



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Mejora del proceso de encapsulación espermática en la especie equina

Improvement of the sperm encapsulation process in the equine species

## **Autor**

Carmen García Herrando

## **Directores**

Lydia Gil Huerta

Noelia González Orti

Facultad de Veterinaria

2023

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	3
<b>2. INTRODUCCION</b> .....	5
<b>2.1. Características seminales en la especie equina</b> .....	6
2.1.1. Anatomía aparato reproductor masculino .....	6
2.1.2. Características del espermatozoide equino.....	7
2.1.3. Anatomía y fisiología del espermatozoide.....	7
2.1.4. Examen reproductivo del semental .....	8
2.1.5. Métodos de recolección del semen .....	8
2.1.6. Evaluación del semen .....	9
<b>2.2. Sistemas de preservación espermática clásicos</b> .....	9
2.2.1. Refrigeración.....	10
2.2.2. Congelación.....	11
<b>2.3. Encapsulación</b> .....	12
2.3.1. Alginato .....	13
2.3.2. Alginato liasa.....	15
<b>3. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS</b> .....	16
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	16
<b>4.1. Materiales</b> .....	16
4.1.1. Material biológico .....	16
4.1.2. Material laboratorial.....	17
<b>4.2. Método</b> .....	18
4.2.1. Pruebas previas a la fase experimental .....	18
4.2.2. Diseño Experimental definitivo.....	21
4.2.3. Estudio estadístico .....	23
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	24
<b>5.1 Efecto semental</b> .....	24
<b>5.2 Tiempo de conservación</b> .....	26
<b>5.3. Adición de calostro</b> .....	27
<b>5.4. Adición alginato liasa</b> .....	28
<b>5.5. Medio de lavado uterino</b> .....	29
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	31
<b>7. VALORACIÓN PERSONAL</b> .....	32
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b> .....	33

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.</b> Órganos sexuales primarios ( <i>González, 2018</i> ).....	6
<b>Figura 2.</b> Anatomía del espermatozoide ( <i>Espejo y Salvador, 2019</i> ).....	7
<b>Figura 3.</b> Reacción de gelificación entre el alginato y el ion calcio ( <i>Ramírez Márquez, 2016</i> ).....	14
<b>Figura 4.</b> Liberación de sustancia a través del tiempo ( <i>López Corado y Villalta Hernández, 2009</i> ).....	15
<b>Figura 5.</b> Muestras seminales utilizadas.....	16
<b>Figura 6.</b> Centro Militar de Cría Caballar.....	16
<b>Figura 7.</b> Ovario con folículo > 3,5 mm.....	17
<b>Figura 8.</b> Reactivos usados en las distintas experiencias.....	17
<b>Figura 9.</b> Material utilizado para la formación de las esferas.....	18
<b>Figura 10.</b> Espermatozoides fuera de la esfera con un volumen de alginasa de 18 µl.....	19
<b>Figura 11.</b> Esferas con alginato de media densidad (izquierda) y baja densidad (derecha).....	20
<b>Figura 12.</b> Gradilla con las diferentes concentraciones de alginato.....	20
<b>Figura 13.</b> Esferas a las 72h en refrigeración.....	20
<b>Figura 14.</b> Esferas a las 72h en estufa.....	20
<b>Figura 15.</b> Preparación de los medios.....	22
<b>Figura 16.</b> Representación esquemática del procedimiento del trabajo experimental.....	22
<b>Figura 17.</b> Formación de las esferas.....	23
<b>Figura 18.</b> Esferificaciones en baño de BaCl <sub>2</sub> .....	23
<b>Figura 19.</b> Preparación de los Eppendorf que irán a refrigeración.....	23
<b>Tabla 1.</b> Características seminales normales en équidos ( <i>Valbuena Mafla, 2021</i> ).....	9
<b>Tabla 2.</b> Diferentes medios utilizados.....	21
<b>Tabla 3.</b> Espermatozoides motiles dependiendo de la experiencia. 0 (ausencia de espermatozoides), 1 (espermatozoides muertos), 2 (menos de 5 espermatozoides vivos), 3 (espermatozoides vivos entre 6-25). En negrita valores de frecuencias observadas significativamente mayores de lo esperado.....	25
<b>Tabla 4.</b> Espermatozoides motiles dependiendo del tiempo transcurrido. 0 (ausencia de espermatozoides), 1 (espermatozoides muertos), 2 (menos de 5 espermatozoides vivos), 3 (espermatozoides vivos entre 6-25). En negrita valores de frecuencias observadas significativamente mayores de lo esperado.....	26
<b>Tabla 5.</b> Espermatozoides motiles dependiendo de la presencia o no del calostro. 0 (ausencia de espermatozoides), 1 (espermatozoides muertos), 2 (menos de 5 espermatozoides vivos), 3 (espermatozoides vivos entre 6-25).....	28
<b>Tabla 6.</b> Espermatozoides motiles dependiendo del volumen de alginasa. 0 (ausencia de espermatozoides), 1 (espermatozoides muertos), 2 (menos de 5 espermatozoides vivos), 3 (espermatozoides vivos entre 6-25). En negrita valores de frecuencias observadas significativamente mayores de lo esperado.....	29
<b>Tabla 7.</b> Espermatozoides motiles dependiendo de la presencia o no de fluido uterino. 0 (ausencia de espermatozoides), 1 (espermatozoides muertos), 2 (menos de 5 espermatozoides vivos), 3 (espermatozoides vivos entre 6-25). En negrita valores de frecuencias observadas significativamente mayores de lo esperado.....	30

## 1.RESUMEN

---

Las biotecnologías reproductivas en caballos son un campo de estudio y aplicación que utiliza técnicas avanzadas para mejorar la reproducción equina. En los últimos años, se ha empezado a incorporar la técnica de encapsulación para la conservación del semen, ya que preserva el material genético de los espermatozoides y mejora su tasa de supervivencia en condiciones de refrigeración o congelación.

El objetivo de este trabajo ha sido establecer un protocolo de encapsulación y estudiar la supervivencia y motilidad de espermatozoides encapsulados en esferas “macizas” formadas a partir de alginato de sodio de baja densidad al 2%. Se utilizó  $BaCl_2$  como solución reticulante para la formación de las esferas, y alginato liasa (alginasa) para facilitar la liberación de los espermatozoides de las mismas a lo largo del tiempo. Se valoró la adición de un 20% de calostro al medio de encapsulación para determinar si tenía alguna capacidad antioxidante y/o protectora sobre los espermatozoides. Por último, se estudió el uso de fluido uterino como medio de conservación durante la refrigeración espermática. Se concluyó que el método para obtener de esferas “macizas” de forma manual necesitaba utilizar agujas biseladas de 18G acopladas a una jeringuilla de 5ml para realizar el goteo desde una altura de 4 cm. El tiempo de refrigeración supuso diferencias significativas en la liberación de espermatozoides desde las esferas, observando que los espermatozoides permanecían viables en su interior incluso una vez sometidos a un test de termorresistencia a las 72h, lo que indica que podrían seguir liberándose de las esferas durante un tiempo más prolongado. Finalmente, ni la adición de calostro en los medios de encapsulación ni el uso de fluido uterino en los medios de refrigeración suponen una mejora en la liberación espermática. Sin embargo, la adición de los distintos volúmenes de alginasa sobre 1 ml de medio de refrigeración presentó diferencias altamente significativas, siendo la adición de 18  $\mu$ l el que mejores resultados ofreció.

## **ABSTRACT**

Reproductive biotechnologies in horses are a field of study and application using advanced techniques to improve equine reproduction. In recent years, the encapsulation technique has begun to be incorporated for semen preservation, as it preserves the genetic material of spermatozoa and improves their survival rate under refrigeration or freezing conditions.

The aim of this work has been to establish an encapsulation protocol and to study the survival and motility of spermatozoa encapsulated in "solid" spheres formed from 2% low-density sodium alginate. BaCl<sub>2</sub> was used as a cross-linking solution for the formation of the spheres, and alginate lyase (alginase) was used to facilitate the release of spermatozoa from the spheres over time. The addition of 20% colostrum to the encapsulation medium was evaluated to determine whether it had any antioxidant and/or protective capacity on the spermatozoa. Finally, the use of uterine fluid as a preservation medium during sperm cooling was studied. It was concluded that the method of obtaining "solid" spheres manually required the use of 18G bevelled needles attached to a 5ml syringe to drip from a height of 4 cm. The cooling time made a significant difference in sperm release from the spheres, with sperm remaining viable inside the spheres. The cooling time made a significant difference in sperm release from the spheres, with sperm remaining viable inside the spheres even after a heat resistance test at 72h, indicating that sperm could continue to be released from the spheres for a longer period of time. Finally, neither the addition of colostrum to the encapsulation media nor the use of uterine fluid in the cooling media led to a release in sperm quality. However, the addition of different volumes of alginase to 1ml of cooling medium showed highly significant differences, with the addition of 18 µl giving the best results.

## 2.INTRODUCCION

---

La primera mención sobre la Inseminación artificial (IA) proviene de los textos árabes del siglo XVI (*Trejos Soto, 2009*). A finales del siglo XIX y principios del XX, la IA equina comienza a ser empleada para la reproducción en caballos, surgiendo el primer programa de IA equina en Rusia. En la década de 1930, la técnica ya está bien establecida, aunque hasta ese momento el caballo sólo se utilizaba para la guerra, el transporte y como fuerza motriz en la producción (*Boyle, 1992*).

Como en todas las especies, la IA presenta ventajas y desventajas. Entre las ventajas se incluyen el mejor aprovechamiento de los reproductores para servir a un mayor número de yeguas, puesto que permite el traslado de las dosis seminales, refrigeradas o congeladas, al lugar geográfico que sea necesario sin tener que trasladar a los animales. Siguiendo esta línea, con la IA la interrupción de las carreras o la participación en exposiciones no es necesaria, puesto que no hay que alterar la rutina de los animales. Además, con la ventaja de poder trabajar con el semen que más nos interese en cualquier lugar, y ello facilita una mejora genética mucho más rápida. Por último, no debemos olvidar que evitando el contacto físico entre los animales conseguimos disminuir la transmisión de enfermedades venéreas, lo cual es sumamente ventajoso (*Morel, 1999*).

Como desventajas de la IA podemos citar el riesgo para las personas que realizan la recolección de semen, la variación significativa de la calidad del semen disponible y la mayor oportunidad de fraudes entre otras (*Morel, 1999*). Aun así, la limitación más importante es que el metabolismo de los espermatozoides y su motilidad se vean gravemente reducidos (*White, 1993*). Para eliminar estos efectos negativos sobre los espermatozoides, además de los sistemas tradicionales de refrigeración y congelación seminal con los correspondientes diluyentes que protegen a los espermatozoides, se han desarrollado diferentes estrategias, como la encapsulación (*Pruß et al., 2022*).

Por otro lado, mejorar la forma en la que los espermatozoides se liberan en el tracto de la hembra también es relevante. También pensando en ello se ha desarrollado la técnica de encapsulación, que permite liberar a los espermatozoides de manera lenta en el útero de la hembra, aspecto muy positivo en el caso de la yegua puesto que en época reproductiva presenta 7 días de fase estral con un momento de ovulación variable (*Cortés-Vidauri et al., 2018*), lo que obliga a realizar un seguimiento exhaustivo del ciclo estral de manera ecográfica para llevar a cabo la inseminación lo más cercana posible al momento de ovulación, garantizando la viabilidad de los espermatozoides en ese momento (*Rodríguez Artiles, 2010*).

## 2.1. Características seminales en la especie equina

### 2.1.1. Anatomía aparato reproductor masculino

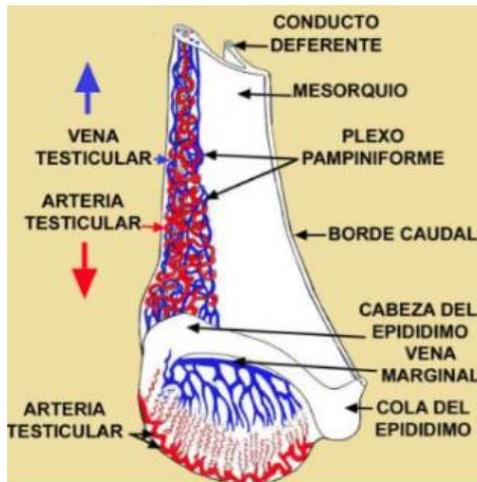


Figura 1. Órganos sexuales primarios del macho (González, 2018)

En el aparato reproductor del macho podemos diferenciar varias partes: testículos, escroto, cordón espermático, epidídimo, glándulas sexuales accesorias (ámpula, vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales), prepucio y pene (Trejos Soto, 2009)(Figura 1).

Los **testículos** son los órganos sexuales primarios del macho, ya que en ellos se produce la espermatogénesis. Además, es donde se producen y sintetizan andrógenos (hormonas que estimulan el desarrollo de los caracteres sexuales masculinos). Los testículos se encuentran recubiertos por el escroto (Trejos Soto, 2009).

A pesar de que el semental equino no es estacional, los testículos son más grandes y activos durante la época reproductiva, en los meses en los que el fotoperiodo es más largo, mayo a julio en el hemisferio norte. A partir de agosto se reduce la actividad testicular, lo que resulta en menores concentraciones de testosterona circulante y en menor producción total de espermatozoides desde de septiembre a octubre. El parénquima del testículo está constituido por túbulos seminíferos y por tejido intersticial (Galina, 2008). En estos túbulos es donde se producen los espermatozoides. Cada uno de estos túbulos desembocan en un tubo recto que desemboca en la rete testis. Los tubos de la rete testis se van fusionando hasta formar 13 a 15 conductos eferentes que desembocan en el conducto del epidídimo (Morel, 1999).

La unidad funcional del testículo es el túbulo seminífero. Cada túbulo seminífero está constituido por tejido germinal que es el que da origen a los espermatozoides. Está constituido por diferentes tipos de células germinales y por tejido de sostén formado por las células de Sertoli. El túbulo seminífero está rodeado por una lámina propia formada por fibroblastos y células mioideas cuya función es impulsar el avance de los espermatozoides a lo largo del túbulo conforme son producidos. Aparentemente las contracciones rítmicas de las células mioideas son estimuladas por oxitocina producida por las células de Leydig (Boyle, 1992).

El **epidídimo** es la continuación de los conductos eferentes. Las funciones del epidídimo incluyen el transporte, almacenamiento, maduración y concentración de los espermatozoides. En los segmentos iniciales del epidídimo se reabsorbe la mayor parte del fluido testicular, así como las

proteínas y algunas otras sustancias (Boyle, 1992). La maduración de los espermatozoides se adquiere gradualmente, conforme son expuestos a fluidos con diferente composición al avanzar a través de los diferentes segmentos del epidídimo. Esta maduración es muy importante para que los espermatozoides adquieran la capacidad fecundante, razón por la cual los espermatozoides de la cabeza del epidídimo son infértiles, mientras que los que ya han llegado a la cola del epidídimo tienen la capacidad de fecundar. El lugar de almacenamiento de los espermatozoides maduros es la cola del epidídimo. En la cola del epidídimo de un macho adulto puede haber hasta 54 mil millones de espermatozoides (Galina, 2008).

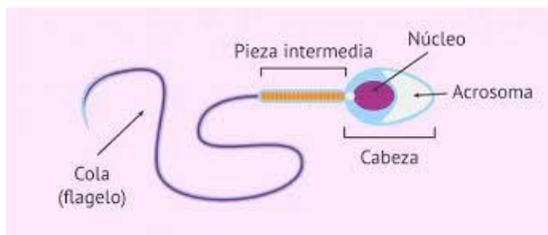
### 2.1.2. Características del espermatozoide equino

Los componentes del eyaculado son los espermatozoides y el plasma seminal. Este tiene diferentes fracciones: la fracción pre-espermática, la espermática y la fracción gel. La función de la pre-espermática es limpiar y lubricar la uretra, y es rica en NaCl. La fracción rica en espermatozoides contiene entre un 80 y 90% de espermatozoides, contando también con componentes bioquímicos. Por último, la fracción pobre o fracción gel, producida por las vesículas seminales, posee una baja concentración de espermatozoides y es rica en ácido cítrico y potasio (Mann, 1975).

El plasma seminal sirve como sustrato para los espermatozoides y algunos de sus componentes permiten e inician la maduración de los mismos. La fuente de energía presente en el plasma seminal es la glucosa (Mann, 1975). Su función es proteger a los espermatozoides de las fluctuaciones osmóticas, previniendo así la oxidación de otros componentes químicos (Morel, 1999).

La **espermátogénesis** es la gametogénesis en el macho. Consta de tres tipos celulares, las células que originan los gametos (espermatogonia), las precursoras de células que nutren a los gametos en desarrollo (células de Sertoli) y las precursoras de células que secretan hormonas sexuales (células Leyding) (Galina, 2008).

### 2.1.3. Anatomía y fisiología del espermatozoide



**Figura 2.** Anatomía del espermatozoide (Espejo y Salvador, 2019)

En la célula espermática diferenciamos cabeza, cuello, pieza intermedia y cola (**Figura 2**). En la cabeza se localiza el núcleo, que está compuesto de cromatina condensada que contiene material genético. Los 2/3 anteriores de la cabeza están cubiertos por el acrosoma, que posee las

porciones apical, principal y ecuatorial (Morel, 1999).

La membrana plasmática envuelve todo el espermatozoide y está fija en puntos específicos. Está formada por una doble capa de lípidos, una interfase de fosfolípidos y agua y un glicocálix. Los principales lípidos encontrados en dicha membrana son fosfolípidos y colesterol. La proporción de ambos determina la fluidez de la membrana, de hecho, la cantidad de fosfolípidos es directamente proporcional a la fluidez de la membrana, y el colesterol junto con las proteínas confieren estabilidad membrana. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias de criopreservación, como la refrigeración o la congelación, puede sufrir una transición de fase en la cual una porción líquida de la membrana se transforma en gel, pudiendo causar alteraciones estructurales irreversibles o disturbios metabólicos y muerte celular. En el espermatozoide equino, la temperatura en que este cambio de fases ocurre de forma más intensa es a 20.7°C, más baja de la que genera el mismo fenómeno en las especies porcina y bovina. Esto puede reflejar una variación en la tolerancia a caídas bruscas de la temperatura (*Morel, 1999*).

#### 2.1.4. Examen reproductivo del semental

El objetivo del examen de la salud reproductiva del semental es obtener información sobre la capacidad tanto física como comportamental que aseguren un buen desempeño reproductivo (*Galina, 2008*). Trejos Soto (2009) propone que el examen reproductivo del semental se divida en: historia clínica, examen físico general, examen andrológico, evaluación de la conducta sexual (libido y capacidad para la monta) y evaluación del semen. La evaluación de la salud general del animal esta también orientada a determinar la libido, habilidad del semental para la monta y la capacidad reproductiva.

#### 2.1.5. Métodos de recolección del semen

Para tener éxito en un programa de IA en équidos es imprescindible conocer los métodos de recolección de semen, así como los métodos de evaluación y preservación.

La recolección debe hacerse lo más natural posible, con la finalidad de que la muestra no se vea alterada en su calidad, principalmente en relación con su concentración y volumen (*Cid de León, 2006*). Para realizar la recolección de semen se requiere contar con una hembra en estro, o bien, si el macho esta entrenado, se puede utilizar un potro de montas (*Trejos Soto, 2009*).

La vagina artificial es el medio más adecuado para obtener semen en los equinos. Todos los otros métodos (esponja, colector vaginal y electroeyaculador) no siempre resultan lo suficientemente útiles (*Cid de León, 2006*). Existen varios modelos de vagina artificial, todos tratan de imitar las condiciones de temperatura y presión de la vagina de la yegua, estímulos mecánicos y térmicos necesarios para desencadenar la eyaculación.

Durante la recogida es cuando aumenta la probabilidad de contaminación del eyaculado. La **contaminación** del semen con bacterias puede surgir durante su recolección y manipulación. Este problema puede solucionarse con la adición de antibióticos, pero su uso puede conducir al desarrollo de resistencias bacterianas. Además, el uso de antibióticos en el diluyente puede resultar perjudicial para las características del semen durante el almacenamiento refrigerado (Al-Kass et al., 2018).

### 2.1.6. Evaluación del semen

Las evaluaciones que comprenden la calidad espermática son básicamente la macroscópica y la microscópica, y en su conjunto permiten el diagnóstico relevante y definitivo acerca de la calidad seminal (González Cruz y Castro Murillo, 2019). En la evaluación macroscópica se valoran el volumen de eyaculado, su aspecto, el color, la viscosidad y el pH. La evaluación microscópica tiene en cuenta fundamentalmente la motilidad progresiva, que es una variable realmente importante ya que está muy relacionada con la fertilidad, y la concentración de espermatozoides, entre otros parámetros (Galina, 2008).

El volumen total del eyaculado suele estar comprendido entre 60 y 70 ml, con un rango de 30 a 300 ml. Su color es blanco pálido con apariencia de leche descremada, y el pH del semen equino es ligeramente básico, con un rango de 7.2 a 7.7 (Wilhelm, Graham y Squires, 1996). El porcentaje normal de motilidad progresiva es del 75%, con un rango de 60 a 95% y la concentración espermática equina suele ser de 150 a 300 millones por ml (Valbuena Mafla, 2021) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características seminales normales en équidos (Valbuena Mafla, 2021)

CARACTERISTICAS	RANGO	PROMEDIO
Volumen total (ml)	30-200	70
Concentración (millones/ml)	30-800	120
Motilidad progresiva (%)	60-95	78
Morfología normal (%)	65-95	75
pH	6.8-7.8	7.4

## 2.2. Sistemas de preservación espermática clásicos

Los sistemas de criopreservación espermática permiten mantener las dosis seminales para su posterior uso en la IA bajo alguna de las siguientes tres presentaciones: semen fresco, refrigerado o congelado (Hernández Avilés y Love, 2021). El enfriamiento del semen disminuye la actividad metabólica de los espermatozoides, reduce el crecimiento bacteriano y, de esa manera, prolonga la viabilidad de los espermatozoides (Katila, 1997). Sin embargo, conlleva una

serie de alteraciones que disminuyen su calidad. Entre los factores desencadenantes de estas alteraciones encontramos el **choque térmico**, conjunto de alteraciones que los espermatozoides sufren cuando son sometidos a un enfriamiento rápido de 20°C a 5°C. Entre ellas encontramos por ejemplo los cambios en la motilidad, que pasa a contar con la presencia de movimientos retrógrados y circulares, reducción del metabolismo, lesión del acrosoma y de la membrana plasmática con pérdida de los componentes intracelulares. Estas alteraciones son en parte irreversibles (Amann y Pickett, 1987).

El **plasma seminal** que forma parte del eyaculado está compuesto por un perfil proteico muy característico. Una de sus funciones es reducir la inflamación del endometrio inducida por la monta, puesto que Inhibe la quimiotaxis y la fagocitosis de los polimorfonucleares, protegiendo de esta forma a los espermatozoides en el útero de la yegua (Katila, 2001; Troedsson, 2004). A pesar de lo mencionado, no es el medio ideal para almacenamiento espermatozoides, ya que tiene un efecto negativo sobre la motilidad espermática durante la conservación prolongada a bajas temperaturas (Varner et al., 1987; Jasko, 1992; Pruitt et al., 1993). Por este motivo, de cara a la criopreservación es necesaria su eliminación. La **centrifugación** es el método que más se utiliza para la eliminación del plasma seminal. Además, permite la concentración espermática y ofrece la posibilidad de controlar la dilución utilizada en el semen refrigerado o congelado (Brinsko, Crockett y Squires, 2000).

Por último, otro factor que no podemos olvidar es el uso de antibióticos en los procesos de preservación. Son adicionados normalmente en los diluyentes para retardar o eliminar el crecimiento de bacterias que invariablemente contaminan el semen como consecuencia de la recolección (Al-Kass et al., 2018).

### 2.2.1. Refrigeración

Un manejo más sencillo de los espermatozoides es posible gracias a la refrigeración, que implica su almacenamiento a una temperatura de 4-5°C (Pickett y Amann, 1987). Aun así, la conservación en refrigeración es bastante limitada (24-48 horas) debido a que la capacidad fecundante y la motilidad se ven disminuidas a lo largo del tiempo (Busch y Waberski, 2007).

La concentración óptima tras la dilución para que la supervivencia espermática sea adecuada durante la refrigeración es de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/ml (Varner et al., 1987). Sin embargo, Webb, Ams y Pool (1993) establecieron que también se podrían usar dosis de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/ml.

El punto crítico durante la refrigeración se produce con el paso de 18°C a 8°C, que es donde los espermatozoides pueden sufrir “shock por frío”, lo que implica que pueda alterarse 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 (Sánchez, 2022).

Para evitar todos estos daños producidos por las bajas temperaturas, controlar la contaminación bacteriana y conservar los procesos metabólicos de los espermatozoides, se hace uso de **diluyentes** basados en diferentes compuestos, tales como la yema de huevo, LDL, leche y lecitina de soja (Ghadeer Sabah y Falah Hasan, 2021). El uso de diluyentes permite por un lado, proteger a los espermatozoides de los daños ocasionados por el descenso de temperatura, y por otro ajustar el volumen a las necesidades de cada ocasión. La protección frente al descenso de temperatura la confieren el glicerol, la yema de huevo o la leche. Las lipoproteínas presentes en leche y yema de huevo protegen a los espermatozoides del choque térmico, y substratos metabolizables como la glucosa constituyen la fuente de energía para las células espermáticas (Brinsko y Varner, 1992).

Entre los diluyentes de refrigeración comerciales más utilizados encontramos el Equiplus®. Se trata de un medio balanceado a base de leche en polvo para preservar la actividad espermática hasta 72h a 5°C. Un estudio demostró que la presencia de Equiplus® no mejora ni empeora la calidad del esperma, por lo tanto, es un diluyente idóneo para controlar la contaminación del semen, sin embargo, se necesitan estudios *in vivo* para evaluar los efectos en la yegua (Al-Kass et al., 2018).

### 2.2.2. Congelación

Hoy en día el uso de semen congelado equino es cada vez más frecuente por las ventajas que supone. No obstante, existe una gran variabilidad en cuanto a los resultados obtenidos con él, debido a una falta de estandarización en la metodología del procesado y de evaluación de la calidad seminal, pre y postdescongelación (Metcalf, 2007; Sieme, Harrison y Petrunkina, 2008).

Internacionalmente se considera que un semental es “apto para congelación” si presenta unos valores de motilidad progresiva  $\geq 50-60\%$  en semen fresco y  $\geq 30-35\%$  tras la descongelación (Vidament et al., 1997; Samper y Morris, 1998; Loomis y Graham, 2008).

La calidad del semen congelado-descongelado depende de la capacidad de los espermatozoides de superar estos procedimientos sin perder sus funciones principales (Sieme, Harrison y Petrunkina, 2008). La pérdida de una sola de estas funciones podría reducir o suprimir totalmente la fertilidad del espermatozoide (Amann y Pickett, 1987). Durante los procesos de congelación se producen daños letales y subletales en los espermatozoides similares a la apoptosis (Watson, 2000; Ortega-Ferrusola et al., 2008), que afectan a la viabilidad e integridad

de los espermatozoides y por tanto su vida media y capacidad fecundante (Graham, 1996; Heitland et al., 1996).

Los daños sufridos durante la criopreservación seminal han sido clasificados por varios autores según su origen en: daños debidos a los cambios de temperatura (estrés térmico), de osmolaridad (estrés osmótico) o a la acción de agentes oxidantes (estrés oxidativo), si bien todos ellos están interconexiónados (Ortega-Ferrusola et al., 2008).

Para evitar todo lo anterior se utilizan crioprotectores que son sustancias hidrosolubles que disminuyen el punto eutéctico de la solución a la que se incorporan. El punto eutéctico es la temperatura más baja a la cual se puede fundir una mezcla de solutos con una composición fija. La disminución de este permite una mayor deshidratación de la célula espermática disminuyendo el gradiente osmótico al que dicha célula es sometido, es decir, se alcanza la misma concentración de solutos a una temperatura menor, por lo que la célula queda más protegida (Fabbri et al., 1998).

En ambos sistemas de criopreservación, refrigeración y congelación, se está estudiando el efecto beneficioso del calostro. El calostro se define como la primera secreción láctea acumulada en glándula mamaria compuesta por carbohidratos, grasas, electrolitos, proteínas y factores inmunológicos específicos y no específicos. Se forma solo una vez durante la gestación por el pase selectivo de Igs de la circulación general a la glándula mamaria que, si bien en el equino no posee la capacidad de sintetizarlas en cantidades importantes, la habilidad para concentrarse comienza cuatro semanas previas al parto y alcanzan el máximo de pasaje en las últimas dos semanas (Micaela Solange, 2022). El pasaje depende de las variaciones en la concentración sanguínea de estrógenos y progesterona cuyos niveles óptimos a tal efecto se logran durante las dos últimas semanas de gestación (Tipán Cèlteri, 2020). El 63% de sus componentes corresponde a proteínas, de las cuales un 40% son inmunoglobulinas G, mientras que las inmunoglobulinas A y M se encuentran en menor proporción (Micaela Solange, 2022). Para medir la calidad que tiene el calostro se utiliza el refractómetro Brix, un valor > 22 % indica que el calostro es de buena calidad (Lozic Silva, 2013).

### 2.3. Encapsulación

La bioencapsulación consiste en la captura de materiales biológicos activos en cápsulas de gel. Las cápsulas resultantes pueden contener enzimas, ADN, vacunas, células vivas y otros materiales con actividad biológica o farmacológica. La bioencapsulación tiene aplicaciones en la mayoría de los campos relacionados con la biología, tales como la medicina, farmacología, bioquímica, ciencia de los alimentos, agricultura, ganadería, acuicultura, y tecnologías

medioambientales. En relación con las biotecnologías reproductivas, se han encapsulado espermatozoides y embriones con diferentes objetivos. Mediante la encapsulación espermática se ha intentado aumentar la permanencia y supervivencia de los espermatozoides en el aparato genital de la hembra. Por otro lado, la encapsulación se ha utilizado para proteger a los embriones de los daños de membrana que se producen durante la congelación, para proporcionar una membrana artificial a los embriones manipulados y para mejorar los resultados de desarrollo *in vitro* (Valenzuela et al., 2013).

Las bicapas de lípidos se forman a través de un proceso conocido como autoensamblaje. El autoensamblaje es un fenómeno natural en el que diversas fuerzas físicas, químicas, eléctricas y otras fuerzas ambientales actúan sobre un sistema desordenado para formar una estructura organizada. La microencapsulación es un proceso que aprovecha el autoensamblaje. Este proceso envuelve la formación de pequeñas cápsulas (tamaño micro) que contienen algún ingrediente activo (ingredientes alimenticios, enzimas, medicamentos, etc.) destinados a ser liberados bajo condiciones definidas.

Encapsular una sustancia a escala micro o nano es importante siempre que sea necesario encerrar una sustancia dentro de una cubierta, de forma permanente o temporalmente, para extender su vida y estabilidad y para controlar su liberación bajo condiciones ambientales específicas. La fabricación y aplicación de las nano cápsulas muestran un enorme potencial en áreas como la tecnología de los alimentos, los cosméticos y la liberación de fármacos (Nano-Link Center for Nanotechnology Education, 2020).

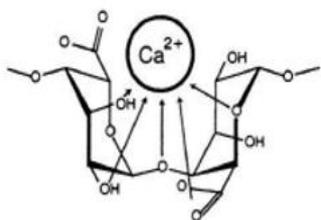
### 2.3.1. Alginato

Históricamente, el alginato extraído de las algas ha tenido una amplia variedad de usos. Sus propiedades físicas únicas le permiten ser utilizado como estabilizador y agente gelificante en los sectores de alimentación o industrias farmacéuticas (Yian Wong, Preston y Schiller, 2000).

Varios estudios han demostrado la utilidad del alginato de sodio como material de recubrimiento, y en combinación con otros materiales presenta grandes ventajas (Ortiz-Romero et al., 2021). Los alginatos son uno de los polímeros más utilizados en la microencapsulación. Los alginatos son una familia de polisacáridos lineales no ramificados, conteniendo cantidades variables de ácido (1,4')  $\beta$ -D-mannurónico y de ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (Rodríguez-Llimos et al., 2003). Además, la composición y extensión de las secuencias y el peso molecular determinan las propiedades físicas de los alginatos (Gombotz y Wee, 1998). Se encuentran en abundancia como parte de la célula y son extraídos primariamente de tres especies de algas marrones, que incluyen *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera*.

En base a cómo se usen los alginatos, y dependiendo del método de preparación y los materiales empleados existen dos tipos de esferas, las que tienen un único núcleo hueco o “core-shell” y las “macizas”, que constan de una matriz sólida en la que se integran materiales o células (Pruß *et al*, 2022). Se han referido diversos métodos de producción de esferas de alginato de calcio. El proceso para la producción de esferas del alginato de calcio se divide en dos partes principales, la primera es la dispersión del alginato en una solución y la segunda es la gelificación de las gotas de la solución de alginato (Varela Loyola, 2021).

La gelificación se produce al interaccionar polímeros cargados positivamente como son los grupos carboxilos del alginato con los cationes presentes en iones como  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$



**Figura 3.** Reacción de gelificación entre el alginato y el ion calcio (Ramírez Márquez, 2016)

(Figura 3). Durante la gelificación los cationes reemplazan el sodio del alginato para entrecruzar dos cadenas de este y formar una red, a esto se le llama “caja de huevos”, pues se forman cadenas antiparalelas con zonas de unión al catión con el que hayan reaccionado (Sánchez, 2022).

Existe una amplia gama de aplicaciones que puede tener la metodología de gelación iónica para encapsular diversos compuestos. La utilización de este tipo de encapsulación presenta ventajas muy variadas que se centran en la biodisponibilidad de compuestos bioactivos, estabilidad y durabilidad de diferentes compuestos, mejora en las características físicas y en la liberación del compuesto de interés, y, sobre todo, en cómo brinda protección contra efectos ambientales adversos (Lupo Pasin, González Azón y Maestro Garriga, 2012).

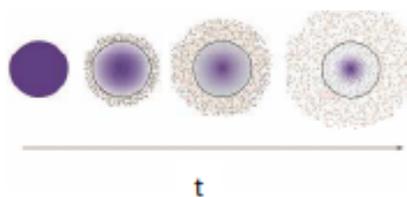
La producción de esferas de alginato de calcio con la forma y el tamaño deseados depende de las propiedades del alginato en suspensión como la viscosidad, la tensión superficial y la densidad y de las características de los equipos de producción como el diámetro de la boquilla, la distancia entre la superficie de la solución de cloruro de calcio y la boquilla y, por último, la profundidad de la solución de cloruro de calcio. La solución de Alg-Na se agrega gota a gota a la solución de cloruro de calcio, los cationes ( $Ca^{2+}$ ) se comienzan a unir con la parte aniónica de la cadena ( $O^-$ ). La reacción de gelificación comienza cerca de la interfaz donde la gota toca la superficie de la solución de  $CaCl_2$ . El proceso de gelificación implica la reorganización de las cadenas poliméricas orientadas al azar en una estructura de red ordenada (Varela Loyola, 2021). Estas cadenas son insolubles entre sí, pero poseen permeabilidad, lo que hace posible la liberación del activo (Lupo Pasin, González Azón y Maestro Garriga, 2012).

### 2.3.2. Alginato liasa

La alginato liasa, también conocida como alginasa o alginato depolimerasa es capaz de catalizar la degradación del alginato mediante un mecanismo de eliminación  $\beta$  que aún no se ha estudiado por completo. Cada enzima liasa se define por sus características individuales y sus preferencias por el enlace glicosídico que conecta a los monómeros, pero todas ellas realizan la misma acción, de despolimeración sobre el alginato. Algunas cepas de animales y bacterias marinas producen dos o más enzimas, y al menos una bacteriana (Yian Wong, Preston y Schiller, 2000).

Se ha informado actividad de alginato liasa en extractos obtenidos de varias especies de algas pardas, incluidas *Laminaria digitata*, *Pelvetia canaliculata* y *Undaria pinnatifida*. Además, se han aislado alginato liasas de una variedad de bacterias marinas, bacterias de suelo y hongos. La mayoría de estos organismos son capaces de utilizar unidades M y G de alginatos despolimerizados como fuentes de carbono y energía. La producción de alginato liasas también se da en bacterias que son capaces de sintetizarlas, como alguna pseudomona y azotobacter (Gacesa, 1988).

La función de la alginato liasa es catalizar la degradación del alginato mediante un mecanismo de eliminación  $\beta$ , dirigido al enlace glicosídico  $1 \rightarrow 4$  entre monómeros, despolimerizando el alginato y simultáneamente produciendo un producto que contiene ácido 4-desoxi-L-eritro-hex-4-enopiranosilurónico como resto terminal no reductor (Gacesa y Russell, 1990). Debido a lo anterior las células unidas al alginato son capaces de soltarse poco a poco y salir de la esfera (Figura 4).



**Figura 4.** Liberación de sustancia a través del tiempo (López Corado y Villalta Hernández, 2009)

Se han realizado muchos ensayos para la determinación cuantitativa de actividad alginato liasa. El ensayo del ácido tiobarbitúrico, que es un ensayo colorimétrico simple basado en la producción de ácidos urónicos insaturados por acción de la liasa sobre el alginato, la viscosimetría que consiste en el uso de un viscosímetro de pipeta para monitorizar la actividad liasa en *Laminaria digitata* son algunos de ellos, o la medición espectrofotométrica directa de productos de ácido urónico insaturado que se generan por la despolimerización liasa del alginato son algunos de ellos (Yian Wong, Preston y Schiller, 2000).

### 3. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

---

La inseminación artificial equina (IAE) es una técnica reproductiva que se utiliza ampliamente en la industria equina y en la cría de caballos. A pesar de ser una técnica ampliamente utilizada y exitosa en muchas ocasiones, también presenta algunas dificultades y desafíos que pueden afectar su eficiencia: la sincronización del ciclo estral de la yegua y el momento de la ovulación, el manejo de las dosis seminales, la dificultad de la técnica y los costes asociados a todo este proceso. Es por ello por lo que existe la necesidad de desarrollar otro tipo de técnicas de conservación espermática para mejorar sus resultados, tales como sería la encapsulación seminal ya que, además de abaratar costes, protege de una manera mucho más exitosa a los espermatozoides, permitiendo una liberación controlada de los mismos.

Por todo ello, el **objetivo** de este estudio ha sido establecer un procedimiento de encapsulación adecuado para los espermatozoides equinos, valorando la influencia del calostro en el medio de encapsulación, y del fluido uterino en el medio de refrigeración, así como el volumen de alginato liasa adecuado en el mismo que favorezca la liberación de espermatozoides de las esferas.

### 4. MATERIAL Y MÉTODOS

---

#### 4.1. Materiales

##### 4.1.1. Material biológico

El material biológico utilizado a lo largo de este trabajo han sido dosis seminales de 18 caballos ubicados en el Centro Militar de Cría Caballar de Zaragoza (Garrapinillos, Zaragoza) (**Figuras 5 y 6**). Las dosis procedían de eyaculados obtenidos de caballos de raza Hispano-Bretón, PRE (Pura Raza Español) y PRA (Pura Raza Árabe) con una edad aproximada de 10 años y con fertilidad probada.



Figura 5. Muestras seminales utilizadas



Figura 6. Centro Militar de Cría Caballar

Para preparar el medio de refrigeración para la conservación de las muestras espermáticas encapsuladas se utilizó el fluido uterino de dos úteros procedentes de hembras sacrificadas en el matadero municipal de Zaragoza (Merca Zaragoza). Se obtuvo mediante lavado con sonda estéril y con el diluyente Equiplus® (Minitub, España). Se desconocía el historial sanitario y reproductivo de ambas yeguas. No obstante, ambas presentaban una actividad ovárica compatible con el periodo estral (**Figura 7**).



Figura 7. Ovario con folículo > 3,5 mm

Como sustancia adicionada al medio de encapsulación se utilizó calostro. Este fue recogido de yeguas recién paridas del Centro Militar de Cría Caballar de Zaragoza y con una calidad de 27º Brix medido con un refractómetro.

#### 4.1.2. Material laboratorial

El trabajo experimental se desarrolló en los laboratorios de la unidad de Reproducción y Obstetricia del Departamento de Patología Animal, que cuentan con el material inventariable y fungible necesario de un laboratorio de tecnología seminal. La evaluación espermática y morfológica de los espermatozoides contenidos en las esferificaciones se realizó utilizando un el programa ISAS PROISER (Valencia) de análisis espermático computarizado.

Como diluyente base para preparar los distintos medios se utilizó Equiplus® (Minitub, España) sin antibiótico. A este medio se incorporó, en función de la experiencia y el fin, alginato de baja o media densidad,  $BaCl_2$  y alginato liasa (alginasa). Todos ellos de la casa Sigma Aldrich (España). Se utilizó eosina (Panreac) como colorante vital para la tinción de las esferas y facilitar su localización (**Figura 8**).



Figura 8. Reactivos usados en las distintas experiencias

## 4.2. Método

### 4.2.1. Pruebas previas a la fase experimental

#### 4.2.1.1. Formación de la esfera y determinación de la altura de la caída de la gota

Puesto que la elaboración de las esferas se iba a hacer de forma manual fue preciso establecer previamente la altura desde la cual se dejaba caer el medio sobre el BaCl<sub>2</sub>. Se comprobó que, a mayor altura, la gota era más pequeña y por tanto más adecuada para el ensayo, esto se debe a la tensión superficial del fluido en el momento que cae la gota. Se probaron diferentes utensilios para dispensar las gotas, en primer lugar, se utilizó una bureta, pero era inviable utilizarla ya que el alginato era muy denso y no permitía la salida de la gota. En segundo lugar, se utilizó una pipeta Pasteur desechable de plástico y en último lugar una jeringa de 10 ml conectada a una aguja biselada de 18G ya que era mucho más precisa que la pipeta Pasteur.

Se comprobó que la altura perfecta para las esferas macizas realizadas con pipetas Pasteur eran 5 cm de altura ya que las esferas salían de un tamaño adecuado y de forma redonda. Sin embargo, en caso de utilizar una aguja de 18G biselada, la altura idónea fue de 4 cm (**Figura 9**).



Figura 9. Material utilizado para la formación de las esferas

#### 4.2.1.2. Comprobación de la inocuidad de la alginato liasa y su concentración

Lo primero que se quiso valorar fue como afectaba la alginato liasa a los espermatozoides. La solución madre de alginato liasa se preparó con 1 mg de la misma en 10 ml de Equiplus®. Para preparar los medios de refrigeración de las esferas se utilizaron tubos Eppendorf donde se ponía 1 ml de semen y en forma ascendente se colocaron 0, 10, 20, 30, 40 y 50 µl de la disolución de alginato liasa preparada en cada uno de ellos. Se almacenaron en refrigeración todos los tubos Eppendorf y se comprobó la motilidad espermática a las 96h.

Esta prueba nos permitió obtener información sobre como interactuaba la alginato liasa con los espermatozoides. Tras la observación al microscopio de una muestra de cada Eppendorf se

pudo ver que la alginasa no afectaba negativamente a los espermatozoides ya que a cualquier concentración no se había visto alterada su viabilidad ya que seguía existiendo un alto porcentaje de motiles y progresivos.

Por otro lado, se quiso comprobar a qué concentración de alginato liasa se conseguía un reblandecimiento de la esfera, de tal forma que permitiera la salida de los espermatozoides. Para realizar el ensayo se encapsuló el semen utilizando alginato de media y de baja densidad al 1,5% preparado con EquiPlus®, en proporción 1:1 (2 ml de semen + 2 ml de alginato).

Las esferas obtenidas se mantuvieron refrigeradas a 4°C en Eppendorf con 1ml de EquiPlus® sin o con los volúmenes crecientes de la solución de alginato liasa: 10, 20, 30, 40 y 50µl, a razón de 3-4 esferas por Eppendorf. Esta prueba nos dio cierta información para determinar con qué cantidad de alginato liasa se disolvían las esferas. Se pudo observar que la alginasa había conseguido reblandecer las esferas incluso a la concentración más baja (10 µl) a diferencia de los tubos que no la contenían.

Todo lo anterior llevo a tomar la decisión de bajar el volumen de alginasa para próximas pruebas, siendo lo ideal por debajo de 10 µl ya que mantenía a los espermatozoides con motilidad y era capaz de lisar las esferas. Por ello se determinó que en adelante los volúmenes de alginasa fueran 2, 4, 6, 8 y 10 µl para identificar a que volumen exacto y a que temperatura se lisaban las esferas. Una vez se realizó el ensayo experimental se observó que con

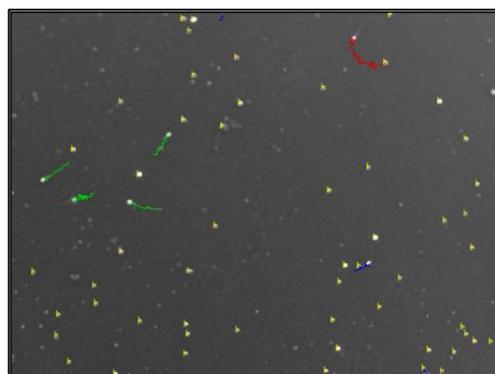


Figura 10. Espermatozoides fuera de la esfera con un volumen de alginasa de 18 µl

alginato de baja densidad a concentraciones por debajo de 10 µl era insuficiente. Debido a ello, se tomó la decisión final de que los volúmenes de alginasa adecuados a utilizar fueran 12, 14, 16, 18 y 20 µl (Figura 10).

#### 4.2.1.3. Elección del tipo de alginato para la encapsulación

La existencia de diferentes tipos de alginatos hizo que valorásemos el tipo que ofrecía mejores resultados. Para ello se trabajó con dos alginatos, uno de media y otro de baja densidad. Se prepararon de cada uno de ellos a dos concentraciones, 1.5% y al 2%, disueltos en EquiPlus®.

Con la pipeta Pasteur se dejaron caer las gotas sobre el BaCl<sub>2</sub> y se observó que con el alginato de media densidad al 1,5% las esferas quedaban redondas. Sin embargo, con el alginato de baja densidad al 2% la gota que se formaba tenía una forma más ovalada (Figura 11).



**Figura 11.** Esferas con alginato de media densidad (izquierda) y baja densidad (derecha)

Con la información obtenida hasta este momento, se procedió a realizar la primera prueba con muestras espermáticas equinas para comparar el alginato de media y baja densidad y su comportamiento dependiendo de la temperatura (4°C en refrigeración y 37°C en estufa).

Se dispusieron dos gradillas, en cada una de ellas se prepararon los diferentes volúmenes de alginasa (0, 2, 4, 6, 8 y 10  $\mu$ l) sobre Equiplus® para los dos tipos de alginato en sus dos concentraciones (**Figura 12**). Una gradilla fue destinada a la estufa y la otra a refrigeración, cada una de ellas contenía 2 filas de alginato de media densidad al 1,5% y 2% y 2 filas de baja densidad al 1,5% y 2%.

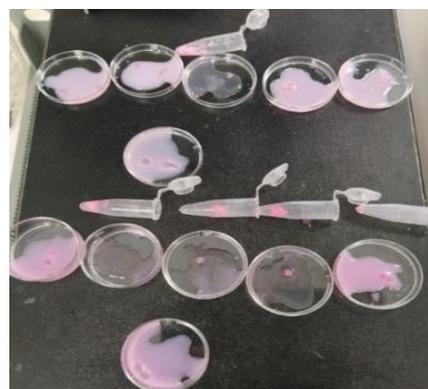


**Figura 12.** Gradilla con las diferentes concentraciones de alginato

Se hicieron tres repeticiones de este experimento y las muestras fueron evaluadas a las 72h. En la gradilla de refrigeración las esferas estaban redondas y se deshacían todas ellas al ponerlas entre porta y cubre, a diferencia de lo que ocurría con el control. Se observó que las concentraciones al 2%, tanto de media como baja densidad, las esferas eran más duras a diferencia de la concentración al 1,5% (**Figura 13**).



**Figura 13.** Esferas a las 72h en refrigeración



**Figura 14.** Esferas a las 72h en estufa

Las muestras mantenidas en la estufa presentaban algún tipo de reacción, ya que el contenido de algunos de los tubos era una pasta en ambos tipos de alginato (**Figura 14**), sin embargo, esto no ocurría en las muestras mantenidas en refrigeración.

Finalmente se decidió utilizar alginato de baja densidad al 2% en proporción 1:1, lo que nos llevaría a tener una concentración final del 1% de alginato de baja densidad, que posiblemente facilitara la acción de la alginato liasa.

#### 4.2.2. Diseño Experimental definitivo

##### 4.2.2.1. Preparación de los medios

Durante las diferentes experiencias se realizaron varias concentraciones de alginato de baja y de media densidad para poder observar cuál de ellas producía esferas con mejores características para la esferificación. Como se muestra a continuación, las concentraciones de cada uno de los medios utilizados fueron (**Tabla 2**):

**Tabla 2.** Diferentes medios utilizados

MEDIOS	PROCEDIMIENTO
Diluyente Equiplus®	3 sobres de diluyente en 300 ml de agua
Alginato baja densidad al 1,5%	1,5 gramos de alginato en 100 ml de agua
Alginato baja densidad al 2%	2 gramos de alginato en 100 ml de agua
Alginato media densidad al 1,5%	1,5 gramos de alginato en 100 ml de agua
Alginato media densidad al 2%	2 gramos de alginato en 100 ml de agua
Cloruro de Bario	0,208 gramos en 50 ml Equiplus®
Solución de alginato liasa	1 miligramo en 10 ml Equiplus®
Calostro al 20%	20 ml de calostro en 80 ml Equiplus®

##### 4.2.2.2 Preparación de las muestras seminales

Una vez las muestras llegaban al laboratorio y tras comprobar su concentración espermática se procedía a su centrifugación, previa dilución, para conseguir una concentración final de 50 millones por ml. Se procedía a centrifugar a 600g durante 10 min, para eliminar el plasma seminal.

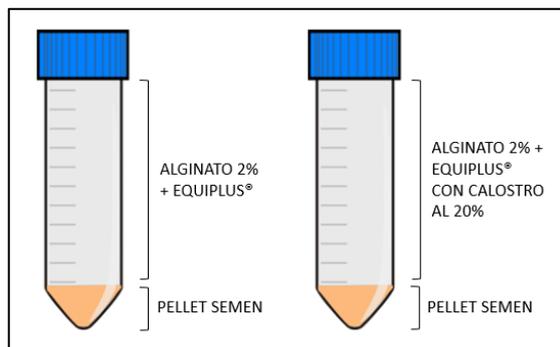
A continuación, el pellet era resuspendido con el diluyente Equiplus® y la concentración y motilidad eran comprobadas de nuevo. Seguidamente se adicionaba el alginato en una proporción 1:1. La concentración final de espermatozoides fue de 100 millones de espermatozoides/ml.

#### 4.2.2.3. Diseño experimental

Para llevar a cabo las encapsulaciones se utilizaron dos medios, uno incluyendo calostro en su composición y otro sin contar con él. El medio base de ambos fue el diluyente Equiplus® sin antibióticos mezclado con el alginato de baja densidad al 2 % en proporción 1:1 (2 ml Equiplus® + 2 ml alginato) (**Figura 15**).

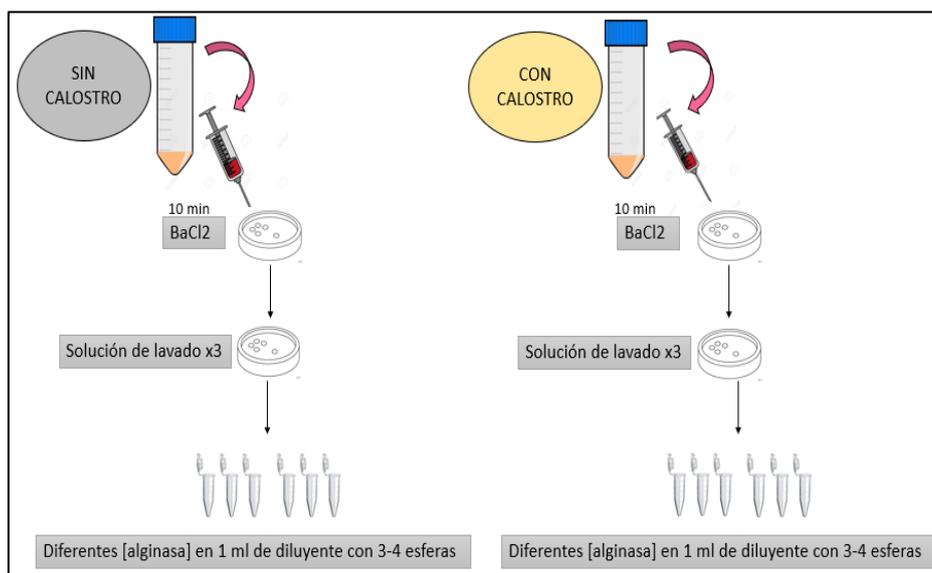
En ambos casos se incorporó eosina en proporción 0,001 gr/ml para poder identificar

fácilmente las esferas creadas y poder trabajar con ella. El procedimiento del ensayo experimental seguido fue el que se describe a continuación (**Figura 16**):



**Figura 13.** Preparación de los medios

fácilmente las esferas creadas y poder trabajar con ella. El procedimiento del ensayo experimental seguido fue el que se describe a continuación (**Figura 16**):



**Figura 14.** Representación esquemática del procedimiento del trabajo experimental

Los medios de encapsulación correspondientes se colocaron en una jeringa con una aguja de 18G biselada para dejarlo caer gota a gota sobre una placa de Petri que contenía  $\text{BaCl}_2$  (**Figura 17**). Una vez formadas las esferas se dejan incubar en el  $\text{BaCl}_2$  durante 10 minutos (**Figura 18**).

Transcurrido este tiempo, las esferas se sometieron a tres lavados en otra placa de Petri que contenía Equiplus®



Figura 17. Formación de las esferas



Figura 18. Esferificaciones en baño de BaCl<sub>2</sub>

Una vez realizados los lavados, se colocaron de 3 a 4 esferas en tubos Eppendorf cuyos tubos contenían 1 ml de Equiplus® o 1 ml de fluido uterino, ambos adicionados con los diferentes volúmenes de la solución de alginato liasa (0, 12, 14, 16, 18 y 20  $\mu$ l), para su posterior comparación (**Figura 19**).

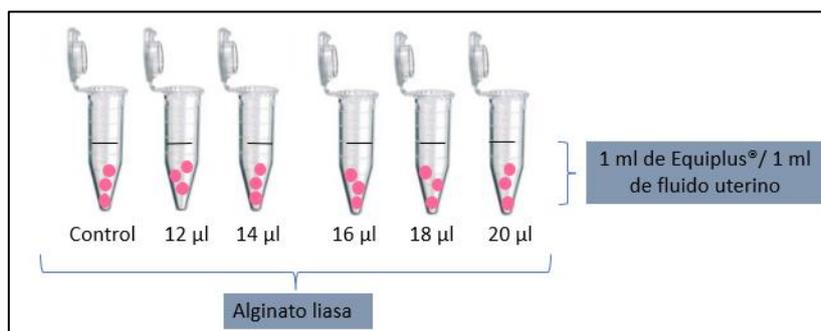


Figura 15. Preparación de los Eppendorf que irán a refrigeración

Dichos tubos se llevaron a refrigeración durante 72 h. Durante este tiempo se valoraron la motilidad y parámetros cinéticos a las 24, 48 y 72h.

Por último, pasadas las 72h en refrigeración, también se realizó un test de termorresistencia, que consistió en introducir los tubos Eppendorf en un baño durante 2h a 37°C y hacer una valoración de la motilidad transcurrido este tiempo.

#### 4.2.3. Estudio estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 22.0.

El estudio estadístico se pudo llevar a cabo categorizando la cantidad de espermatozoides, observados al microscopio, con un número. El "0" se utilizó cuando se observaba ausencia de

espermatozoides, el “1” si los espermatozoides estaban muertos, el “2” cuando se observaban menos de 5 espermatozoides vivos en el campo y “3” cuando se observaban entre 6 y 25 espermatozoides vivos. Cada experiencia se refería a un caballo diferente.

Se analizaron las frecuencias de las distintas categorías en función del resto de variables cualitativas usando tablas de contingencia. La significación estadística se calculó con la prueba Chi-cuadrado de Pearson o como alternativa la prueba de razones de verosimilitud en caso de que la proporción de frecuencias esperadas menores de 5 fuera mayor del 20%. Con el fin de identificar las categorías asociadas se calcularon los residuos tipificados corregidos que se interpretaron de la siguiente manera:

- Valores del residuo tipificado corregido (residuos corregidos) mayores de 1,96, indicaban frecuencias observadas significativamente mayores de lo esperado.
- Valores de residuos menores de -1,96 indican frecuencias observadas significativamente menores de lo esperado.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

---

En este apartado se recogen aquellos parámetros que pueden afectar en el tratamiento de los espermatozoides a lo largo del proceso y el número de espermatozoides liberados junto a la motilidad de estos. Dichos parámetros fueron: semental, tiempo de refrigeración, la temperatura, adición del calostro al medio de encapsulación, volumen de alginasa adicionado al medio de refrigeración, y uso de fluido uterino como medio de refrigeración.

Para evaluar el efecto del calostro se utilizó la prueba Chi-cuadrado de Pearson y para el efecto del semental, temperatura, volumen de alginasa y fluido uterino se realizó la prueba de razones de verosimilitud debido a que la proporción de frecuencias esperadas menores de 5 eran mayor del 20%

### 5.1 Efecto semental

Cada experiencia correspondía a las dosis de un semental único, lo que nos permitió determinar si existía un efecto individual en la formación de las esferas y en la liberación de espermatozoides de las mismas. Como se puede observar en la **Tabla 3**, los resultados en cuanto a la presencia de espermatozoides motiles fuera de la esfera presentaron, en función de la categorización realizada, diferencias altamente significativas una vez utilizada la prueba de razones de verosimilitud. Analizados los valores de los residuos tipificados se observó que el caballo 1 y 2 presentaban frecuencias observadas significativamente mayores de lo esperado. Todos los valores restantes observados eran significativamente inferiores a lo esperado, lo que nos

indicaba que las esferas elaboradas con las dosis seminales del semental .1 permitieron la liberación de un mayor número de espermatozoides que en el resto de los sementales, mientras en el caso del semental 2, el porcentaje de espermatozoides liberados de sus esferas era menor.

Lo observado en nuestro estudio ratifica la variabilidad que existe entre razas, pero el factor más importante que determina la calidad del eyaculado y la fertilidad es el individuo. Por ello la importancia de analizar el semen, ya que permite detectar precozmente alteraciones que afectan a la fertilidad, tal y como indican *Benjumeda y Gómez Cuétara (2017)*, debido a la variabilidad existente

**Tabla 3.** Espermatozoides motiles dependiendo de la experiencia. 0 (ausencia de espermatozoides), 1 (espermatozoides muertos), 2 (menos de 5 espermatozoides vivos), 3 (espermatozoides vivos entre 6-25). En negrita valores de frecuencias observadas significativamente mayores de lo esperado

Experiencia	Espermatozoides motiles observados			
	0	1	2	3
<b>1</b>	22,90%	7,30%	59,40%	<b>10,40%</b>
<b>2</b>	<b>45,80%</b>	4,20%	50,00%	
<b>3</b>	31,30%	5,20%	63,50%	
<b>4</b>	31,30%	10,40%	58,30%	
<b>p-value</b>	<b>&lt;0,001</b>			

Por otro lado, existen otros parámetros que pueden causar esa variabilidad dependiendo de la muestra seminal. En el caso del proceso de crioconservación, en 1987, *Amann y Pickett* postularon que era poco realista asumir que todos los eyaculados de todos los sementales debían ser congelados con el mismo protocolo, hoy en día existen muchos laboratorios que han adaptado un mecanismo denominado “Prueba de congelación” para evaluar cada nuevo semental a la hora de incluirlo en un proceso de criopreservación seminal (*Loomis y Graham, 2008*), e incluso de refrigeración. Esto se utiliza con el objetivo de comprobar cuál de estos sementales puede producir muestras post descongelación de calidad aceptable o resistentes a la bajada de temperatura, maximizando así los resultados obtenidos individualmente. En cuanto a la exposición del alginato, estudios realizados por *Park y Chang (2000)*, afirmaron que éste no afectaba a la integridad de la membrana del espermatozoide del semental, sin embargo, la motilidad sí parecía estar comprometida. Probablemente esto pudiera deberse a la viscosidad del alginato o simplemente al efecto individual.

Nuestros resultados coinciden con los autores anteriormente citados ya que se evidencia la variabilidad en la liberación espermática dependiente del semental, no obstante, este comportamiento pudo estar relacionado con el efecto que producían algunos componentes de las esferas, aunque fueron iguales para todas las experiencias, por lo que consideramos que las diferencias eran debidas al propio semental.

## 5.2 Tiempo de conservación

Analizando el número de espermatozoides liberados de las esferas y su motilidad (**Tabla 4**) y el efecto del tiempo, vemos que se observaron de diferencias altamente significativas utilizando la prueba de razones de verisimilitudes. Para categorizar se utilizaron los residuos tipificados corregidos, lo que nos permitió observar que a las 24h de conservación la categoría 2 presentaba una frecuencia significativamente superior que en el resto de las categorías. A las 48 h y 72 h, comprobamos espermatozoides en la categoría 3 (mayor número de espermatozoides liberados y motiles), aunque presentaban frecuencias significativamente inferiores a lo esperado. Todo ello contradice lo indicado por *Amann y Pickett* (1987) que señalan en su estudio un descenso de la calidad espermática a medida que el tiempo de conservación se prologaba.

**Tabla 4.** Espermatozoides motiles dependiendo del tiempo transcurrido. 0 (ausencia de espermatozoides), 1 (espermatozoides muertos), 2 (menos de 5 espermatozoides vivos), 3 (espermatozoides vivos entre 6-25). En negrita valores de frecuencias observadas significativamente mayores de lo esperado

Tiempo	Espermatozoides Motiles Observados			
	0	1	2	3
<b>24h</b>	28,10%	2,10%	<b>69,80%</b>	
<b>48h</b>	31,30%	1,00%	63,50%	4,20%
<b>72h</b>	27,10%	3,10%	65,60%	4,20%
<b>75h (2h/37°C)</b>	<b>44,80%</b>	<b>20,80%</b>	32,30%	2,10%
<b><i>p-value</i></b>	<i>&lt;0,001</i>			

Las esferas macizas de nuestro estudio mantienen a los espermatozoides y se observa una liberación sostenida en el tiempo. Tras el test de termorresistencia, la categoría 0 y 1 presentaban frecuencias significativamente superiores a lo esperado, indicando un fallo en la liberación o los que se habían liberado había muerto. No obstante, la categoría 2 y 3 presentaban un porcentaje elevado de espermatozoides liberados a pesar de haber permanecido en incubación 2h a 37°C, siendo este test una representación de lo que podría ocurrir *in vivo*.

Debido a la estructura maciza de las esferas y ante el desconocimiento de cómo se mantenían los espermatozoides en su interior procedíamos a realizar el aplastamiento de las mismas tras el test de termorresistencia y observamos, sin poder cuantificarlos por la presencia de alginato, que los espermatozoides se mantenían vivos. Esto nos llevó a pensar que su viabilidad probablemente será más prolongada. Hay que tener en cuenta el tiempo que los espermatozoides permanecen en el útero tras la inseminación artificial. El esto es el periodo de receptibilidad sexual de la yegua y en ese momento, el aparato genital se encuentra en condiciones de recibir y transportar espermatozoides, para finalmente culminar con la ovulación, que presenta una gran variabilidad del momento en que ocurre (*Cortés-Vidauri et al., 2018*). Además, el ovocito de la yegua puede permanecer viable hasta 12-15 h post-ovulación, sin que haya realmente un aumento significativo en las tasas de muerte embrionaria respecto a las que ocurren en inseminaciones pre-ovulatorias (*Cazales Penino, Estradé y Mattos, 2020*). Son tiempos necesarios que hay que tener en cuenta. La encapsulación, con la formación de esferas permite a los espermatozoides liberarse poco a poco en el tracto reproductivo de la hembra a medida que va pasando el tiempo. Este resultado es muy positivo ya que como se observa en el estudio, incluso después del test de termorresistencia todavía están motiles dentro de la cápsula. Podemos considerar que la esfera es una estructura que protege a los espermatozoides a diferencia de lo que sería una dosis seminal, de forma que se podrían depositar las esferas en el primer día de celo o tras una inducción hormonal de la ovulación para que se fueran soltando poco a poco los espermatozoides y así nos aseguraríamos de que la IA tendría posibilidades de ser más exitosa sin realizar nuevas inseminaciones ni controles ecográficos para determinar el momento de la ovulación.

### 5.3. Adición de calostro

En el presente trabajo, se adicionó calostro a las muestras para estudiar la diferencia existente con las muestras que no lo contenían, como se observa en la **Tabla 5**. Una vez analizados los resultados mediante la prueba Chi-cuadrado de Pearson, observamos que no existían diferencias significativas, lo que nos indicaba que la adición de calostro no nos mejoraba el proceso de esferificación y que el número de espermatozoides motiles observados fuera de la esfera no variaba. No obstante, las frecuencias observadas según las categorías mostraron que la categoría 3 presentaba un porcentaje superior al resto de categorías, lo que nos indicaría que el calostro sí ejerce un efecto beneficioso, pero creemos que sería necesario incrementar el número de pruebas para confirmarlo.

Estudios realizados por *Álvarez et al (2019)* afirman que la incorporación del calostro como nuevo componente en el diluyente para congelar semen incrementa los porcentajes de motilidad total, parámetros cinéticos y la funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide después del

procedimiento de la congelación y descongelación. Las características del calostro y el porcentaje de calostro adicionado eran similares, por lo que podemos afirmar que, aunque no se han podido demostrar diferencias en nuestros resultados, sí que existe cierto efecto.

**Tabla 5.** Espermatozoides motiles dependiendo de la presencia o no del calostro. 0 (ausencia de espermatozoides), 1 (espermatozoides muertos), 2 (menos de 5 espermatozoides vivos), 3 (espermatozoides vivos entre 6-25)

Calostro	Espermatozoides Motiles Observados			
	0	1	2	3
<b>No</b>	30,70%	8,30%	59,90%	1,00%
<b>Si</b>	34,90%	5,20%	55,70%	4,20%
<b>p-value</b>	0,123			

La adición de calostro fue motivada porque contiene diversos componentes muy interesantes como anticuerpos, leucocitos, citosinas, factores de crecimiento, hormonas, oligosacáridos y componentes antimicrobianos como la lactoferrina, lisozima y lactoperoxidasa (Tipán Céleri, 2020). La lisozima es un potente germicida que en presencia de inmunoglobulinas aumenta su actividad, la lactoferrina tiene un potente efecto bacteriostático que pierde actividad en ambientes ácidos y la lactoperoxidasa es considerada como un bacteriostático y un germicida. Basándonos en los estudios de Pruß *et al.* (2022) y sus conclusiones incorporamos calostro por los beneficios que conlleva, ya no como posible germicida sino como antioxidante, puesto que la incorporación de antioxidantes en los protocolos de esferificación parece resultar positiva.

Otros autores aseguran que el calostro, a diferencia de la leche, es capaz de ejercer un efecto protector preservando a los espermatozoides frente al shock térmico, un ejemplo es Álvarez *et al.* (2021) que elaboraron experiencias donde pudieron comprobar que el calostro es válido como agente crioprotector en la preservación de espermatozoides equinos, y además adicionar calostro en las esferas macizas podría estimular el sistema inmunológico uterino y reduciría posibles reacciones adversas en el momento de la inseminación, reduciendo las endometritis debidas al servicio como señalan Álvarez *et al.*, 2019. En consecuencia, las propiedades de calostro mostradas en estos estudios podrían sugerir un nuevo campo de investigación.

#### 5.4. Adición alginato liasa

Para analizar el efecto de la alginato liasa se utilizó la prueba de razones de verosimilitud. Los resultados que se muestran en la **Tabla 6**, reflejan que había diferencias altamente significativas. Analizados los residuos tipificados corregidos observamos que las frecuencias esperadas eran significativamente mayores para las categorías 0 sin adición de alginasa ó control, lo que nos

indicaba que era necesaria su adición, puesto que con su presencia aumentaban las categorías 2 y 3. En este caso las frecuencias mayores correspondían a volúmenes de 16 y sobre todo 18  $\mu$ l. Estos liberaban un mayor número de espermatozoides y además motiles.

**Tabla 6.** Espermatozoides motiles dependiendo del volumen de alginasa. 0 (ausencia de espermatozoides), 1 (espermatozoides muertos), 2 (menos de 5 espermatozoides vivos), 3 (espermatozoides vivos entre 6-25). En negrita valores de frecuencias observadas significativamente mayores de lo esperado

Alginasa	Espermatozoides Motiles Observados			
	0	1	2	3
<b>0<math>\mu</math>l</b>	<b>62,50%</b>	3,10%	34,40%	
<b>12<math>\mu</math>l</b>	35,90%	3,10%	60,90%	
<b>14<math>\mu</math>l</b>	35,90%	7,80%	56,30%	
<b>16<math>\mu</math>l</b>	26,60%	6,30%	60,90%	<b>6,30%</b>
<b>18<math>\mu</math>l</b>	14,10%	9,40%	<b>70,30%</b>	<b>6,30%</b>
<b>20<math>\mu</math>l</b>	21,90%	10,90%	64,10%	3,10%
<b>p-value</b>	<b>&lt;0,001</b>			

La alginato liasa, también conocida como alginasa o alginato depolimerasa es capaz de catalizar la degradación del alginato despolimerizando el alginato y simultáneamente produciendo un producto que contiene ácido 4-desoxi-L-eritro-hex-4-enopiranosilurónico como resto terminal no reductor (Yian Wong, Preston y Schiller, 2000). Lo anterior explicaría que a mayor adición de volúmenes crecientes de alginato liasa en el medio de conservación de una solución del 1%, menos endurecidas estaban las esferas. Al principio del ensayo se necesitó aumentar la concentración de las esferas para poder ver resultados, ya que la liberación espermática no se veía afectada negativamente al aumentar la concentración de alginasa. El efecto que causaba en las esferas era una disolución progresiva, cuanto mayor era la concentración de alginato liasa mayor era la disolución de las esferas.

## 5.5. Medio de lavado uterino

El espermatozoide es considerado el principal causante de la inflamación fisiológica que ocurre en el útero después del servicio. La introducción de espermatozoides en el tracto reproductivo de la hembra produce una fuerte respuesta neutrofílica en varias especies animales (Clerc Danvila, 2020). Troedsson, Scott y Liu (1995) mostraron que el espermatozoide de la especie equina activa el complemento que resulta en quimiotaxis y la subsecuente invasión masiva de

PMNs desde la sangre a la luz uterina. La inseminación en yeguas con espermatozoides libres de bacterias resulta en un influjo de PMNs hacia el útero, generando una respuesta inflamatoria similar a la desencadenada después de la inoculación de bacterias intrauterinas originando una reducción en el número de espermatozoides viables. Cuanto mayor es la dosis inseminante, mayor el número de espermatozoides que alcanzan la trompa uterina, causando una respuesta inflamatoria más intensa pero de resolución más rápida (Cazales Penino, Estradé y Mattos, 2020).

Ante el desconocimiento de cuál sería el comportamiento de las esferas en el útero se procedió a realizar lavados uterinos de hembras que estaban en periodo estral con el diluyente EquiPlus®. Al realizar el estudio mediante la prueba de razones de verosimilitud, los resultados mostraban diferencias altamente significativas (**Tabla 7**). En función de los residuos corregidos se observó que el mantenimiento de las esferas espermáticas en el medio procedente del lavado uterino durante la refrigeración mostraba frecuencias significativas mayores de las esperadas para las categorías 0 y 1, es decir, que no liberaban o los espermatozoides liberados estaban muertos respectivamente. En cambio, las esferas mantenidas en el medio Equiplus® sin lavado uterino presentaba las frecuencias significativas más elevadas.

No podemos dar una explicación a estos resultados ya que se esperaba una mayor liberación, pero la procedencia de los úteros, recogidos en matadero, pudiera ser una de las causas y que la contaminación del medio pudiera ser un factor determinante.

**Tabla 7.** Espermatozoides motiles dependiendo de la presencia o no de fluido uterino. 0 (ausencia de espermatozoides), 1 (espermatozoides muertos), 2 (menos de 5 espermatozoides vivos), 3 (espermatozoides vivos entre 6-25). En negrita valores de frecuencias observadas significativamente mayores de lo esperado

Medio Lavado	Espermatozoides Motiles Observados			
	0	1	2	3
No	20,80%	3,10%	<b>71,40%</b>	<b>4,70%</b>
Si	<b>44,80%</b>	<b>10,40%</b>	44,30%	0,50%
<i>p-value</i>	<i>&lt;0,001</i>			

Debido a la falta de bibliografía presente en cómo afecta el fluido uterino realmente a los espermatozoides sería de especial interés que futuros trabajos lo consideraran como un tema a desarrollar pasando a realizar inseminaciones con las esferas y observar el tipo de reacción que puedan generar en el útero.

## 6. CONCLUSIONES

---

Tras la realización de este trabajo podemos concluir:

1. Para realizar esferificaciones espermáticas de tipo macizo manualmente recomendamos una altura de 4 cm y una aguja de 18G biselada.
2. El alginato más adecuado para la encapsulación es el de baja densidad con una concentración del 2%, ya que permite trabajar más fácilmente durante el procedimiento.
3. El uso de alginasas en el medio de refrigeración permite la liberación de espermatozoides de las esferas. La adición de 18  $\mu$ l/ml de una solución madre al 1% de alginasa es el más eficiente en la liberación espermática.
4. La adición de calostro en el medio de esferificación y el uso de fluido uterino en el medio de refrigeración no han evidenciado mejora alguna en la calidad espermática a lo largo del proceso de formación de esferas "macizas".
5. La liberación de espermatozoides en los procesos de esferificación para obtener esferas de tipo macizo ha puesto de manifiesto la influencia del semental, al igual que ocurre en otros sistemas de preservación.

## CONCLUSIONS

After carrying out this work we can conclude:

1. For manual solid sperm spherification we recommend a height of 4 cm and an 18G bevelled needle.
2. The most suitable alginate for encapsulation is low-density alginate with a concentration of 2%, as it is easier to work with during the procedure.
3. The use of alginase in the cooling medium allows the release of spermatozoa from the spheres. The addition of 18  $\mu$ l/ml of a 1% alginase stock solution is the most efficient in sperm release.
4. The addition of colostrum in the spherification medium and the use of uterine fluid in the cooling medium have not shown any improvement in sperm quality throughout the process of forming "solid" spheres.
5. The release of spermatozoa in spherification processes to obtain solid-type spheres has shown the influence of the sire as in other preservation systems.

## 7. VALORACIÓN PERSONAL

---

Realizar este trabajo de Fin de Grado me ha permitido conocer el mundo de la investigación de la reproducción animal. He podido aprender y comprobar en que consiste un trabajo rutinario en un laboratorio de reproducción. El poder formarme en numerosas técnicas como el procesado de muestras seminales, técnicas de encapsulación seminal, búsqueda bibliográfica y análisis de los resultados me han dotado para poder realizar la puesta a punto en el procedimiento de la formación de esferas seminales.

Como conclusión, he disfrutado haciendo la realización de este trabajo tanto en el desarrollo del proceso como en la obtención de los resultados. He aprendido bastante académicamente y más en un tema que me llama especialmente la atención como es la reproducción y que espero dedicarme en un futuro a ello.

Finalmente me gustaría agradecer a Lidia Gil Huerta y Noelia González Orti por toda su ayuda y cariño durante el procedimiento y desarrollo del presente trabajo. Al Centro de Cría Caballar por la cesión de las muestras cada semana ya que sin ellas no habría sido posible realizar este trabajo y a Ignacio de Blas Giral por su ayuda con el desarrollo y comprensión de la estadística.

## 8. BIBLIOGRAFIA

---

1. Al-Kass, Z., Spergser, J., Aurich, C., Kuhl, J., Schmidt, K., Johannisson, A., M. y Morrell, J. (2018). "Sperm Quality during Storage Is Not Affected by the Presence of Antibiotics in EquiPlus Semen Extender but Is Improved by Single Layer Centrifugation". *Antibiotics*, 7(1), 1. DOI: 10.3390/antibiotics7010001
2. Álvarez, C., Luño, V., González, N. y Gil, L. (2019). "A preliminary study on the use of jenny colostrum to improve quality in extenders for freezing donkey semen". *Cryobiology*. Elsevier. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2019.01.009
3. 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
4. Benjumeda, R. y Gómez Cuétara, C. (2017) "La fertilidad: análisis del semen". *Ecuestre*. Disponible en: <https://www.ecuestre.es/app/caballo/temas-de-cria/la-fertilidad-analisis-del-semen>
5. Boyle, M.S. (1992). "Artificial insemination in the horse – more than a century of practice and research". Elsevier. In *Annales de zootechnie* (Vol. 41, No. 3-4, pp. 311-318). DOI:10.1016/j.jevs.2012.06.011
6. Brinsko, S.P. y Varner, D.D. (1992). "Artificial insemination and preservation of semen". *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 8(1), 205-218. DOI:10.1016/S0749-0739(17)30476-5
7. Brinsko, S.P., Crockett, E.C. y Squires, E.L. (2000). "Effect of centrifugation and partial seminal plasma removal on equine spermatozoal motility after cooling and storage" *Theriogenology* 54, 129-136. DOI: 10.1016/S0093-691X(00)00331-9
8. Busch, W. y Waberski, D. (2007). "Manual de inseminación artificial de los animales domésticos y de explotación zootécnica". Editorial Acribia.
9. Cazales Penino, N., Estradé, M.J. y Mattos, R.C. (2020) "Inseminación artificial con semen congelado equino: reacción inflamatoria, transporte espermático y técnica de inseminación". *Scielo Uruguay*. DOI:10.29155/VET.56.214.2
10. Cid de León, R.A.V. (2006). *Extracción, evaluación y procesamiento de semen equino*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro".
11. Clerc Danvila, M. (2020). *Reacción inflamatoria uterina luego de la inseminación artificial con espermatozoides vivos y muertos en yeguas*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de la República.

12. 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.
13. Espejo Catena, M y Salvador, Z (2019). Reproducción Asistida ORG. Disponible en: <https://www.reproduccionasistida.org/espermatozoide/>
14. Fabbri, R., Porcu, E., Marsella, T., Primavera, M.R., Seracchioli, R., Ciotti, P.M., Magrini, O., Venturoli, S., Flamigni, C. (1998). "Oocyte cryopreservation". *Human Reproduction*. 13(4), 98-108. DOI:10.1093/humrep/13.suppl\_4.98
15. Gacesa, P. (1988). "Alginates". Editorial: Elsevier. DOI:10.1016/0144-8617(88)90001-X
16. Gacesa, P. y Russell, N.J. (1990). "Pseudomonas Infection and Alginates: Biochemistry, Genetics and Pathology". *Biochemistry, genetics and pathology*. Editorial: Chapman and hall.
17. Galina, C. (2008). "Reproducción de Animales Domésticos" 3ª Edición. Limusa. México. pp. 43-57.
18. 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
19. Gombotz W.R. y Wee S.F. (1998). "Protein release from alginate matrices". *Advanced Drug Delivery Reviews*; 31, 267-285. DOI:10.1016/j.addr.2012.09.007
20. González Cruz, S. y Castro Murillo, K. (2019). "Métodos modernos de evaluación seminal en equinos". Disponible en: <https://repository.ucc.edu.co/items/48dce25b-96e3-447f-87d2-c7d856bb1f40>
21. González, K. (2018). "Aparato reproductor del caballo". *Zoovet es mi pasión*. Disponible en: <https://zoovetesmiapasion.com/caballos/reproduccion-del-caballo/aparato-reproductor-del-caballo>
22. Graham, J.K. (1996). "Analysis of stallion semen and its relation to fertility". *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 12(1), 119-130. DOI:10.1016/S0749-0739(17)30299-7
23. Heitland, A.V., Jasko, D.J., Squires, E.L., Graham, J.K., Pickett, B.W. y Hamilton, C. (1996). "Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa". *Equine veterinary journal*, 28(1), 47-53. DOI:10.1111/j.2042-3306.1996.tb01589.x
24. 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(3), 280-288 DOI:10.58292/ct.v13.9664
25. Jasko D.J. (1992) "Evaluation of stallion semen". *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 8(1), 129-148. DOI:10.1016/S0749-0739(17)30471-6

26. Katila, T. (1997). "Procedures for handling fresh stallion semen". *Theriogenology*, 48(7), 1217-1227. DOI:10.1016/S0093-691X(97)00354-3
27. Katila, T. (2001). "Sperm-uterine interactions: a review". *Animal reproduction science*, 68(3-4), 267-272. DOI:10.1016/S0378-4320(01)00162-2
28. Loomis, P.R. y Graham, J.K. (2008). "Commercial semen freezing individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols". *Animal reproduction science*, 105(1-2), 119-128. DOI:10.1016/j.anireprosci.2007.11.010
29. López Corado, L.C. y Villalta Hernández, M.A. (2009). *Calibración de refractómetro Brix para la determinación del contenido de Inmunoglobulina G en calostro bovino*. Trabajo Fin de Grado. Universidad del Salvador.
30. Lozic Silva, S.A. (2013). *Calibración de refractómetro Brix para la determinación del contenido de Inmunoglobulina G en calostro bovino*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Austral de Chile.
31. Lupo Pasin, B., González Azón, C. y Maestro Garriga, A. (2012). "Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones". *Revista venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 130-151. ISSN: 2218-4384 (versión en línea)
32. Mann, T. (1975) "Biochemistry of stallion semen". *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, (23), 47-52. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/1060826>
33. Metcalf, E. (2007). "The efficient use of equine cryopreserved semen". *Theriogenology*, 68(3), 423-428. DOI:10.1016/j.theriogenology.2007.04.039
34. Micaela Solange, C. (2022). *Calidad de calostro equino y manejo del potrillo al nacimiento*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Nacional de Río Negro.
35. Morel, M.C.D. (1999). "Equine artificial insemination". CABI Publishing.
36. Nano-Link Center for Nanotechnology Education (2020). "Encapsulación y Liberación Controlada: Macro Cápsulas (Encapsulation & Controlled Release)," Disponible en: <https://nanohub.org/resources/33754>.
37. Ortega-Ferrusola, C., Sotillo-Galán, Y., Varela-Fernández, E., Gallardo-Bolaños, J.M., Muriel, A., González-Fernández, L., Tapia, J.A. y Peña, F.J. (2008). "Detection of "apoptosis-like" changes during the cryopreservation process in equine sperm". *Journal of andrology*, 29(2), 213-221. DOI:10.2164/jandrol.107.003640
38. Ortiz-Romero, N., Ochoa-Martínez, L.A., González-Herrera, S.M., Rutiaga-Quñones, O.M. y Gallegos-Infante, J.A. (2021). "Avances en las investigaciones sobre la encapsulación mediante gelación iónica: una revisión sistemática" Vol. 24, nro. 52, e1962. DOI:10.22430/22565337.1962

39. Park, J. y Chang, H. (2000). "Microencapsulation of microbial cells". *Biotechnol. Adv.* 18, 303–319. DOI: 10.1016/S0734-9750(00)00040-9.
40. 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
41. Pruitt, J.A., Arns, M.J. y Pool, K.C. (1993). "Seminal plasma influences recovery of equine spermatozoa following in vitro culture (37°C) and cold storage (5°C)" *Theriogenology* 39, 291. Disponible en: <https://scite.ai/reports/seminal-plasma-influences-recovery-of-J2DK2a>
42. 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
43. Ramírez Márquez, L.E. (2016). "Fabricación de micropartículas de alginato para la liberación de naproxen". *Revista Clamati Sabiduría*. Volumen 7. Número Especial 2. Disponible en: <https://docplayer.es/84436645-Fabricacion-de-microparticulas-de-alginato-para-la-liberacion-de-naproxen.html>
44. Rodríguez Artilles, I. (2010). "Inseminación artificial o monta dirigida en la yegua". *PortalVeterinaria*. Disponible en: <https://www.portalveterinaria.com/articoli/articulos/19585/inseminacionartificial-o-monta-dirigida-en-la-yegua>.
45. Rodríguez Limos, A.C., Chappetta, D., Szeliga, M., Fernández, A. y Bregni, C. (2003). "Micropartículas de alginato conteniendo paracetamol". *Ars. Pharmaceutica*; 44 (4), 332-342. Disponible en: <https://digibug.ugr.es/handle/10481/28182>
46. Samper, J.C., y Morris, C.A. (1998). "Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey". *Theriogenology* 49, 895-903. DOI:10.1016/S0093-691X(98)00039-9
47. Sánchez, E. A. (2022). *Búsqueda de nuevos métodos de preservación espermática en la especie equina: Encapsulación*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza.
48. Sieme, H., Harrison, R.A.P. y Petrunkina, A.M. (2008). "Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion". *Animal reproduction science*, 107(3-4), 276-292. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.05.001
49. Tipán Célleri, M.E. (2020). "Efecto de los métodos de conservación sobre la composición físico-química del calostro bovino". Disponible en: <https://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/12602>
50. Trejos Soto, A.A. (2009). *Manejo reproductivo del semental equino*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro".

51. Troedsson, M. H., Scott, M. A. y Liu, I. K. (1995). "Comparative treatment of mares susceptible to chronic uterine infection". *American journal of veterinary research*, 56(4), 468-472. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/7785824>
52. Troedsson, M.H.T. (2004) "Role of seminal plasma in freezing equine spermatozoa" *Transporting Gametes and Embryos*, 90-91.
53. Valbuena Mafla, J. (2021). *Descripción de los Parámetros Seminales y Análisis del Crecimiento Bacteriano con el Método Reproductivo Artificial Eyaculado del Equino*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Antonio Nariño.
54. 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
55. Varela Loyola, M.T. (2021). *Desarrollo de un equipo automático para esferificación de alginato de calcio y un agente de liberación controlada*. Trabajo Fin de Grado. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
56. 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
57. Vidament, M., Dupree, A.M., Julienne, P., Evian, A., Noue, P. y Palmer, E. (1997). "Equine frozen semen: freezability and fertility field results". *Theriogenology* 48, 907-917. DOI:10.1016/S0093-691X(97)00319-1
58. Watson P.F., (2000). "The causes of reduced fertility with cryopreserved semen". *Animal reproduction science*, 60, 481-492. DOI:10.1016/S0378-4320(00)00099-3
59. 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
60. 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
61. Wilhelm, K.M., Graham, J.K. y Squires, E.L. (1996). "Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hámster oocyte penetration". *Theriogenology*, 46(4), 559-578. DOI:10.1016/0093-691X(96)00209-9

62. Yian Wong, T., Preston, L.A. y Schiller, N.L. (2000).” Alginate lyase: Review of Major Sources and Enzyme Characteristics, Structure-Function Analysis, Biological Roles, and Applications”. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 289-340. DOI 10.1146/annurev.micro.54.1.289