

Calidad espermática de semen encapsulado de ovino, almacenado por tres días en dos temperaturas diferentes

Sperm quality of sheep encapsulated semen, stored for three days at two different temperatures



<https://eqrcode.co/a/ln4yMF>

✉ José Ernesto Hernández Pichardo¹, Arianna Miranda Martínez², ✉ José Luis Rodríguez Suastegui^{*}

¹Laboratorio Manejo de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Coyoacán 04960. CDMX, México.

²Clínica privada. Estado de México, México.

RESUMEN: La encapsulación de semen puede ser una alternativa a los métodos convencionales de conservación de semen, que contribuya a la eficiencia de la inseminación artificial, al mantener la motilidad y la viabilidad espermáticas por tiempos prolongados; pero estas características de semen encapsulado se han determinado durante 24 h, generalmente. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la calidad espermática de semen encapsulado de ovino almacenado en refrigeración o a temperatura ambiente por 24, 48 y 72 h. Los eyaculados obtenidos se diluyeron y se dividieron en tres porciones para los grupos Control (semen refrigerado), Semen Encapsulado Refrigerado (SE-R) y Semen Encapsulado Temperatura Ambiente (SE-TA). Las cápsulas se elaboraron con alginato de sodio (0,5 %) y BaCl₂ (50 mM). De acuerdo a los resultados, el grupo control obtuvo los mejores valores en motilidad progresiva y viabilidad. Las evaluaciones de motilidad entre el semen encapsulado mostraron que el SE-R obtuvo mayor porcentaje que el SE-TA durante las 72 h de almacenamiento ($p < 0,05$); además, la motilidad de SE-R fue similar al control ($p > 0,05$) a las 48 h y 72 h, respectivamente. En cuanto a la viabilidad, el SE-R fue el único grupo que mantuvo la proporción de espermatozoides vivos durante el periodo de 24 a 72 h de almacenamiento ($p > 0,05$). De acuerdo a lo anterior, el SE-R mantiene la motilidad progresiva y la viabilidad por un mayor tiempo de almacenamiento y puede ser una alternativa en los programas de IA, donde es necesario alargar la capacidad fecundante del espermatozoide.

Palabras clave: ovino, semen encapsulado, alginato de sodio, calidad espermática, almacenamiento refrigeración.

ABSTRACT: Semen encapsulation may be an alternative to conventional methods of semen preservation, contributing to the efficiency of artificial insemination by maintaining sperm motility and viability for extended periods of time, but these characteristics of encapsulated semen have generally been determined for 24 hours. The research was aimed at evaluating the sperm quality of sheep encapsulated semen stored refrigerated or at room temperature for 24, 48 and 72 h. The ejaculates obtained were diluted and divided into three portions for the groups: control (refrigerated semen), refrigerated encapsulated semen (SE-R) and encapsulated semen at room temperature (SE-TA). Capsules were made with sodium alginate (0.5 %) and BaCl₂ (50 mM). According to the results, the control group obtained the best values in progressive motility and viability during the study. Motility evaluations among encapsulated semen showed that SE-R obtained higher percentage than SE-TA during 72 h of storage ($p < 0,05$). Moreover, SE-R motility was similar to that of the control group ($p > 0,05$) at 48 h and 72 h of storage, respectively. In terms of viability, SE-R was the only group that maintained the proportion of live spermatozoa during storage period from 24 to 72 hours ($p > 0,05$). Accordingly, SE-R maintained progressive motility and viability for a longer storage time and can be an alternative in IA programs, where it is necessary to extend the fertilizing capacity of the sperm.

Key words: sheep, encapsulated semen, sodium alginate, sperm quality, refrigerated storage.

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es una de las biotecnologías que se aplica a nivel mundial para incrementar la eficiencia de la reproducción en las diferentes especies de producción, entre los que se incluyen los ovinos (1). Sin embargo, en estudios retrospectivos en la especie ovina, donde se realizaron 129 224 inseminaciones con semen refrigerado entre el periodo comprendido desde 2007 a 2018, solo se obtuvo el 42 % de fertilidad (2); mientras que, al usar semen fresco, se describe más de 90 % (3) y solo el 36 % con semen congelado (4). El semen refrigerado se utiliza cuando se necesita realizar la IA después de 24 h de

haber obtenido el semen (3); sin embargo, cuando se utiliza este tipo de semen la viabilidad disminuye, lo que compromete la eficiencia de la IA, sobre todo la viabilidad y la longevidad de los espermatozoides después de la inseminación, necesarios para aumentar la fertilidad y productividad de los animales (1), por lo que es necesario buscar nuevas alternativas para mantener las características espermáticas del semen almacenado. La encapsulación de los espermatozoides puede ser una opción, ya que permite la liberación lenta de espermatozoides viables y así prolongar su supervivencia en el aparato reproductor de la hembra.

*Autor para la correspondencia: José Luis Rodríguez Suastegui. E-mail: embrioninvitro@hotmail.com

Recibido: 15/06/2021

Aceptado: 08/08/2021

La encapsulación de semen se define como un recubrimiento de las células espermáticas con una membrana polimérica semipermeable (5). La estructura de la cápsula puede estar formada por un único material o diferentes materiales (6), como alginato, sulfato de celulosa y liposomas (1, 5, 7). La encapsulación con alginato se usa frecuentemente para mantener componentes bioactivos, debido a que su estructura permite el intercambio de nutrientes y metabolitos (1). El alginato tiene su origen en algas pardas y está compuesto de copolímeros de ácido gúlorónico y ácido manurónico (1,5). Se describe que las propiedades del alginato ayudan a mantener las características morfológicas y funcionales de las células encapsuladas (1), debido a su capacidad gelificante que permite interactuar con cationes divalentes para formar matrices con las propiedades que inhiban o permitan el intercambio de moléculas (5). Usualmente, los cationes divalentes que se utilizan con el alginato para la encapsulación del semen son Calcio (Ca^{2+}) y Bario (Ba^{2+}) (1). El proceso de elaboración del alginato es sencillo y fácil de implementar; además, es de bajo costo, por lo que se considera una buena opción para la elaboración de las cápsulas (6).

La encapsulación de semen se ha implementado con buenos resultados en porcino, ovino, canino y humano (5), y se informa que estas cápsulas se pueden almacenar para su conservación a 5, 15, 18°C y en nitrógeno líquido (1). Particularmente el alginato de bario se ha empleado para formar las cápsulas para conservar semen de porcino (8), equino (9), bovino (10) y, recientemente, en ovino (1).

De los pocos estudios que se conocen sobre encapsulación de semen de ovino con alginato se encuentra el de Thiangthientham *et al.* (1), quienes evaluaron la calidad espermática (motilidad y viabilidad) de semen encapsulado con alginato de bario y alginato de calcio a 4 y 16°C por 24 h, respectivamente. En este estudio, la calidad espermática disminuyó considerablemente con alginato de calcio en comparación con alginato de bario, debido, posiblemente, a los efectos colaterales del Ca^{2+} (produce baja motilidad e induce la capacitación prematura del espermatozoide), además de su baja afinidad para unirse con el alginato, lo que causa un aumento en el tamaño del poro de la matriz y ocasiona una desestabilización de la cápsula (1).

Previamente se ha demostrado que la IA mejora la fertilidad de un rebaño y es una herramienta de uso frecuente que posiblemente logre sustituir a la monta natural (2). En los programas de IA, es frecuente que utilicen entre dos a tres reinseminaciones después de iniciado el estro, para garantizar un mayor número de borregas gestantes. Sin embargo, la conservación del semen de ovino es esencial para el éxito de la IA y dependerá del tiempo que transcurra a partir de la obtención del semen hasta la IA, que es de 6 h a temperatura ambiente (17-21°C) y de 24 h en

refrigeración (5°C) (11). La encapsulación de semen, por consiguiente, puede ser una alternativa para aumentar el tiempo de conservación del espermatozoide de ovino por periodos más prolongados a los antes mencionados, pero no existen datos recientes en la especie ovina que ayuden a discernir esta posibilidad. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la calidad espermática del semen encapsulado de ovino almacenado por tres días en dos temperaturas diferentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el laboratorio "Manejo de la Reproducción" en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México. La investigación fue conducida en cumplimiento a las normas de ética y cuidado de los animales que dicta la Universidad Autónoma Metropolitana. Todos los reactivos utilizados fueron de Sigma Aldrich (St. Louis, USA), a menos que se indique lo contrario.

Obtención del semen

Se utilizó un semental de la raza Suffolk (cinco años) con fertilidad probada, alojado en las instalaciones del Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Su alimentación consistió en alfalfa achicalada, sales minerales, alimento balanceado para ovino (PURINA®) y agua *ad libitum*. La obtención de semen se realizó dos veces por semana, con el empleo de una vagina artificial ajustada a una temperatura de 60°C y una presión adecuada para la eyaculación en un tubo cónico graduado (12). Únicamente se procesaron los eyaculados con ≥ 80 % de motilidad progresiva.

Dilución del Semen

Una vez obtenido el semen, se diluyó en una proporción de 1:1 con un diluyente comercial (Triladyl® Minitube, Alemania), previamente atemperado a 37°C, y se preparó de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El semen diluido fue transportado al laboratorio y colocado en un baño de María a 37°C para su posterior evaluación.

Una vez diluido el semen, los parámetros evaluados fueron motilidad progresiva, concentración espermática, viabilidad y anomalías morfológicas.

Evaluación de la motilidad progresiva

Se colocó una gota de semen sobre un portaobjetos y se colocó inmediatamente un cubreobjetos, se observó en un microscopio de campo claro (100X) (ZEISS®) con una platina a 37°C. El movimiento progresivo se registró en porcentaje (13).

Concentración espermática

Se determinó mediante el hemocitómetro de Neubauer. Para este procedimiento se realizó una dilución 1:200 y se contaron los espermatozoides de cinco cuadros de la cámara; el valor obtenido se multiplicó por 10^7 para obtener los valores de la concentración en millones de espermatozoides/mL (12).

Evaluación de viabilidad y anormalidades

Se colocó una gota de semen en un portaobjetos y se agregó una gota de solución de tinción eosina-nigrosina. La mezcla obtenida se deslizó en otro portaobjetos, de manera que la tinción fuera uniforme y de película fina (12). Los espermatozoides que no presentaron alguna intensidad de color se consideraron como vivos y los teñidos como muertos. La viabilidad se observó a 400X y anormalidades morfológicas a 1000X. Se contaron 100 espermatozoide por cada evaluación.

Después de las evaluaciones, el semen diluido se ajustó con el diluyente comercial a una concentración final de 100×10^6 espermatozoides/mL (11). A partir de esta última dilución, la solución se dividió en dos partes iguales: la primera porción se utilizó para encapsular el semen y la segunda se usó como grupo control (semen refrigerado con diluyente comercial sin encapsular).

Encapsulación del semen

Para el proceso se utilizaron dos soluciones:

Solución A: semen diluido con alginato de sodio al 1 % (Cat. W201502) en una proporción de 1:1 (concentración final 0,5 %).

Solución B: diluyente comercial con 50 mM BaCl_2 (Cat. 0980-500, J. T. Baker) (10).

El procedimiento de encapsulación se realizó mediante la técnica de goteo a una temperatura de $37,5^\circ\text{C}$ (8, 14). Se tomó la solución A con una jeringa de 1 mL y después se colocó una aguja (25G), con la finalidad de formar una pequeña gota (cápsula) y sumergirse por gravedad en 10 mL de la solución B. Para formar la cápsula fue necesario colocar la aguja a una distancia de 15 cm aproximadamente de la solución B (10). Las cápsulas recién formadas se recuperaron con ayuda de un filtro EmCon™ (Embryon Collection Filter) y se lavaron dos veces con diluyente TRIS (300 mM Tris; 103 mM ácido cítrico; 28 mM fructosa y 100 mL agua destilada). Al final del proceso las cápsulas se suspendieron en 10 mL de diluyente TRIS para su almacenamiento en refrigeración y a temperatura ambiente, respectivamente (Figura 1). Para la evaluación posencapsulación se tomaron cinco cápsulas y se incubaron a $37,5^\circ\text{C}$ en medio TRIS por 30 min en tubos eppendorf. El volumen y la concen-

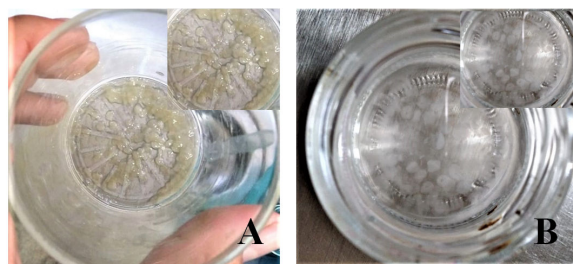


Figura 1. Semen encapsulado de ovino. A) cápsulas recién formadas; B) cápsulas almacenadas por 24, 48 y 72 h. / *Sheep encapsulated semen. A) freshly formed capsules; B) capsules stored for 24, 48 and 72 h.*

tración espermática de las cápsulas se evaluó antes de sumergirlas a la solución B. Se tomaron medidas de las cápsulas recién formadas mediante un vernier para calcular el diámetro. Para determinar motilidad progresiva y la viabilidad se realizó de acuerdo al procedimiento antes mencionado.

Diseño Experimental

Las cápsulas se distribuyeron homogéneamente para ser almacenadas en refrigeración (semen encapsulado y refrigerado a 5°C ; grupo SE-R), o almacenado a temperatura ambiente (semen encapsulado y mantenido a temperatura ambiente que, bajo las condiciones del laboratorio, fue en promedio de 18°C : grupo SE-TA). El semen refrigerado con diluyente comercial sin encapsular se consideró como grupo control. Para determinar la calidad del SE-R y SE-TA, se compararon la motilidad progresiva y la viabilidad con respecto al control a las 24, 48 y 72 h de almacenamiento (27 réplicas); se consideraron los valores iniciales (0 h).

Análisis estadístico

Para determinar si existen diferencias significativas entre la motilidad progresiva y la viabilidad de los diferentes grupos de estudio (control, SE-R y SE-TA), se utilizó la prueba de Chi cuadrado (χ^2), con el nivel de confianza de $p < 0,05$ (15).

RESULTADOS

De los eyaculados obtenidos se obtuvieron los siguientes valores en promedio: $1,55 \pm 1$ mL, $1,895 \pm 716 \times 10^6$ espermatozoides/mL, 80 ± 5 %, 91 ± 5 % y 86 ± 5 %, correspondiendo a: volumen, concentración espermática, motilidad progresiva, espermatozoides vivos y normales, respectivamente.

Se obtuvieron 300 cápsulas por cada eyaculado con volumen, concentración y diámetro aproximados de 10 μL , 1×10^6 espermatozoides/cápsula y 2 mm, respectivamente, las cuales se distribuyeron proporcionalmente para ser almacenadas en refrigeración y a temperatura ambiente.

Tabla 1. Porcentajes de motilidad progresiva de semen encapsulado de ovino almacenado en refrigeración (SE-R) y a temperatura ambiente (SE-TA) por 24, 48 y 72 h. / *Progressive motility percentages of sheep encapsulated semen stored refrigerated (SE-R) and at room temperature (SE-TA) for 24, 48 and 72 h.*

Grupos	Motilidad Progresiva			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Control		52±11 ^{1b}	40±10 ^{1bc}	27±11 ^{1c}
SE-R	80±5 ^a	33±13 ^{2b}	29±11 ^{1bc}	20±11 ^{1c}
SE-TA		19±15 ^{3b}	12±10 ^{2bc}	6±6 ^{2c}

Control: semen refrigerado con diluyente comercial sin encapsular.

SE-R: semen encapsulado y refrigerado a 5°C.

SE-TA: semen encapsulado y almacenado a temperatura ambiente 18°C.

\bar{x} : promedio en porcentaje; D.E. Desviación estándar.

^{1,2,3} Diferente números entre columnas significa diferencia significativa ($p < 0,05$).

^{a,b} Diferente literales entre filas significa diferencia significativa ($p < 0,05$).

El grupo control fue el que obtuvo los mejores resultados en las evaluaciones de la motilidad progresiva. Consecuentemente, la motilidad de los grupos encapsulados, evaluada por día de almacenaje, disminuyó en los grupos encapsulados (SE-R y SE-TA) con respecto al control a las 24 h ($p < 0,05$) (Tabla 1), pero se observaron similitudes entre el grupo SE-R y el control a las 48 h y 72 h ($p > 0,05$), respectivamente. La motilidad del semen encapsulado fue mejor en el grupo SE-R que el SE-TA ($p < 0,05$) durante el periodo de estudio. Por otra parte, la motilidad progresiva disminuyó conforme se prolongó el tiempo de almacenamiento de 0 a 72 h ($p < 0,05$) en los tres grupos de estudio.

Similarmente, el control fue el grupo que obtuvo los mejores resultados en la viabilidad espermática. El grupo control obtuvo mejor viabilidad en comparación con SE-R y SE-TA en las primeras 24 h ($p < 0,05$) (Tabla 2); aunque el porcentaje de espermatozoides vivos fueron similares entre los grupos de SE-R y control a las 48 h y 72 h, respectivamente ($p > 0,05$). Por otra parte, la proporción de espermatozoides vivos en los grupos SE-TA y el control disminuyó conforme se prolongó el periodo de almacenamiento de 0 h a 72 h ($p < 0,05$); mientras que, en el SE-R, la viabilidad se mantuvo similar de 24 a 72 h de almacenamiento ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) menciona que la producción de carne de ovino a nivel mundial fue de 9 310 532 toneladas en 2016 (16), donde la producción ovina tiene una importante actividad económica que contribuye a la producción de carne, leche, cuero y lana a nivel mundial (3). Por lo que se buscan nuevas alternativas para mejorar la eficiencia de la IA e impulsar la producción ovina; una de ellas es la encapsulación de semen. Este método puede permitir la liberación lenta de espermatozoides viables que pueden ser usados para aumentar la longevidad del espermatozoide en el útero (1) y, de esta manera, mejorar los porcentajes de preñeces por IA. Además, la IA con semen encapsulado puede disminuir las inseminaciones de dos-tres a solo una, reduciendo los costos en cuanto a material y trabajo por hembra (8).

Los valores obtenidos en la presente investigación en el momento inicial, con respecto a volumen, motilidad progresiva, concentración espermática, viabilidad y espermatozoides normales fueron similares a los que previamente se han descrito: volumen: 0,3-1,5 mL; motilidad progresiva: 70-90 % (17), concentración espermática: 1500-5000x10⁶ espermatozoi-

Tabla 2. Porcentajes de viabilidad de semen encapsulado de ovino almacenado en refrigeración (SE-R) y a temperatura ambiente (SE-TA) por 24, 48 y 72 h. / *Viability percentages of sheep encapsulated semen stored refrigerated (SE-R) and at room temperature (SE-TA) for 24, 48 and 72 h.*

Grupos	Viabilidad			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Control		57±12 ^{1b}	53±12 ^{1bc}	37±11 ^{1c}
SE-R	91±5 ^a	43±17 ^{2b}	41±14 ^{12b}	32±15 ^{1b}
SE-TA		41±21 ^{2b}	37±17 ^{2bc}	27±15 ^{1c}

Control; Semen refrigerado con diluyente comercial sin encapsular.

SE-R: semen encapsulado y refrigerado a 5°C.

SE-TA: semen encapsulado y almacenado temperatura ambiente 18°C.

\bar{x} : Promedio en porcentaje; D.E. Desviación estándar.

^{1,2,3} Diferente números entre columnas significa diferencia significativa ($p < 0,05$).

^{a,b} Diferente literales entre filas significa diferencia significativa ($p < 0,05$).

des/mL (17-18), viabilidad: 94-97 % (19) y espermatozoides normales: 85-95 % (17).

El volumen y la concentración espermáticas en promedio de las cápsulas obtenidas fueron de 10 μ L y 1×10^6 espermatozoides/cápsula, respectivamente. Estos resultados no se habían reportado en la especie ovina; mientras que, en canino, se describen 7,5 μ L y 1.85×10^6 /cápsula de volumen y concentración, respectivamente (20). El diámetro promedio de cápsulas obtenidas en la presente investigación fue de 2,0 mm; este resultado es similar a las cápsulas (2,3 mm) formadas con semen de bovino y alginato de bario (10). Las cápsulas de alrededor de 2,0 mm pueden ser introducidas en una pajilla de 0,5 mm para facilitar su manejo para la IA. Sin embargo, Faustini *et al.* (21), al trabajar con semen de cerdo, describieron la obtención de cápsulas con diámetros de 5,5 mm y, en el caso de equinos, obtuvieron cápsulas de 6,4 mm (9). Se considera que el tamaño de la cápsula no debe ser un problema para adaptarse a los diferentes dispositivos utilizados para la IA de las especies de producción, como el catéter francés que se utiliza para la IA en porcinos (21).

El grupo control obtuvo los mejores porcentajes de motilidad progresiva por día de almacenaje (24, 48 y 72 h). La motilidad del SE-R disminuyó con respecto al control a las 24 h, pero este resultado fue similar a lo previamente descrito por Thiangthientham *et al.*, (1), donde observaron este efecto en semen encapsulado de ovino almacenado a 4°C por 24 h. Lo anterior puede deberse a que en un inicio las cápsulas no tienen las propiedades adecuadas para proteger a los espermatozoides a bajas temperaturas; sin embargo, el diluyente contiene yema de huevo y sus lipoproteínas de baja densidad protegen a los espermatozoides al choque térmico provocado por bajas temperaturas (22), aunque se ha descrito que la motilidad progresiva fue similar entre el grupo control y el semen de canino encapsulado con alginato de calcio y almacenado a 4°C por 24 h (23).

En cuanto a la motilidad del grupo SE-TA a las 24 h, también disminuyó con respecto al control. Este resultado difiere a lo publicado previamente (1), donde fue similar la motilidad (51 %) de semen encapsulado con BaCl_2 (25 mM) con su respectivo control (57 %), almacenados a 16°C por 24 h. Es posible que la concentración de BaCl_2 utilizada (50 mM) en esta investigación no favoreciera la motilidad del semen encapsulado cuando es almacenado por 24 h a temperatura ambiente (18°C), por lo que se considera que, al disminuir las concentraciones de BaCl_2 , se mitigan los efectos adversos de la encapsulación (1).

A pesar de que la motilidad de SE-R disminuyó a las 24 h, se observó que, a las 48 h y 72 h, los valores obtenidos fueron similares al grupo control. Estos resultados pueden ser de relevancia para considerar el semen encapsulado refrigerado de ovino en los programas de IA, sobre todo si una de sus cualidades es

que permite la liberación controlada de los espermatozoides en el útero, para asegurar cierta concentración de espermatozoides en el oviducto (5) después de 48 y 72 h de almacenamiento. Además, las motilidades observadas a lo largo del almacenamiento (0 a 72 h) mostraron que los grupos de semen encapsulado tuvieron porcentajes similares entre ellos a las 24 y 48 h, respectivamente. De esta manera se confirma que el semen encapsulado puede mantener la motilidad progresiva en las primeras 48 h de almacenamiento, mientras que Falchi *et al.* (24) reportaron una drástica disminución de la motilidad de semen refrigerado de ovino almacenado durante 48 h. Por lo tanto, el semen encapsulado de ovino puede considerarse una gran ventaja para la inseminación de grandes lotes, tal como se utiliza el semen refrigerado sin encapsular (24). Adicionalmente, se obtuvieron resultados similares al utilizar semen encapsulado de canino, donde la motilidad progresiva no difiere a la observada en el grupo control a las 24 y 48 h de almacenamiento (4°C) (23).

Los resultados demuestran que el SE-R tiene mayor motilidad progresiva en comparación con el SE-TA en los tres días de almacenamiento. Estos hallazgos pueden ser explicados por dos eventos que tienen lugar sinérgicamente: primero, que la microencapsulación proporciona cierta protección del material encapsulado a la temperatura (5) y, segundo, la refrigeración reduce el metabolismo de los espermatozoides (24) que, en conjunto, pueden ayudar a conservar la motilidad progresiva con mayor eficiencia que a temperatura ambiente. Previamente se ha evaluado la motilidad progresiva de semen encapsulado de ovino y almacenado a 4°C, pero por 24 h (1); mientras que, en las evaluaciones obtenidas en la presente investigación, se puede mencionar que el SE-R mantiene la motilidad por más de 24 h, lo que constituye una ventaja adicional del semen encapsulado y puede contribuir en los programas de IA al aumentar la fertilidad de aquellas hembras con estros prolongados o de difícil detección (5).

El comportamiento de la viabilidad del semen encapsulado (SE-R y SE-TA), al considerar el día de almacenaje, mostró valores por debajo al control a las 24 h. Estos resultados difieren a lo publicado por Thiangthientham *et al.* (1), quienes al trabajar con semen de ovino y BaCl_2 describen una viabilidad similar a la observada en el grupo control a las 24 h de almacenaje a 4°C y 16°C, respectivamente. Es posible que estas diferencias estén relacionadas con la concentración de BaCl_2 , ya que en la presente investigación se usaron 50 mM, mientras que Thiangthientham *et al.* (1) solo usaron 25 mM, lo que reduce los efectos colaterales de la encapsulación. La concentración de 50 mM de BaCl_2 se ha reportado previamente (10, 14); sin embargo, actualmente con 25 mM de BaCl_2 se obtiene mejor viabilidad en el semen de ovino (1).

Cuando el semen entra en contacto con el alginato, los iones de bario migran hacia fuera de la gota y reaccionan con las cadenas del alginato formando un gel de polímeros alrededor del núcleo líquido (25); posiblemente a mayor concentración de BaCl₂, la pared del gel sea más gruesa, lo que impide el intercambio de nutrientes y metabolitos suficientes para mantener la viabilidad de los espermatozoides encapsulados.

El grupo SE-R mantuvo su viabilidad durante el periodo de almacenamiento de 24 a 72 h, incluso similares al grupo control (48 h y 72 h, respectivamente). Estos resultados posiblemente se deban al efecto sinérgico que tiene lugar entre la cápsula y la refrigeración, que proporciona las condiciones adecuadas para mantener la integridad de la membrana de los espermatozoides; en otras palabras, basándose en la pruebas de viabilidad que se realizaron, el semen encapsulado refrigerado puede mantener las funciones de la membrana del espermatozoide por 48 y 72 h (9), que no se observó cuando se refrigeró semen de caprino a 5°C, donde la viabilidad disminuye conforme aumentaba el tiempo de almacenamiento de 24 a 72 h (26).

Por otra parte, el SE-TA disminuyó la viabilidad conforme avanzaba el tiempo de almacenamiento, lo que coincide con lo descrito previamente para la encapsulación de semen de porcinos, donde la viabilidad disminuyó cuando se alargó el tiempo de almacenamiento (15°C) hasta 72 h (14).

CONCLUSIONES

El semen encapsulado de ovino y almacenado en refrigeración logra mantener la motilidad progresiva entre dos a tres días de almacenamiento. Además, el semen encapsulado refrigerado mantiene la viabilidad durante los tres días de almacenamiento. Sin embargo, los resultados no superan a los obtenidos en el grupo control, por lo que se debe mejorar la técnica de la encapsulación de semen en ovino.

Se recomienda evaluar la calidad del semen encapsulado con diferentes concentraciones de BaCl₂ (50 mM Vs 25 mM). Además, evaluar la integridad del ADN y del acrosoma de semen encapsulado refrigerado y almacenado por tres días.

REFERENCIAS

1. Thiangthientham P, Suwimonteerabutr J, Tharasanit T, Techakumphu M. The optimal divalent cations and storage temperatures for the encapsulation of ram spermatozoa. *Thai J Vet Med*. 2020;50:89-96.
2. Pérez E, Gutiérrez J, Lavin P, Mantecon A. Factores condicionantes de la fertilidad en inseminación artificial en ovejas de Assaf Española: edad de la inseminación, días postparto, producción de leche y concentración de urea en leche. *Tierras*. 2019;28:56-63.
3. Copari J. Efecto del tipo de presentación de celo sobre tasas de preñez y natalidad post inseminación artificial en ovejas Corriedale, Merino y Criollas del C. E. Chuquibanbilla-Puro. [Tesis para optar el título de Médico Veterinario Zootecnista]. Perú. 2021. [en línea] http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/15121/Copari_Lope_Jhon_Brajan.pdf?sequence=1&isAllowed=y
4. Cáceres D. Factores que dificultan la inseminación artificial en la especie ovina y su correlación con las tasas de fertilidad, preñes y parto. Revisión sistemática de literatura. Universidad de Colombia. 2019. [en línea] https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/8120/1/2019_Factores_inseminaci%C3%B3n_artificial.pdf
5. Valenzuela C, Hernández V, Rodríguez F, Carrillo R. Tecnología de encapsulación y su aplicación en ciencias veterinarias. *Av Cienc Vet*. 2013;28:58-75.
6. Aranda A. Maduración de ovocitos equinos por encapsulación. [Tesis para obtener el título de Médico Veterinaria]. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. España. 2017. [en línea] <https://zaguan.unizar.es/record/58026/files/TAZ-TFG-2016-4602.pdf>
7. Weber W, Rimann M, Schafroth T, Witschi U, Fussenegger M. Design of high throughput compatible protocols for microencapsulation, cryopreservation and release of bovine spermatozoa. *J Biotechnol*. 2006;123:155-163.
8. Faustini M. New aspects of boar sperm encapsulation. *Reprod Dom Anim*. 2011;46:52-54.
9. Faustini M, Torre M, Villani S, Munari E, Conte U, Riccardi A, *et al*. Barium alginate controlled release capsules for stallion spermatozoa delivery. In *International Workshop on Bioencapsulation & COST Meeting*. 2006:215-217.
10. Perteghella S, Gaviraghi A, Cenadelli S, Bornaghi V, Galli A, Crivelli B, *et al*. Alginate encapsulation preserves the quality and fertilizing ability of mediterranean Italian wáter buffalo (*Bubalus bubalis*) and Holstein Friesian (*Bos taurus*) spermatozoa after cryopreservation. *J Vet Sci*. 2017;18:81-88.
11. Parraguez H, Blank O, Muñoz C, Latorre E. Inseminación artificial en ovinos. *Monogr Med Vet*. 2000;20.
12. Guillén M. Preñez en ovejas Dohne Merino por inseminación artificial con dos dilutores y tiempos de refrigeración. *Cienc Desarro*. 2019;18:50-57.
13. Porras A, Páramo M. Manual de Prácticas de Reproducción Animal. México: FMVZ UNAM. 2009:74-88.
14. Spinaci M, Bucci D, Chlapanidas T, Vallorani C, Perteghella S, Communod R, *et al*. Boar sperm changes after sorting and encapsulation in barium

- alginate membranes. *Theriogenology*. 2013;79:575-581.
15. Wayne D, Chad C. *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*. United States of America: WILEY. 2013:161-213.
 16. Rojas L. Análisis de los criterios de percepción sobre la calidad de la carne de ovino de los transformadores de Capulhuac, Estado de México. [Tesis para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista], Universidad Autónoma del Estado de México. 2020. <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/109093/Tesis%20Versi%C3%B3n%20Final.%20Luis%20Manuel%20Rojas%20Gonz%C3%A1lez%202022-06-2020.pdf?sequence=1>
 17. Muñoz A. Correlación de la circunferencia escrotal con volumen de eyaculado y concentración espermática en cuatro razas ovinas. [Tesis para obtener el título de Médico Veterinaria Zootecnista]. Universidad Autónoma del Estado de México. México. 2019. [en línea] http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/110406/Tesis_%20Alma%20Sofia%20sin%20dedi%20y%20agra.pdf?sequence=5
 18. Paredes J. Efectos de la temperatura, humedad e índice temperatura-humedad sobre la calidad seminal de carneros. [Tesis para obtener el título de Medica Veterinaria Zootecnista]. Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México, México. 2019. [en línea] http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/110461/Tesis%20Jocelyn_Efectos%20de%20la%20temperatura%2C%20humedad%20e%20C3%ADndice%20temperatura-humedad%20sobre%20la%20calidad%20seminal%20en%20carneros_removed.pdf?sequence=7
 19. Pabón H, Pulido M. Circunferencia escrotal como criterio de selección para carneros de reemplazo. *Pensam Acci*. 2021;31:52-73.
 20. Lakde C, Patil M, Sahatpure S, Gawande A, Umesh K. Standard protocol for encapsulation of canine semen. *Int J Sci Environ Technol*. 2018;7:1296-1300.
 21. Faustini M, Torre M, Stacchezzini S, Norberti R, Consiglio A, Porcelli F, *et al*. Boar spermatozoa encapsulated in barium alginate membranes: a microdensitometric evaluation of some enzymatic activities during storage at 18°C. *Theriogenology*. 2004;61:173-184.
 22. Huamanñahui A. Evaluación del dilutor TRIS con yema de huevo de codorniz antes y después de la congelación de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem. [Tesis para obtener el grado de Médico Veterinario Zootecnista]. Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac. Perú. 2017. [en línea] http://repositorio.unamba.edu.pe/bitstream/handle/UNAMBA/657/T_0383.pdf?sequence=1
 23. Shah S, Nagano M, Yamashita Y, Hishinuma M. Microencapsulation of canine sperm and its preservation at 4°C. *Theriogenology*. 2010;73:560-567.
 24. Falchi L, Galleri G, Zedda M, Pau S, Bogliolo L, Ariu F, *et al*. Liquid storage of ram semen for 96 hours: effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. *Livest Sci*. 2018;207:1-6.
 25. Perteghella S, Vigani B, Crivelli B, Spinaci M, Galeati G, Bucci D, *et al*. Sperm encapsulation from 1985 to date: technology evolution and new challenges in swine reproduction. *Reprod Dom Anim*. 2015;50:98-102.
 26. Gangwar C, Kharche S, Mishra A, Saraswat S, Kumar N, Sikarwar A. Effect of diluent sugars on capacitation status and acrosome reaction of spermatozoa in buck semen at refrigerated temperature. *Trop Anim Health Prod*. 2020;52:3409-3415.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores: **José Ernesto Hernández Pichardo:** contribuyó en el diseño de este estudio, análisis de los datos, interpretación y redacción del manuscrito. **Arianna Miranda Martínez:** contribuyó en la encapsulación del semen de ovino. **José Luis Rodríguez Suastegui:** contribuyó en el análisis de los datos, interpretación y redacción del manuscrito. Todos los autores revisaron y aceptaron la versión final del manuscrito.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)