BÜCHI Labortechnik AG, 2016).

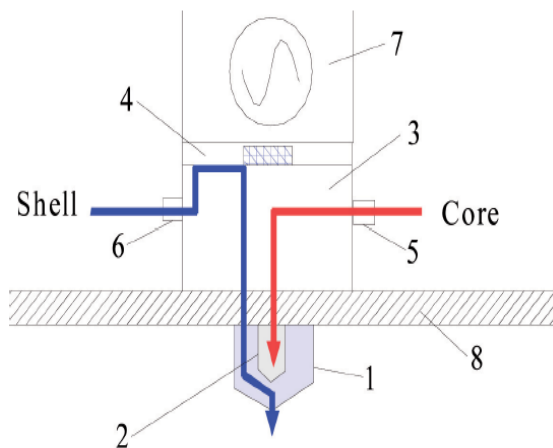


Figura 15: Mecanismo de elaboración de capsulas core-shell (BÜCHI Labortechnik AG, 2016)

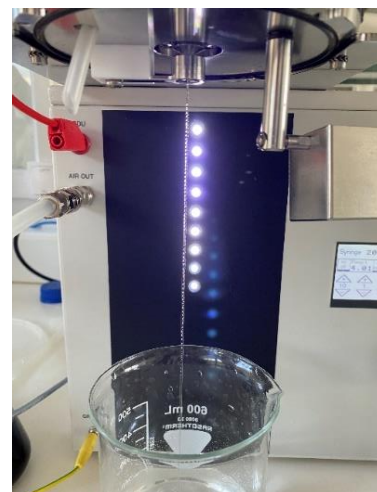


Figura 16: Efecto de los parámetros de la encapsuladora B-395 Pro (BÜCHI)

El tamaño de las capsulas se controla con los parámetros de: frecuencia de vibración, amplitud, tamaño de la boquilla, la velocidad de flujo y las propiedades fisicoquímicas de la mezcla de polímero y producto (Figura 16).

4.2.5.1 Preparación máquina encapsuladora B-395 pro (BÜCHI)

Después de procesar la muestra de semen epididimario y teñirla con eosina para facilitar su visualización, acudimos a la planta piloto de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza con la muestra y los medios necesarios para el procesamiento (alginato de baja densidad al 1,5%, CIBa 20mM e INRA 96®).

Lo primero que se debía montar eran las boquillas concéntricas en el dispositivo, las cuales vienen determinadas por el manual de la encapsuladora, según el porcentaje de alginato a usar. En nuestro caso, al hacer uso de alginato al 1,5% se colocó una boquilla central de 300µm y una boquilla de cubierta de 600µm, ya que como indica el manual la boquilla de cobertura debe ser como mínimo el doble del tamaño de la central (Tabla 5).

Tabla 5: Tamaños de boquillas en función % alginato (Extraída de BÜCHI Labortechnik AG, 2016)

Diámetro de boquilla	Concentración de alginato de grado de viscosidad bajo	
	Intervalo de trabajo	Concentración recomendada
80 a 120 µm	0,75 a 1,4 %	1,1 a 1,2 %
120 a 200 µm	1,0 a 1,6 %	1,3 a 1,4 %
200 a 300 µm	1,2 a 1,8 %	1,5 a 1,6 %
300 a 500 µm	1,5 a 2,5 %	1,8 a 2,0 %

Posteriormente se debe instalar el sistema de botella a presión, pues es en este dónde colocamos el alginato de baja densidad una vez filtrado a través de un filtro de 0,8µ, para que más tarde pase al circuito y no se obstruya. También se introduce el CIBa en un vaso de precipitado con agitación mediante imán.

Tabla 6: Extraída de (BÜCHI Labortechnik AG, 2016) donde se indican los parámetros a usar

Diámetro de la boquilla [µm]	Velocidad del flujo * [mL/min]	Intervalo de frecuencia **	Amplitud	Presión del aire [bares]
1,0 mm	30 a 40	40 a 220 Hz	2 a 6	0,3 a 0,6
750 µm	19 a 25	40 a 300 Hz	2 a 5	0,3 a 0,5
450 µm	9 a 14	150 a 450 Hz	2 a 5	0,3 a 0,5
300 µm	5,5 a 7	400 a 800 Hz	1 a 3	0,3 a 0,5
200 µm	3,5 a 4,5	600 a 1.200 Hz	1 a 3	0,4 a 0,6
150 µm	2,3 a 2,8	800 a 1.800 Hz	1 a 3	0,4 a 0,6
120 µm	1,5 a 1,8	1.000 a 2.500 Hz	1 a 4	0,5 a 0,7
80 µm	1,1 a 1,3	1.300 a 3.000 Hz	1 a 4	0,5 a 0,7

Por último, se acopla la jeringuilla con la muestra seminal, el electrodo y se introducen los parámetros de: frecuencia, electrodo, agitador y bombeo. Estos parámetros también son recomendados por el manual según el alginato a usar (Tabla 6), pero se deben hacer modificaciones para conseguir resultados óptimos.

4.2.5.2 Primera experiencia con máquina encapsuladora B-395 (BÜCHI)

Después del montaje de la máquina se programaron los siguientes parámetros en esta primera experiencia de prueba:

Frecuencia	Electrodo	Agitador	Bombeo
700Hz	2500V	50%	4mL/min

Las capsulas obtenidas se mantuvieron durante 10 minutos en el ClBa 20mM en agitación. Tras esto, fueron lavadas y mantenidas en suspensión con INRA 96[®]. Parte de las cápsulas obtenidas se mantuvieron en refrigeración y otras a 37°C hasta las 72 horas. Tanto a las 24, 48 como a las 72 horas fueron evaluados mediante el programa ISAS Proiser el medio de suspensión de las cápsulas para comprobar la presencia de espermatozoides, así como el contenido espermático de estas tras ser presionadas.

4.2.5.3 Segunda Experiencia con máquina encapsuladora y Citrato sódico

Respecto a la experiencia anterior se incrementó el bombeo para aumentar el paso de espermatozoides al interior de la capsula, así como la concentración espermática del contenido de esta. Se aumentó el porcentaje de agitación para evitar la aglutinación de las cápsulas en el ClBa y se ajustó la frecuencia y el electrodo para obtener cápsulas de mayor calidad morfológica (más esféricas).

Frecuencia	Electrodo	Agitador	Bombeo
900Hz	2000V	100%	8mL/min

Se mantuvieron las capsulas formadas durante 10 minutos en el ClBa 20mM en agitación y se lavaron y suspendieron posteriormente con INRA 96[®]. Para recogerlas del baño de ClBa se usó un colador fino (Figura 17)

En todas las experiencias se dividieron parte de las cápsulas en tubos Falcón con diferentes proporciones de citrato de sodio: 0%, 5%, 10% y 15%. Estas muestras fueron llevadas a



Figura 17: Encapsuladora B-395 pro (BUCHI) en funcionamiento.

refrigeración hasta las 96 horas. A las 24 horas en refrigeración, fue evaluado el líquido de suspensión y parte de las cápsulas fueron calentadas durante 1 hora a 37°C para más tarde analizar el líquido de suspensión en búsqueda de espermatozoides que se pudieran haber liberado de estas por calor. A las 96 horas se repitió el proceso anterior y además se rompieron las cápsulas por aplastamiento para evaluar el contenido interior.

La evaluación morfológica y estructural de las cápsulas en todas las experiencias se realizó de forma macroscópica, visualmente, comprobando la presencia de color rosáceo perteneciente a la eosina adicionada a los espermatozoides y comprobando la forma esférica de las mismas. También a través del microscopio se pudo comprobar la estructura de la cápsula.

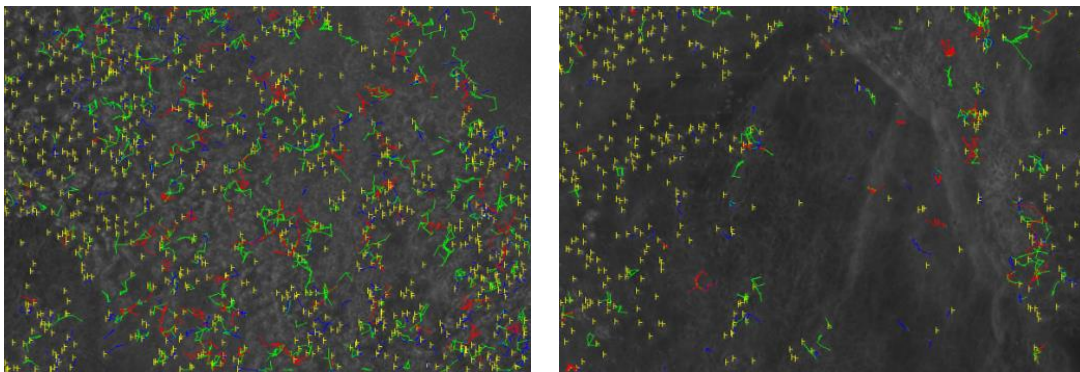


Figura 18: Contenido de la esfera captado con el programa ISAS Proiser

El líquido en suspensión, así como el contenido de la capsula liberado por aplastamiento, fue observado con el microscopio y los espermatozoides encontrados fueron evaluados mediante el programa ISAS Proiser (motilidad y concentración) (Figura 18)

4.3 Estudio estadístico

En las experiencias preliminares se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism 7 para representar gráficamente las distintas combinaciones realizadas. El número de repeticiones no permitió hacer un estudio estadístico en busca de diferencias significativas. En la segunda experiencia con máquina, se hicieron tres repeticiones y para el estudio se utilizó el paquete estadístico SPSS 19. Se realizó un GLM de medias repetidas y para detectar diferencias en variables con más de dos categorías se realizó un post hoc mediante el test de Duncan

Los factores de variación considerados fueron bola, liquido, concentración de citrato sódico en el medio, tiempo (24 h y 96 h) y tipo de conservación (refrigeración y calentamiento a 37°C).

4.5 Diseño experimental

La parte experimental más compleja de este trabajo fue la que se realizó en las tres últimas experiencias con la máquina encapsuladora B-395 (BUCHI) + Citrato Sódico (Figura 19)

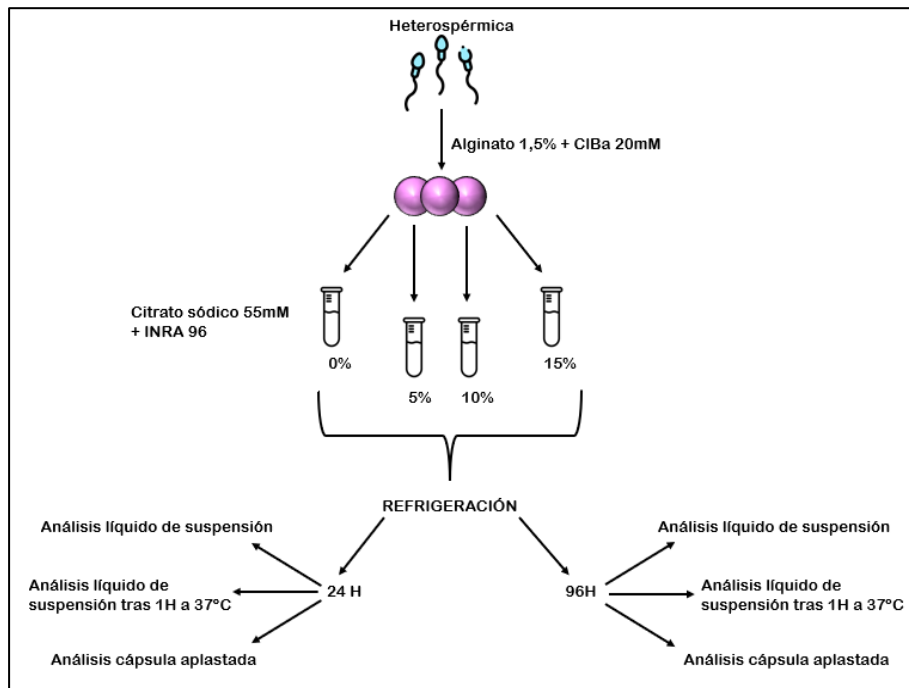


Figura 19: Elaboración propia donde se representa el experimento final

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para realizar la puesta a punto del proceso de microencapsulación de espermatozoides en la especie equina, se realizaron un conjunto de pruebas preliminares que nos permitieran conocer aquellos factores que podían influir en el tratamiento de los espermatozoides a lo largo del proceso, así como el efecto de los componentes utilizados en la microencapsulación antes de que se pudiera hacer uso de la máquina de encapsulación B-395 Pro (BÜCHI). Debido a la logística de la instalación de la encapsuladora, el aprendizaje de su uso, así como su siguiente puesta en marcha, hubo un retraso de tiempo hasta que pudo ser utilizada de forma eficiente. En este punto queremos agradecer la ayuda de *M^a Jesús Serrano*, técnico especialista del instituto IA2 (Instituto Agroalimentario de Aragón), que nos proporcionó una ayuda inestimable

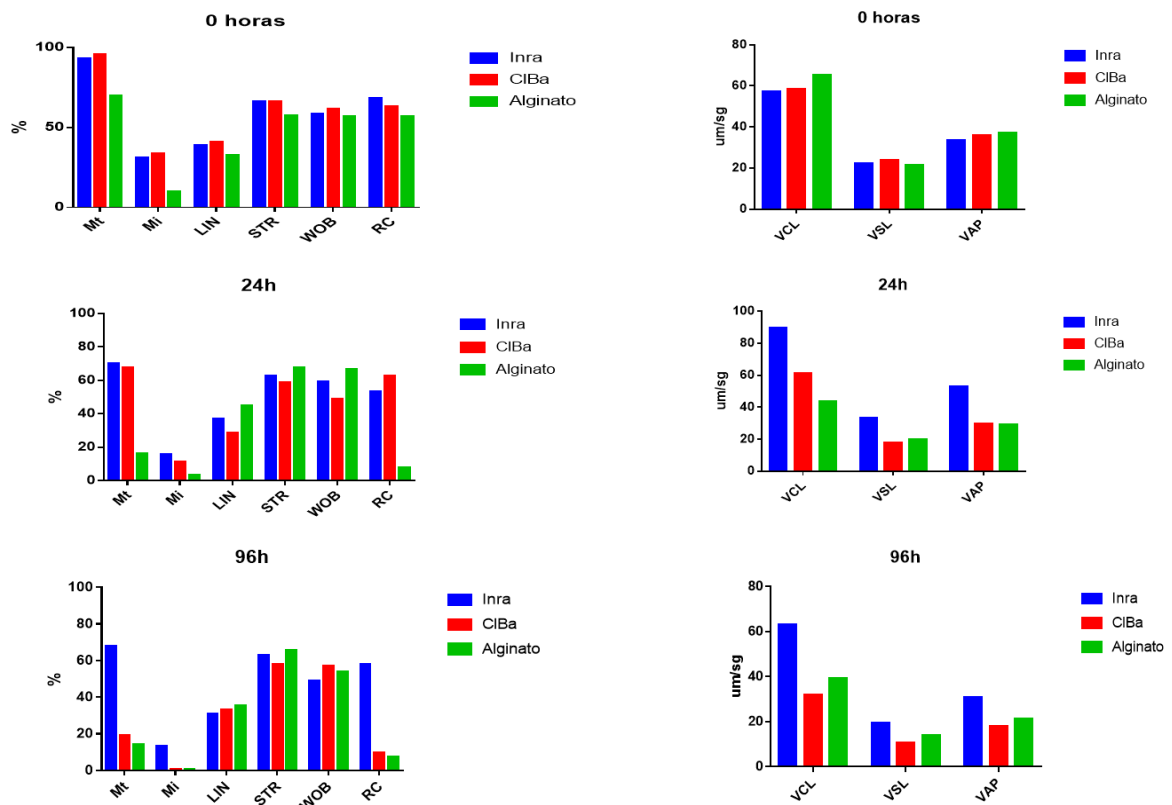
5.1 Efecto del ClBa y Alginato al 1,5% en la calidad espermática.

En esta prueba preliminar se hizo uso de una muestra heterospérmica de dos caballos. Esta fue dividida en dos, para exponer una al contacto con alginato de baja densidad al 1,5% y otra con

ClBa 20mmM. Estas muestras fueron analizadas en base a sus parámetros de motilidad a tiempo 0, 24h y 96h en refrigeración (4°C)

Al analizar los resultados obtenidos mediante el programa GraphPad Prism 7.00 y presentarlos gráficamente, pudimos observar que el alginato obtenía peores resultados a lo largo del tiempo en cuanto a los parámetros de motilidad. También se pudo ver que el ClBa producía una reducción de motilidad total (Mt) e individual (Mi) considerable a las 96h, pero que a tiempo 0 tenía una mayor velocidad (VCL, VAP y VSL) y motilidad respecto al semen con INRA. (Gráfica 1)

Estos resultados concuerdan con los ya expuestos por Pruiß et al., (2022) donde la exposición de una muestra espermática de 50×10^6 espermatozoides/mL a alginato 1% y ClBa, producía un descenso considerable de la motilidad a las 96 horas. Por otro lado, se confirma, según los estudios de Faustini (2011) realizados con semen porcino, que el contacto de espermatozoides con ClBa tras una hora produce un aumento de la velocidad y motilidad de los mismos, pudiendo producir más tarde un desgaste de energía que justifique la caída de motilidad de los mismos a las 96 horas.



Gráfica 1: Efecto del ClBa (20mmM) y Alginato 1,5% sobre la motilidad espermática a las 24 y 96 horas

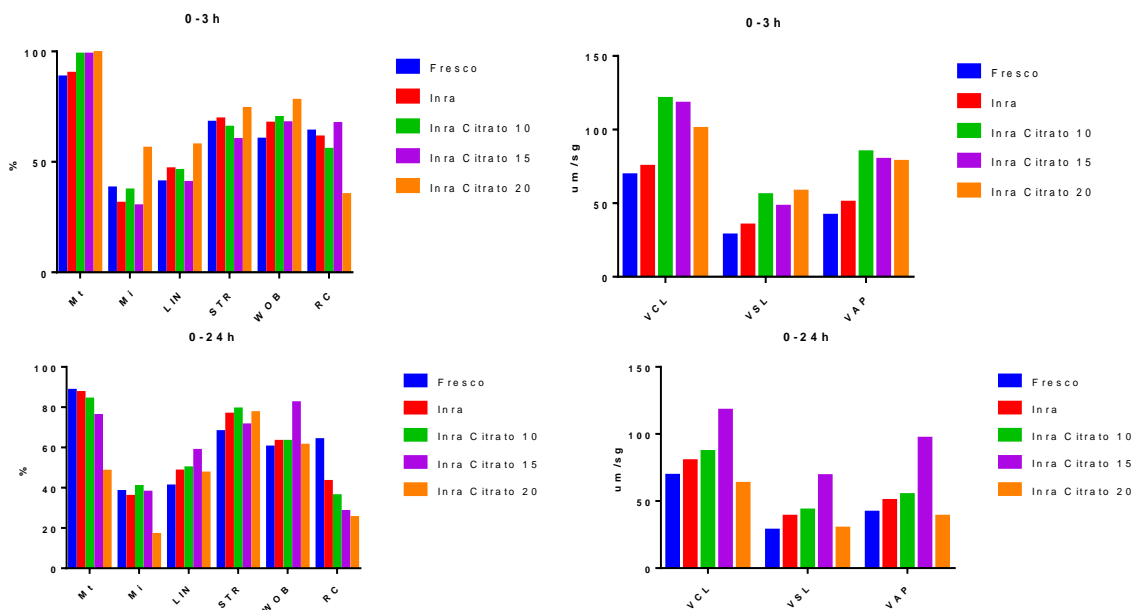
Esto nos llevo a rechazar en las siguientes experiencias el mezclar directamente los espermatozoides con el alginato y el ClBa, y optar por realizar cápsulas tipo “core-shell” que aislaran a los espermatozoides de estos componentes.

5.2 Efecto del Citrato de sodio en la calidad espermática

En la siguiente prueba preliminar se decidió evaluar el efecto del citrato sódico que posteriormente sería utilizado para la degradación de las cápsulas, sobre una muestra heterospérmica a diferentes concentraciones de producto (0%, 10%, 15% y 20%) en refrigeración (4°C). Se decidió usar este componente a esta concentración ya que Défaz, Gavilanes y Moreira (2017) obtuvieron resultados positivos para la degradación de cápsulas de alginato mediante este método, así como Perteghella et al., (2017) que consiguieron degradar cápsulas de semen bovino mediante esta técnica.

Los resultados que obtuvimos hacen referencia a un aumento de la velocidad espermática en las primeras horas tras la adición del citrato de sodio (Gráfica 2). Cabe destacar que en caso del citrato de sodio al 20% en la evaluación de la motilidad y calidad de movimiento a las 24 horas se producía un descenso de estos parámetros, coincidente con los resultados ya obtenidos por Swanson (1949), donde concentraciones mayores de citrato de sodio producían un descenso de la motilidad y mayor mortalidad en los espermatozoides bovinos tras 72h en refrigeración (5°C).

Es por este motivo que se decidió prescindir del uso de citrato de sodio al 20% para la degradación de las cápsulas en las siguientes experiencias y sustituirlo por el 5%.

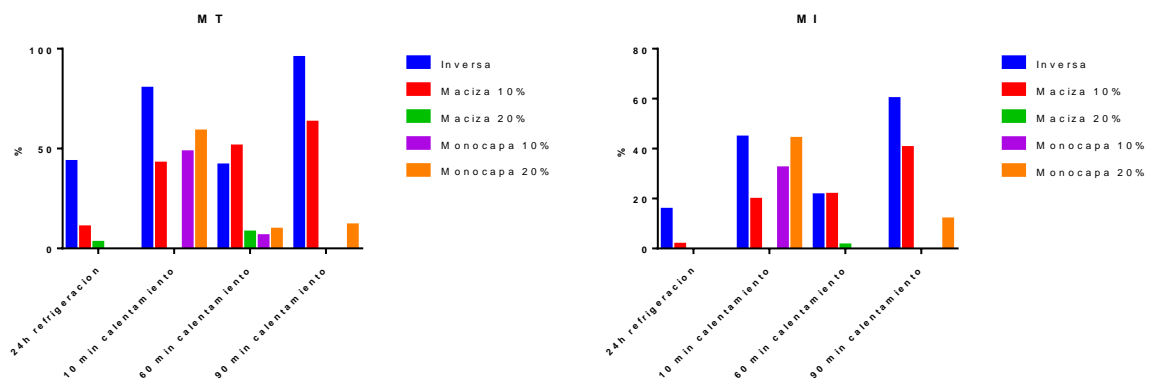


Gráfica 2: Efecto del citrato de sodio a diferentes % sobre la motilidad espermática a las 3 y 24 horas.

5.3 Experiencia manual de encapsulación

Durante la experiencia manual se hicieron varios tipos de cápsulas: macizas, monocapa e inversas. Las dos primeras resultaban en cápsulas solidas tanto en el interior como el exterior, y las inversas presentaban un núcleo de consistencia liquida (“core-shell”). Estas cápsulas fueron conservadas en refrigeración (4°C) durante 24h, y pasado este tiempo se analizó el líquido de suspensión y se decidió someterlas a 37°C durante 10, 60 y 90 minutos donde también se comprobó la posible presencia de espermatozoides en el líquido de suspensión. A los 90 minutos se decidió presionar las cápsulas para liberar su contenido y analizarlo.

Según los resultados obtenidos (Gráfica 3), las cápsulas de tipo inverso presentaban una mejor motilidad respecto a las demás. Esto concuerda con los resultados de la investigación realizada por Pruß et al., (2022) donde las cápsulas macizas obtenían peores resultados de motilidad respecto a las cápsulas “core-shell” compuestas tanto por ClBa como ClCa en ese caso.



Gráfica 3: Efecto de los diferentes tipos de cápsulas sobre la motilidad en refrigeración y a 37°C a diferentes tiempos

5.4 Primera experiencia con máquina encapsuladora B-395 Pro (BÜCHI)

La primera experiencia que se realizó con la máquina encapsuladora se hizo con el objetivo de comprobar los parámetros indicados por el manual (diámetro de boquilla, velocidad de flujo, intervalo de frecuencia, amplitud y presión de aire) y que estos eran los adecuados para la formación de cápsulas. No se obtuvieron unos buenos resultados en cuanto a la morfología de las cápsulas, pero aun así se decidió analizar los espermatozoides que pudieran haber quedado dentro de estas aun estando mal estructuradas.

Estas cápsulas fueron sometidas a diferentes combinaciones de condiciones de conservación, tiempo e incubación, para comprobar su mantenimiento y posible liberación tras someterse a 37°C que sería la temperatura teórica intra-útero de la yegua.

Los resultados que se obtuvieron (Tabla 7) mostraron que el número de espermatozoides dentro de las cápsulas era reducido, pero a las 48h a los 37°C si se pudieron observar algunos

espermatozoides libres y motiles en el medio de suspensión. Esto concuerda con lo observado en los estudios citados por Faustini (2011) donde se analizaron los acromosomas no reactivos de los espermatozoides porcinos liberados espontáneamente de las cápsulas tras 24h a 38°C, por lo que se podría concluir que si es posible la liberación de espermatozoides de las cápsulas de forma espontánea. También se observó un descenso de la motilidad respecto al control de los espermatozoides liberados tras aplastar las cápsulas, concordando con los resultados obtenidos en los experimentos realizados por Thiangthientham et al. (2020) con semen ovino.

Tabla 7: Valores obtenidos de los espermatozoides de la primera experiencia con máquina encapsuladora

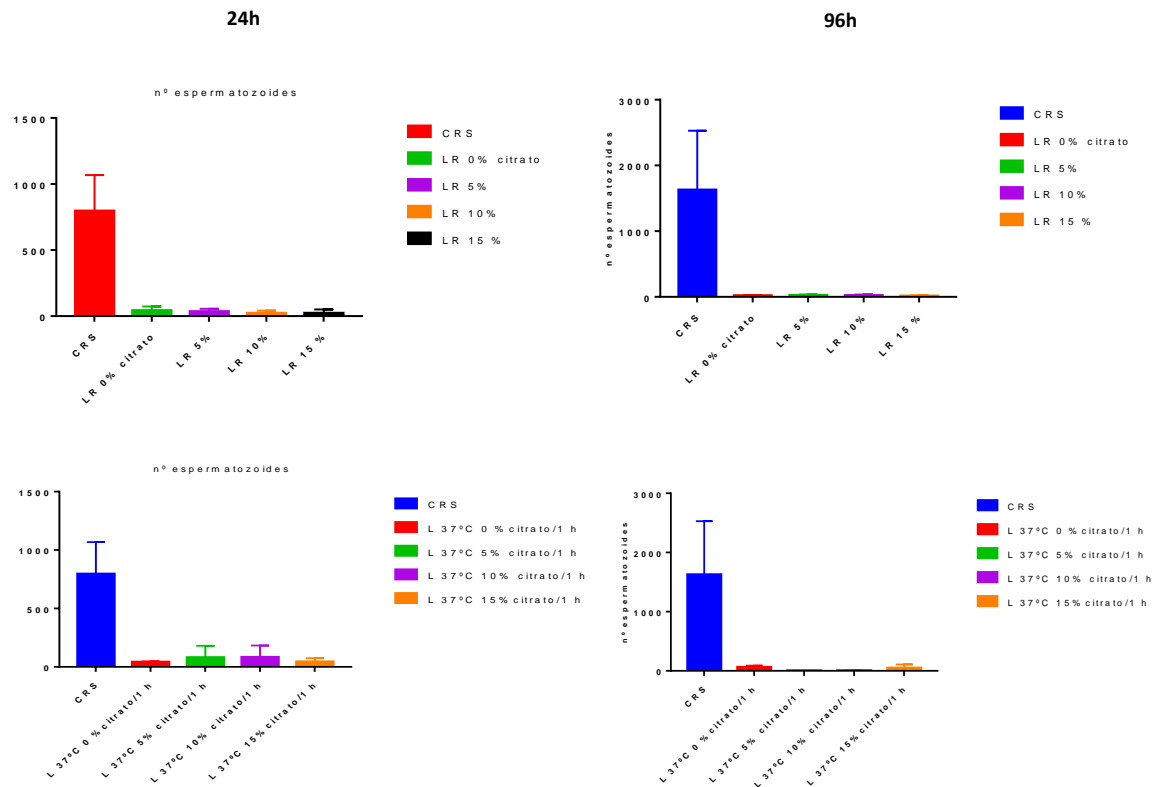
Primer uso de la maquina: CIBa en INRA; alginato 1,5 %					
T° Refrigeración		Mt	MI	Recorridos Circulares	n° spz
24 h	Bolas	26,40	1,50	20,90	2900,00
48h	Bola refrigerada	36,00	16,00	28,30	25,00
	Liquido: 24h / 37°C	10,00	5,00	5,00	20,00
	Bola: 24 h/ 37°C	29,80	0,90	24,90	1071,00
72 h	Bola refrigerada	21,40	1,30	17,2	528,00
	Liquido refrigerado	1,70	0,00	1,7	59,00
	Bola: 72 h /37°C	6,50	0,00	4	907,00
	Bola: Refrigeración 48 h e incubada 24 h/37°C	27,60	1,40	19,2	1144,00

5.5 Experiencias con máquina encapsuladora B-395 Pro (BÜCHI) y Citrato sódico

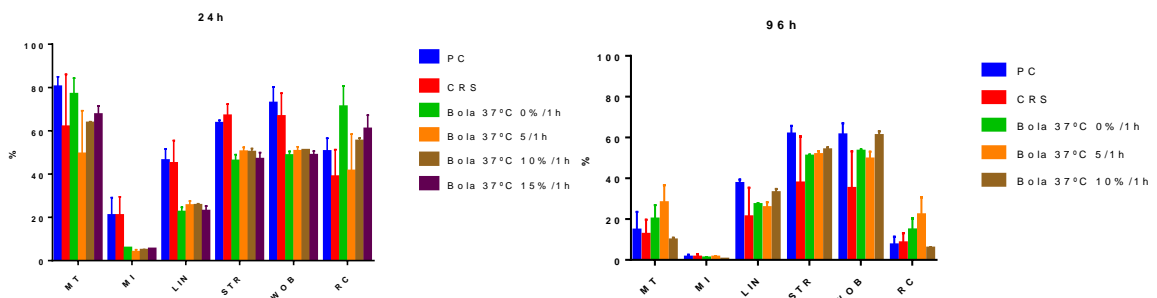
Tras la primera experiencia con la máquina encapsuladora se modificaron los parámetros de esta para conseguir cápsulas mejor estructuradas morfológicamente hablando, además, se decidió poner en contacto posteriormente las cápsulas resultantes con citrato de sodio tribásico dihidratado a diferentes concentraciones (0%, 5%, 10% y 15%) para conseguir la liberación más eficiente de los espermatozoides. Las cápsulas junto con las diferentes concentraciones de citrato fueron conservadas en refrigeración (4°C) hasta las 96h. Se analizó su contenido, así como líquido de suspensión con el objetivo de ver su capacidad de liberación de espermatozoides exponiéndolas a 37°C durante una hora o a lo largo del proceso de refrigeración.

Los resultados que se obtuvieron demostraban que en el líquido de suspensión en refrigeración a 4°C y posteriormente a 37°C en ambos tiempos, la presencia de espermatozoides era muy escasa (Gráfica 4). Además, se observó que tanto en las cápsulas como en el líquido de suspensión la motilidad de los espermatozoides de las cápsulas expuestas a las concentraciones de 10% y 15% de citrato de sodio estaba más reducida a las 24h. Estos resultados concuerdan

con los expuestos por Thiangthientham et al., (2020) donde tras 24h encapsulados en cápsulas de ClBa y alginato, los espermatozoides ovinos en refrigeración presentaban un descenso de los valores de motilidad. Por último, se pudo comprobar que a las 96h la motilidad de los espermatozoides encapsulados era mayor que la del control (Gráfica 5), cosa que concuerda con lo ya observado por Pruß et al. (2022).



Gráfica 4: Número de espermatozoides en LR (líquido de suspensión) en refrigeración y a 37°C (1h) a las 24 y 96 horas.



Gráfica 5: Motilidad del CRS (control) y espermatozoides dentro de la bola tras 1h a 37°C a las 24 y 96 horas.

Al realizar GLM introduciendo los factores: Formato (control, bola y líquido de suspensión), concentración de citrato (0%, 5%, 10% y 15%), temperatura de conservación (4°C y 37°C) y tiempo (24h y 96h) observamos que se obtuvieron resultados significativos en los parámetros de Motilidad individual (MI) con $p=0,036$ en formato, lo que coincide con los estudios realizados por Perteghella et al., (2017) en la especie bovina. Ellos encontraron valores significativos ($p<0,5$) en cuanto al efecto del tratamiento (espermatozoides encapsulados y no encapsulados) respecto a la MI. Pruß et al., (2022), concluyó que la motilidad de los espermatozoides equinos

encapsulados en capsulas tipo “core-shell” era menor que el control, pero esta se mantuvo en valores similares a lo largo de todo el almacenamiento hasta las 96 horas (no se determinaron valores diferentes estadísticamente significativos). Otros resultados significativos se encontraron en los parámetros de: la Velocidad curvilínea (VCL) con $p=0,004$ en formato, Velocidad rectilínea (VSL) con $p=0,003$ en formato, Índice de linealidad (LIN) con $p=0,047$ en concentración de citrato y $p=0,040$ en tiempo, Índice de rectitud (STR) con $p=0,009$ en concentración de citrato, Índice de oscilación (WOB) con $p=0,025$ en concentración de citrato, y por último, en número de espermatozoides con $p=0,001$ en formato.

En aquellos factores que mostraban significación se realizó un post hoc mediante el test de Duncan, de esta manera comprobamos que en el parámetro MI, tanto el formato bola como el líquido de suspensión (4,142 y 0,653 %) presentaban valores inferiores al control (9,255%) que correspondían a las muestras espermática diluidas en INRA96® y conservadas hasta las 96 horas en refrigeración.

La VCL, el formato bolo y el control no presentaron diferencias entre sí (48,556 y 50,050 %) presentando diferencias en relación con el líquido de suspensión (16,763%). VSL, el control (22,668%) presentaba diferencias en relación con el formato bola (12,192) y líquido en suspensión líquido de suspensión (6,724), donde la bola y el líquido no presentaban diferencias respecto a la velocidad rectilínea.

El parámetro LIN se vio afectada por el factor concentración de citrato en el medio. El estudio puso en evidencia que este factor provocaba un descenso en este parámetro cuando el medio de suspensión estaba adicionado de citrato independientemente de la concentración. Así los valores medios fueron al 0% (38,431%), 5% (25,631%), 10% (23,390%) y 15% (24,385%). Resultados similares se observaron en el parámetro STR donde la ausencia de citrato en el medio (61,364) presentaba valores superiores que cuando se adicionaba en el mismo en las diferentes concentraciones, 5% (44,816%), 10% (39,756%) y 15% (37,323%) no mostrando diferencias entre las tres concentraciones en lo que respecta al índice de rectitud. El parámetro WOB, al igual que los anteriores parámetros, el único factor que presentaba diferencias era la concentración de citrato donde la ausencia como el 5% presentaban los valores más altos (61,085% y 60,680%) con relación a lo observado a 10% y 15% (43,685% y 37,944%).

El número de espermatozoides mostro diferencias significativas entre los tres formatos, así el formato de bola presentaba valores superiores (1277,500) con relación al control (809,146) y al líquido de suspensión (40,917).

Muchos de los artículos consultados hacen análisis de las reacciones acrosomales e integridad de membrana de los espermatozoides respecto a este tipo de encapsulación, pruebas no realizada en el trabajo. No obstante indicar que, en cuanto a la integridad de membrana, Spinaci, et al., (2013) observan efectos significativos del tratamiento (encapsulado/no encapsulado) y tiempo en los espermatozoides porcino, teniendo la muestra control valores de integridad de membrana superiores respecto a los encapsulados. Respecto a los acrosomas no reactivos, Faustini (2011) observó un mayor porcentaje de los mismos en el semen encapsulado porcino respecto al no encapsulado (96% en espermatozoides encapsulados frente al 85% en el semen libre, $p < 0,01$). Esto resultados nos indican que tras la puesta a punto se deberán abordar mejoras en los medios utilizados e incluso valorar la adición de sustancias antioxidantes por su efecto protector de membrana.

6.- CONCLUSIÓN

Tras la realización de este trabajo, cuyo objetivo era la puesta a punto del proceso de encapsulación de espermatozoides equinos, hemos podido concluir que:

- 1.-El alginato de sodio de baja densidad al 1% y el CIBa 20mM permiten formar microcápsulas de tipo “core-shell” para la conservación de espermatozoides en la especie equina utilizando la encapsuladora B-395 Pro (BÜCHI).
- 2.- El uso de citrato de sodio a diferentes concentraciones (5%, 10% y 15%) disuelto en el medio de suspensión, no es capaz de disolver las cápsulas de forma eficaz, por lo que no hubo una liberación óptima de espermatozoides al medio de suspensión, ni en refrigeración (4°C) ni tras la exposición a 37°C.
- 3.-El mantenimiento en refrigeración de espermatozoides microencapsulados durante 96 horas nos permite afirmar que este sistema de preservación los mantiene vivos dentro de las microcapsulas, lo que nos abre nuevas posibilidades en los sistemas de conservación, lo que permitirá reducir el número de inseminaciones artificiales y costes de tratamientos de inducción de la ovulación.

Cabe destacar que, al encontrarnos en una fase de puesta a punto de este proceso, sería recomendable realizar más pruebas y réplicas con la máquina para conseguir resultados óptimos en cuanto a morfología de las cápsulas y calidad del contenido espermático. Esto se podría conseguir, por ejemplo, aumentando el bombeo de la máquina para que los espermatozoides pasen en mayor cantidad al interior, hacer dosis más concentradas y evitar los tiempos de espera largos durante el manejo de las muestras seminales.

CONCLUSIONS

After carrying out this work, the objective of which was to fine-tune the process of encapsulation of equine spermatozoa, we have been able to conclude that:

- 1.- 1% low density sodium alginate and 20mM ClBa allow the formation of "core-shell" type microcapsules for the preservation of spermatozoa in the equine species using the B-395 Pro encapsulator (BÜCHI).
- 2.- The use of sodium citrate at different concentrations (5%, 10% and 15%) dissolved in the suspension medium is not able to dissolve the capsules effectively, so there was not an optimal release of spermatozoa to the suspension medium neither under refrigeration (4°C) nor after exposure to 37°C.
- 3.- The maintenance of microencapsulated spermatozoa in refrigeration for 96 hours allows us to affirm that this preservation system keeps them alive inside the microcapsules, which opens up new possibilities in the conservation systems that will allow us to reduce the number of artificial inseminations and the costs of ovulation induction treatments.

It should be noted that, as we are in the fine-tuning phase of this process, it would be advisable to carry out more tests and replicates with the machine to achieve optimal results in terms of capsule morphology and sperm content quality. This could be achieved, for example, by increasing the pumping of the machine so that the spermatozoa pass into the interior in greater quantity, making more concentrated doses and avoiding long waiting times during the handling of the seminal samples.

7.- VALORACIÓN PERSONAL

La realización de este Trabajo de Fin de Grado me ha permitido ahondar en el mundo y la dinámica de la investigación de la reproducción animal, de la cual espero formar parte en un futuro. Desarrollando numerosas competencias exigidas en este sector, como habilidades de tipo transversal como son la búsqueda bibliográfica, comprensión de la literatura científica y posterior análisis de resultados. He podido formarme en numerosas técnicas que de manera rutinaria se realizan en un laboratorio de reproducción, como son la obtención de muestras seminales y su posterior procesado, así como la realización de técnicas hoy en día en desarrollo como es la encapsulación seminal. Además, he tenido la oportunidad de realizar la puesta a punto de la máquina encapsuladora de última generación adquirida por el Instituto Agroalimentario de Aragón y que podría resultar de utilidad para la continuación del desarrollo de esta técnica o de otras. Como conclusión general, podría decir que este trabajo es el inicio de

lo que espero que sea mi carrera como investigadora en el ámbito de la reproducción y del cuál siento que he aprendido enormemente tanto académica como personalmente.

8.- AGRADECIMIENTOS

Finalmente me gustaría agradecer a mi tutora Lydia Gil Huerta, por su apoyo y confianza incondicional durante todo el desarrollo de este trabajo. A Noelia González Orti por su ayuda y cariño. A M^a Jesús Serrano por su tiempo durante todas las experiencias con la máquina encapsuladora. A Lydia Horndler e Ignacio de Blas Giral por su ayuda con la comprensión y desarrollo de la estadística. Y, por último, no querría olvidarme de todos los profesores de la unidad de reproducción los cuales me han acogido y ayudado de una forma excepcional.

9.-BIBLIOGRAFÍA

Amann, R. y Pickett, B. (1987). "Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa". *Journal of Equine Veterinary Science*, 7(3), pp. 145-173. DOI: 10.1016/S0737-0806(87)80025-4

Aurich, C. (2008). "Recent advances in cooled-semen technology". *Animal Reproduction Science*, 107(3-4), pp. 268-275. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.04.015

Aurich, J. E. (2012). "Artificial Insemination in Horses More than a Century of Practice and Research". *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(8), pp. 458-463. DOI: 10.1016/j.jevs.2012.06.011

Avila Portillo, L.M., Madero, J.I., Lopez Bacter, C., Leon Bacter, M.F., Acosta, L., Gomez, C., Delgado, L.G., Gomez, C., Lozano, J.M. y Reguero, M.T (2006). "Fundamentos de criopreservación". *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), pp. 291-300.

Barker, C. y Gandier, J. (1957). "Pregnancy In A Mare Resulting From Frozen Epididymal Spermatozoa". *Comparative Medicine and Veterinary Science*, 21(2), pp. 47-51.

Batellier, F., Magistrini, M., Fauquant, J. y Palmer, E. (1997). "Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa". *Theriogenology*, 48(3), pp. 391-410. DOI: 10.1016/S0093-691X(97)00250-1

Bennacef, C., Desobry-Banon, S., Probst, L. y Desobry, S. (2021). "Advances on alginate use for spherification to encapsulate biomolecules". *Food Hydrocolloids*, Volumen 118. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2021.106782

- Braun, J., Sakai, M., Hochi, S. y Oguri, N. (1994). "Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing". *Theriogenology*, 41(4), pp. 809-818. DOI: 10.1016/0093-691x(94)90497-7
- Brooks, D. (1983). "Epididymal Functions and their Hormonal Regulation". *Australian Journal of Biological Sciences*, 36(3), pp. 205-221. DOI: 10.1071/bi9830205
- Bruemmer, J. E. (2006). "Collection and Freezing of Epididymal Stallion Sperm". *Vet Clin Equine*, 22(3), pp. 677-682. DOI: 10.1016/j.cveq.2006.08.007
- BÜCHI Labortechnik AG (2016). Manual de instrucciones (Original) Encapsulator B-395 Pro. https://assets.buchi.com/image/upload/v1605790985/pdf/TechnicalDatasheet/TDS_11595507_B-390_B-395.pdf
- Busch, W. y Waberski, D. (2007). Manual de inseminación artificial de los animales domésticos y de explotación zootécnica. Editorial Acribia ed. Stuttgart: Schattauer GmbH.
- Cary, J. A., Madill, S., Farnsworth, K., Hayna, J., Duoos, L. y Fahning, M. (2004). "A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions". *The Canadian Veterinary Journal.*, 45(1), pp. 35-41.
- Cazales Penino, N., Estradé, M. J. y Costa Mattos, R. (2020). "Inseminación artificial con semen congelado equino: reacción inflamatoria, transporte espermático y técnica de inseminación". *Veterinaria (Montev.)*, 56(214), pp. 1-8. DOI: 10.29155/vet.56.214.2.
- Consuegra, C., Crespo, F., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., Sánchez-Calabuig, M.J., Beltrán-Breña, P., Pérez-Cerezales, S., Rizos, D. y Hidalgo, M. (2020). "Fertilizing capacity of vitrified stallion sperm assessed utilizing heterologous IVF after different semen warming procedures". *Animal Reproduction Science*, Volumen 223. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106627
- 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), pp. 14-41. DOI:10.21929/abavet2018.83.1.
- Dacheux, J.L., Gatti, J. L. y Dacheux, F. (2003). "Contribution of Epididymal Secretory Proteins for Spermatozoa Maturation". *Microscopy research and technique*, 61(1), pp. 7-17. DOI: 10.1002/jemt.10312
- De la Cueva, F., Rigau, T., Bonet, S., Miró, J., Briz, M. y Rodríguez-Gil, J. (1997). "Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effects of Ouabain". *Theriogenology*, 47(3), pp. 765-784. DOI: 10.1016/s0093-691x(97)00033-2

- Défaz Gavilanes, A. y Moreira Cálix, J. (2017). "Evaluación de alginato de sodio en la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* en yogur sin sabor". Título de Ingenieros en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura. Zamorano.
- Diaz-Jimenez, M., Dorado, J., Pereira, B. y Ortíz, I. (2018). "Vitrification in straws conserves motility features better than spheres in donkey sperm". *Reproduction in Domestic Animals*, 53(4), pp. 56-58. DOI: 10.1111/rda.13256
- Diaz, N., 2010. "Características del eyaculado equino y variaciones estacionales. Revisión bibliográfica". *Ciencia y Tecnología Ganadera*, 4(1), pp. 23-30.
- Dubey, R., Shami, T. y Bhasker Rao, K. (2009). "Microencapsulation Technology and Applications". *Defence Science Journal*, 59(1), pp. 82-92.
- Ecot, P., Decuadro-Hansen, G., Delhomme, G. y Vidament, M. (2005). "Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing" *Animal Reproduction Science*, 89(1-4), pp. 245-248.
- Faustini, M. (2011). "New Aspects of Boar Sperm Encapsulation". *Reproduction in Domestic Animals*, 46(2), pp. 52-54. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01868.x
- Faustini, M., Vigo, D., Spinaci, M., Galeato, G. y Torre, ML. (2012). "Enhancing Insemination Performance in Pigs Through Controlled Release of Encapsulated Spermatozoa". *Reproduction in Domestic Animals*, 47(4), pp. 353-358. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2012.02098.x
- Gadella, B., Rathi, R., Brouwers, J., Stout, T. y Colenbrander, B. (2001). "Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm". *Animal Reproduction Science*, 68(3-4), pp. 249-265. DOI: 10.1016/S0378-4320(01)00161-0
- Gamboa, S., Rodrigues, A., Henriques, L., Batista, C. y Ramalho Santos, J. (2010). "Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa". *Theriogenology*, 73(7), pp. 950-958. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2009.11.023
- Gerlach, T. y Aurich, J. E. (2000). "Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster". *Animal Reproduction Science*, 58(3-4), pp. 197-213. DOI: 10.1016/s0378-4320(99)00093-7
- Ghadeer Sabah , B. y Falah Hasan, B. (2021). "Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders". *Vet World*, 14(5), pp. 1220-1233. DOI: 10.14202/vetworld.2021.1220-1233

- Gibbs, F., Kermasha, S., Alli, I. y Mulligan, C. (1999). "Encapsulation in the food industry: a review". *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3), pp. 213-224. DOI: 10.1080/096374899101256
- Gilmore, J., Liu, J., Gao, D. y Critser, J. (1997). "Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa". *Human Reproduction*, 12(1), pp. 112-118. DOI: 10.1093/humrep/12.1.112
- Gouin, S. (2004). "Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends". *Trends in Food Science & Technology*, 15(7-8), pp. 330-347. DOI: 10.1016/j.tifs.2003.10.005
- Graham, J. K. (1996). "Cryopreservation of Stallion Spermatozoa". *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 12(1), pp. 131-147. DOI: DOI: 10.1016/s0749-0739(17)30300-0
- Hammerstedt, R., Graham, J. y Nolan, J. (1990). "Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive". *Andrology*, 11(1), pp. 73-88.
- Hernández Avilés, C. y Love, C. (2021). "Cool-stored and frozen-thawed stallion semen: thoughts on collection, evaluation, processing, insemination, and fertility". *Clinical Theriogenology*, 13, p. 280.
- Hu, C., Lu, W., Mata, A., Nishinari, K. y Fang, Y. (2021). "Ions-induced gelation of alginate: Mechanisms and applications". *International Journal of Biological Macromolecules*, 177(1), pp. 578-588. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.086
- i Roig Miro, J., Muñoz, F., Piedrafita, J. y Quintero Moreno, A., (2004). "Prediction of the day of ovulation in mares through physiological parameters measured during estrous". *Revista Científica*, XIV(1), pp. 1-8.
- Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I., Dessole, S. y Nawroth, F. (2003). "Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success". *Reproductive BioMedicine Online*, 6(2), pp. 191-200. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61710-5](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61710-5)
- Isachenko, E., Isachenko, V., Weiss, J.M., Kreienberg, R., Katkov, I., Schulz, M., I Lulat, A., Risopatrón, I. y Sánchez, R. (2008). "Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose". *Reproduction*, 136(2), pp. 167-173. DOI: 10.1530/REP-07-0463
- Jörg, E. (2012). "Artificial Insemination in Horses More than a Century of Practice and Research". *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(8), pp. 458-463. DOI: 10.1016/j.jevs.2012.06.011
- Katila, T. (1997). "Procedures for handling fresh stallion semen". *Theriogenology*, 48(7), pp. 1217-1227. DOI: 10.1016/s0093-691x(97)00354-3

- Little, T. V. y Reed Holyoak, G. (1992). Reproductive anatomy and physiology of the stallion. *Veterinary clinics of north america: equine practice*, 8(1), pp. 1-29. DOI: 10.1016/s0749-0739(17)30464-9
- Loomis, P. R. (2022). "Applied Animal Andrology: Stallion. En: P. J. Chenoweth & S. P. Lorton, edits. *Manual of Animal Andrology*. Madison: CABI, p. 135.
- Masuda, H., Nanasaki, S. y Chiba, Y. (2004). "A New Extender for Preservation of Equine Spermatozoa at 5°C". *Journal of equine science*, 15(1), pp. 1-5. DOI: 10.1294/jes.15.1
- McGann, L. E. (1978). "Differing Actions of Penetrating and Nonpenetrating Cryoprotective Agents". *Cryobiology*, 15(4), pp. 382-390. DOI: 10.1016/0011-2240(78)90056-1
- Miller, C. (2008). "Optimizing the use of frozen–thawed equine semen". *Theriogenology*, 70(3), pp. 463-468. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.04.037
- Morris, L., Tiplady, C. y Allen, W. (2002). "The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse". *Theriogenology*, 58(2), pp. 643-646. DOI: 10.1016/S0093-691X(02)00742-2
- Mottershead, J. (2000). "Artificial insemination". Article series for Horse Daily Planner. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/305317394_Equine_Artificial_Insemination
- Murua, A., Portero, A., Orive, G., Hernandez, R., de Castro, M. y Pedraz, J.L. (2008). "Cell microencapsulation technology: Towards clinical application". *Journal of Controlled Release*, 132(2), pp. 76-83. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.08.010
- Nava Reyna, E., Michelena Alvarez, G., Lliná, A. y Martínez Hernández, J. (2015). "Microencapsulación de componentes bioactivos". *Investigación y Ciencia*, 23(66), pp. 64-70.
- Nebel, R., Bame, J., Saacke, R. y Lim, F. (1985). "Microencapsulation of bovine spermatozoa". *Journal of Animal Science*, 60(6), pp. 1631-1639. DOI: 10.2527/jas1985.6061631x
- Olabisi, R. (2014). "Cell microencapsulation with synthetic polymers". *Journal of Biomedical Materials Research*, 103(2), pp. 846-859. DOI: 10.1002/jbm.a.35205
- Olaciregui, M. y Gil, L. (2016). "Freeze-dried spermatozoa: A future tool?". *Reproduction in Domestic Animals*, 51(3), pp. 1-7. DOI: 10.1111/rda.12838
- Perteghella, S., Gaviraghi, A., Cenadelli, S., Bornaghi, V., Galli, A., Crivelli, B., Vigani, B., Vigo, D., Chlapanidas, T., Faustini, M. y Torre, M.L. (2017). "Alginate encapsulation preserves the quality and fertilizing ability of Mediterranean Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*) and Holstein Friesian (*Bos taurus*) spermatozoa after cryopreservation". *Journal Veterinary Science*, 18(1), pp. 81-88. DOI: 10.4142/jvs.2017.18.1.81

- Perteghella, S., Vigani, B., Crivelli, B., Spinaci, M., Galeati, G., Bucci, D., Vigo, D., Torre, ML. y Chlapanidas, T. (2015). "Sperm Encapsulation from 1985 to Date: Technology Evolution and New Challenges in Swine Reproduction". *Reproduction in Domestic Animals*, 50(2), pp. 98-102. DOI: 10.1111/rda.12538
- Pickett, B. y Amann, R. (1987). "Extension and storage of stallion spermatozoa: a review". *Journal of Equine Veterinary Science*, 7(5), pp. 289-302. DOI: 10.1016/S0737-0806(87)80049-7
- Prien, S. y Lacovides, S. (2016). "Cryoprotectants & Cryopreservation of Equine Semen: A Review of Industry Cryoprotectants and the Effects of Cryopreservation on Equine Semen Membranes". *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 3(1), pp. 1-8. DOI: 10.15406/jdvar.2016.03.00063
- Pruß, D., Oldenhof, H., Wolkers, W. F. y Sieme, H. (2022). "Alginate encapsulation of stallion sperm for increasing". *Animal Reproduction Science*, Volumen 238. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2022.106945
- Pugliesi, G., de Carvalho, G., Macedo, D., Gama, P., Pereira, M., Reis y R., Monteiro, J. (2012). "Viability and fertility of cooled equine semen diluted with skimmed milk orglycine egg yolk-based extenders". *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(12), pp. 2411-2417. DOI: 10.1590/S1516-35982012001200005
- Restrepo, G., Varela, E., Esteban, J., Gómez, J. y Rojas, M. (2019). "Freezing, vitrification, and freeze-drying of equine spermatozoa: Impact on mitochondrial membrane potential, lipid peroxidation, and DNA integrity". *Journal of equine veterinary science*, Volumen 72, pp. 8-15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.10.006>
- Rodriguez Artiles, I. (2010). "Inseminacion artificial o monta dirigida en la yegua". *PortalVeterinaria*. Disponible en: <https://www.portalveterinaria.com/articoli/articulos/19585/inseminacion-artificial-o-monta-dirigida-en-la-yegua>.
- Shah, S., Nagano, M., Yamashita, Y. y Hishinuma, M. (2010). "Microencapsulation of canine sperm and its preservation at 4 °C". *Theriogenology*, 73(5), pp. 560-567. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2009.09.034
- Sostaric, E., Aalberts, M., Gadella, B. y Stout, T. (2008). "The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm". *Animal Reproduction Science*, 107(3-4), pp. 237-248. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.04.011

- Spinaci, M., Chlapanidas, T., Bucci, D., Vallorani, C., Perteghella, S., Lucconi, G., Communod, R., Vigo, D., Galeati, G., Faustini, M. y Torre, M.L. (2013). "Encapsulation of sex sorted boar semen: Sperm membrane status and oocyte penetration parameters". *Theriogenology*, 79(1), pp. 575-581. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2012.10.021
- Swanson, E. (1949). "The Effect of Varying Proportions of Egg Yolk and Sodium Citrate Buffer in Bull Semen Diluters upon Sperm Motility". *Journal of Dairy Science*, 32(4), pp. 345-352. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(49)92048-2
- Thiangthientham, P., Suwimonteerabutr, J., Tharasanit, T. y Techakumphu, M. (2020). "The optimal divalent cations and storage temperatures for the encapsulation of ram spermatozoa". *Thai J Vet Med*, 50(1), pp. 89-96.
- Torreta, M. E., Rabaglino, M. B. y Ferrero, S. (2010). "Caracterización cuali-cuantitativa de patologías espermáticas estudio comparativo de la incidencia de anomalías espermáticas en semen porcino fresco y refrigerado". *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, 11(12), pp. 1-20. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121210.html>
- Valenzuela, C., Hernández, V., Rodríguez, F. y Carrillo, R. (2013). "Tecnología de Encapsulación y su Aplicación en Ciencias Veterinarias". *Avances en Ciencias Veterinarias*, 28(2), pp. 58-75. DOI: 10.5354/acv.v28i2.30207
- Varela, E., Rey, J., Plaza, E., Muñoz de Propios, P., Ortiz-Rodríguez, J.M., Álvarez, M., Anel-López, L., Anel, L., De Paz, P., Gil, M.C., Morrell, J.M. y Ortega-Ferrusola, C. (2018). "How does the microbial load affect the quality of equine cool-stored semen?". *Theriogenology*, 1(114), pp. 212-220. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.03.028
- Varner, D., Blanchard, T.L., Love, C., Garcia, M. y Kenney, R. (1987). "Effects of semen fraction and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters". *Theriogenology*, 28(5), pp. 709-723. DOI: 10.1016/0093-691x(87)90288-3
- Vieira, L. (2013). Estudio de la crioconservación y viabilidad de espermatozoides de epidídimo de caballo. Murcia. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10803/123287>
- Vigo, D., Faustini, M., Villani, S., Orsini, F., Bucco, M., Chlapanidas, T., Conte, U., Ellis, K. y Torre, M.L. (2009). "Semen controlled-release capsules allow a single artificial insemination in sows". *Theriogenology*, 72(4), pp. 439-444. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2009.03.013
- Webb, G., Ams, M. y Pool, K. (1993). "Sperm concentration influences recovery of progressively morile spermatozoa and number of inseminations shipped in conventional containers". *Journal of Equine Veterinary Science*, 13(9), pp. 486-489. DOI: 10.1016/S0737-0806(07)80260-7

Weber, W, Rimann, M., Schafroth, T., Witschi, U. y Fussenegger, M. (2006). "Design of high-throughput-compatible protocols for microencapsulation, cryopreservation and release of bovine spermatozoa". *Journal of Biotechnology*, 123(1), pp. 155-163. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.11.008

White, I. (1993). "Lipids and Calcium Uptake of Sperm in Relation to Cold Shock and Preservation: a Review". *Reproduction Fertility and Development* , 5(6), pp. 639-658. DOI: 10.1071/rd9930639