

Inseminación artificial con semen congelado en burros

Jéssica Machado Dornelles, Ana Paula Flores Bragulat, Carolina Alonso, Luis Losinno

Laboratorio de Producción Equina, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

*jemdornelles@hotmail.com

Resumen

Los burros (*Equus asinus africanus*) se han utilizado durante miles de años para trabajo en zonas rurales, principalmente para transporte de cargas y también para la producción de mulas (*Equus mulus*) y de leche. El riesgo de extinción de varias especies regionales ha estimulado el uso de biotecnologías reproductivas como la congelación de semen para inseminación artificial (IA). El objetivo de este trabajo es describir los diferentes protocolos de criopreservación de semen de burro, los puntos críticos en el manejo de la burra y la técnica de inseminación con semen congelado; para poder establecer una propuesta del estado de conocimiento actual para la utilización de esta biotecnología en la especie. Las tasas de preñez por ciclo utilizando IA con semen congelado reportadas hasta el momento varían entre 11 y 61,5%. Estudios *in vitro* demostraron mejor calidad del semen post calentamiento cuando se realizó una estabilización de la temperatura previa a la congelación, utilizando diluyentes de semen a base de lactosa suplementado con calostro de burra, y el semen envasado en pajuelas de 0,25mL. El factor hembra es un punto relevante en la aplicación de la técnica debido a la respuesta inflamatoria desarrollada por la burra post inseminación. Más estudios *in vivo* son necesarios para esclarecer la interacción semen-endometrio y potencialmente desarrollar técnicas que contribuyan a una mayor eficiencia de las tasas de preñez por ciclo.

Palabras clave: burro, semen congelado, inseminación artificial

Abstract

Donkeys (*Equus africanus asinus*) have been used for years for work in rural areas, for transport and currently are also used for mules (*Equus mulus*) and milk production. The risk of extinction of some local breeds has stimulated the use of reproductive biotechnologies such as semen cryopreservation for artificial insemination (AI). The objective of this work is to describe the cryopreservation protocols alternatives for donkey semen, the critical points in jennies management and insemination techniques; and to describe briefly the state of the art for this biotechnology in donkeys. Reported per cycle pregnancy rates with donkey frozen semen vary between 11 and 61,5%. *In vitro* studies showed better post-thaw semen quality when temperature stabilization was performed prior to freezing; using lactose-based semen diluents supplemented with donkey colostrum; and semen conditioned in 0,25mL straws. The female factor is a main point in the application of artificial insemination with frozen semen due to the inflammatory response after insemination. Further *in vivo* studies are needed to clarify the semen-endometrial interaction and potentially develop techniques that contribute to greater efficiency of pregnancy rates per cycle.

Key words: donkey, frozen semen, artificial insemination

Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental. Facultad de Ciencias Agrarias. UNLZ. Vol. 7 (4) 2020: 157-166

Introducción

Los burros (*Equus africanus asinus*) se han utilizado durante miles de años para trabajo en zonas rurales, principalmente para transporte de cargas. También sirven para la producción de mulas (*Equus mulus*), que pueden ser utilizadas como transporte, carga, trabajos rurales en zonas montañosas y áridas, cuidadoras de manadas equinas frente a riesgo de predadores (pumas) y también como receptoras en programas comerciales de transferencia de embriones (Canisso *et al.*, 2019; Camargo *et al.*, 2020; Correa y Losinno, 2020). Por otro lado la producción de leche de burra está en vías de desarrollo en nuestro país para su comercialización, siendo una posible alternativa para los niños que tienen alergia a proteínas específicas de la leche de vaca (Martini *et al.*, 2018; Losinno y Flores, 2019; Nayak *et al.*, 2020).

El riesgo de extinción de algunas especies, como, *Equus asinus somaliensis* y *Equus hemionus*, e, inclusive, la situación crítica de la población de numerosas razas regionales de asnos domésticos en muchos países (especialmente europeos) ha sido analizada y publicada en los reportes de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2020). La utilización de biotecnologías reproductivas es una herramienta para contribuir en los programas de control y recuperación de la especie y para aumentar la producción de los mismos para los diversos objetivos mediante inseminación artificial con semen fresco de burros (Canisso *et al.*, 2019).

Utilizando semen de burro congelado Trimeche *et al.* (1998) obtuvieron una variación entre 29 a 50% en las tasas de preñez, otros estudios lograron tasas de 0%, 11%, 28% (Oliveira *et al.*, 2006; Vidament *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2016). La mayor tasa de preñez reportada hasta el momento fue de 61,5%, por Rota *et al.* (2012) utilizando semen criopreservado en INRA-96 con glicerol y re-diluido en plasma seminal homólogo luego del calentamiento. Ante la falta de repetitividad a nivel comercial de la tasa de preñez publicada en el último estudio mencionado, la reproducción asistida en burros enfrenta un problema crítico al momento de diseñar y ejecutar programas de mejoramiento genético, por ejemplo en la producción de leche, ya que imposibilita el movimiento de material genético, como lo es el semen crio preservado, entre países y continentes, dificultando la posibilidad de realizar ensayos de cruzamientos entre diferentes líneas productivas.

Diversos diluyentes pueden ser utilizados para la congelación de semen de burro, se han testeado diluyentes a base de leche suplementados con yema de huevo, con calostro de burra o de yegua. Investigadores evaluaron la respuesta a la crio preservación basándose en parámetros espermáticos como motilidad total, integridad del acrosoma, velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL), logrando resultados entre 51,3 – 66,2%, 55,5 – 84,6%, 70,4 – 114,4µm/s, 38,4 – 98,2µm/s, respectivamente (Acha *et al.*, 2016; Demyda-Peyrás *et al.*, 2018; Álvarez *et al.*, 2019a; Álvarez *et al.*, 2019b; Diaz-Jiménez *et al.* 2019). Los resultados fueron significativamente superiores cuando utilizaron diluyente a base de lactosa suplementado con calostro de burra (Álvarez *et al.*, 2019a; Álvarez *et al.*, 2019b) versus diluyentes suplementados con yema de huevo y sacarosa (Diaz-Jimenez *et al.* 2019).

El uso de semen crio preservado de burro es todavía un desafío para la reproducción asistida. El objetivo de este trabajo es describir las alternativas de protocolos existentes para la crio preservación de semen de burro, los puntos críticos en el manejo de la burra y la técnica de inseminación con semen congelado; para contribuir a esclarecer el estado de conocimiento actual sobre la utilización de esta biotecnología en la especie.

Diluyentes

Durante años la inclusión de yema de huevo de gallina doméstica en los diluyentes ha sido utilizada para la crío preservación de semen de mamíferos (Alvarenga *et al.*, 2016), incluyendo otras especies de équidos, como los caballos, en los cuales la mayoría de los diluyentes para crío preservación contienen yema de huevo (Gibb y Aitken, 2016). El uso de estas sustancias que contienen lipoproteínas de baja densidad durante el proceso de congelación tiene como objetivo prevenir la formación de cristales de hielo (Hu *et al.*, 2010), mientras que los crío protectores tienen la función de proteger el espermatozoide del estrés térmico (Páez, 2016).

Ferrante *et al.* (2018) analizaron la eficacia de la yema de huevo en la congelación de semen de burro utilizando dos diluyentes: Kenney (diluyente a base de leche descremada y glucosa) y EDTA-glucosa, ambos con 7% de dimetilformamida, 11% de lactosa, 0,5% de Equex y 20% de yema de huevo previamente centrifugada y sin centrifugar. La centrifugación de la misma causó daños a los espermatozoides, resultando en mejores parámetros de motilidad, funcionalidad de membrana e integridad del acrosoma cuando se utilizó yema de huevo sin centrifugar (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros espermáticos evaluados de semen congelado de burro con diferentes diluyentes.

Diluyente	Motilidad total (%)	Motilidad progresiva (%)	Funcionalidad de membrana e integridad del acrosoma
Kenney – Y	41 ± 6 ^a	34 ± 6 ^a	47 ± 6 ^a
Kenney – CY	13 ± 3 ^b	10 ± 3 ^b	18 ± 2 ^b
EDTA – Y	40 ± 4 ^a	35 ± 4 ^a	47 ± 3 ^a
EDTA – CY	0,5 ± 0,3 ^b	0,4 ± 0,2 ^b	10 ± 2 ^a

Adaptada de Ferrante *et al.*, 2020. Kenney-Y: Diluyente Kenney con yema de huevo no centrifugada; Kenney-CY: Diluyente Kenney con yema de huevo centrifugada; EDTA-Y: Diluyente EDTA con yema de huevo no centrifugada; EDTA-CY: Diluyente EDTA con yema de huevo centrifugada; ^{a,b} diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (P<0,5).

En estudios realizados recientemente, se demostró que el diluyente suplementado con 20% de calostro de burra tuvo mejores resultados en motilidad total, vitalidad, integridad de membrana plasmática y parámetros de velocidad, cuando se comparó con los diluyentes con yema de huevo clarificada (Álvarez *et al.*, 2019b) y con diluyente suplementado con calostro de yegua (Tabla 2) (Álvarez *et al.*, 2019a).

Es importante considerar que los componentes biológicos como calostro y yema de huevo no son químicamente definidos, por lo que su composición es inestable y muy variable lo que condiciona la repetibilidad de los resultados y su utilización de manera empírica hasta que se determine cuáles y en qué medida son los principios químicos relacionados a la crioprotección espermática.

RESEÑA

Machado Dornelles *et al.*

Inseminación artificial [...]

Tabla 2. Valores medios de la calidad del semen de burro post calentamiento utilizando diferentes extensores.

Diluyente a base de lactosa suplementado	Calostro de yegua	Calostro de burra	Yema de huevo
Motilidad total (%)	41,21 ± 8,1 ^b	58,3 ± 4,8 ^a	45,9 ± 7,3 ^b
Vitalidad (%)	41,27 ± 6,1 ^b	59,4 ± 5,9 ^a	33,5 ± 6,9 ^c
HOST (%)	18,27 ± 3,7 ^b	31,4 ± 3,2 ^a	15,7 ± 4,9 ^b
VLC µm/s	55,02 ± 4,9 ^b	70,4 ± 5,2 ^a	45,4 ± 8,1 ^c
VSL µm/s	22,2 ± 6,4 ^b	38,4 ± 6,8 ^a	19,3 ± 7,0 ^b
VAP µm/s	32,1 ± 3,5 ^b	50,2 ± 4,2 ^a	28,8 ± 4,6 ^b
LIN (%)	35,3 ± 5,1 ^b	53,2 ± 3,9 ^a	40,6 ± 3,2 ^b
STR (%)	64,4 ± 4,8 ^b	75,5 ± 5,0 ^a	64,3 ± 4,7 ^b
WOB (%)	59,2 ± 2,8 ^b	70,1 ± 2,7 ^a	62,8 ± 2,6 ^b

Adaptada de Álvarez *et al.*, 2019a. VLC, velocidad curvilínea; VSL, velocidad en línea recta; VAP, velocidad media del trayecto; LIN, linealidad; STR, rectitud; WOB, oscilación. Las diferentes letras en superíndice (^a, ^b, ^c) indican diferencias significativas ($p < .05$).

Los crio protectores, permeables y no permeables, tienen la función de proteger al semen del estrés térmico de la crio preservación. En relación al efecto de crio protectores permeables, se demostró que hay una protección mayor a los daños ocasionados por la crio preservación cuando se sustituye el glicerol por 1% de etilenglicol o 2,5% de dimetilformamida (Acha *et al.*, 2016). Incluso la utilización de diluyente con etilenglicol suplementado con 60mM de glutamina o taurina demostró mejores parámetros espermáticos post calentamiento (Bottrel *et al.*, 2018). El uso de crio protectores no permeables, como 0,25M de sacarosa combinado con 1% de albúmina sérica bovina, proporciona mejores parámetros de integridad de la membrana espermática en burros fértiles (Díaz-Jiménez *et al.*, 2018a), mientras que en la congelación de semen de burros sub fértiles los mejores resultados fueron encontrados con la utilización de glicerol (1001 mOm/kg) (Díaz-Jiménez *et al.*, 2019b).

Antioxidantes

El plasma seminal de los burros se compone de proteínas, ácidos grasos, vitamina C, vitamina E (Páez, 2016). Otras sustancias fueron analizadas en el perfil bioquímico del plasma seminal y correlacionadas con los parámetros seminales de volumen, concentración y motilidad (Vyvial *et al.*, 2019). Además el plasma seminal contiene componentes enzimáticos, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y principalmente superóxido dismutasa, con acción antioxidante, la cual se ha demostrado estar relacionada con la tolerancia del semen a la congelación (Papás *et al.*, 2020).

La adición de antioxidantes al semen antes de la crio preservación ha sido postulada y utilizada desde hace muchos años en mamíferos y podría ser una alternativa para obtención de mejores resultados en la congelación de semen de burro así como los resultados obtenidos en equinos (Seifi-Jamadi *et al.*, 2016; Ghallab *et al.*, 2017),.

Kumar *et al.* (2019) agregaron 0,9g/L de ácido ascórbico + 2,5mM de glutatión reducido y los resultados *in vitro* con semen de burro demostraron una mejor calidad espermática post calentamiento con valores de motilidad progresiva de 56,43%, HOST 43,42%, integridad del acrosoma 83,50% comparados a 42,11%, 30,11%, 76,27% del grupo control, respectivamente.

RESEÑA

Machado Dornelles *et al.*

Inseminación artificial [...]

Otros antioxidantes como vitamina C y E, mejoraron la calidad del semen congelado de burro cuando fueron agregados al diluyente en concentraciones de 400mg/L y 600mg/L, respectivamente. Un resultado aún mejor fue logrado cuando las dos vitaminas fueron combinadas en una concentración de 200mg/L (Yu *et al.*, 2019).

Métodos de crío preservación

Distintas curvas de congelación son utilizadas para la criopreservación de semen de burro. Demyda-Peyrás *et al.* (2018) evaluaron algunos parámetros morfológicos y funcionales estándar de semen calentado utilizando un diluyente a base de leche con 5% de yema de huevo y 5% de glicerol, y distintos protocolos de descenso térmico:

Congelación lenta: el semen fue enfriado a $-0,13^{\circ}\text{C}/\text{min}$ durante 2h en un recipiente para refrigeración de semen equino (Equitainer™, Hamilton-Thorne Research, Danvers, EEUU), después acondicionados en pajuelas de 0,5mL, depositados en una grilla durante 5 minutos en vapor de nitrógeno a 2,5cm sobre el nivel del nitrógeno líquido en un recipiente y luego sumergidos en nitrógeno líquido.

Refrigeración regulada pre congelamiento: el semen fue envasado en pajuelas de 0,5mL y refrigerado utilizando una curva de refrigeración de 3 etapas: 1) $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde 25°C a 22°C ; 2) $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde 22°C a 10°C ; y 3) $-0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde 10°C a 4°C ; con una duración aproximada de 73 min, luego las pajuelas fueron depositadas en una grilla durante 5 minutos en vapor de nitrógeno a 2,5cm sobre el nivel del nitrógeno líquido en un recipiente y finalmente sumergidas en nitrógeno líquido.

Congelación rápida: el semen fue diluido, envasado en pajuelas de 0,5mL e inmediatamente después sumergido en nitrógeno líquido.

El método de congelación rápida fue el que causó mayores daños a los espermatozoides. Los protocolos que, previamente a la congelación, tuvieron una refrigeración regulada (estabilización del semen a 4°C , durante aproximadamente 1h), presentaron los mejores parámetros de motilidad espermática, morfología, integridad de la membrana espermática y del acrosoma.

Oliveira *et al.* (2016) compararon dos métodos de criopreservación de semen de burro utilizando diluyente a base de lactosa con 10% de yema de huevo, 1% de glicerol y 4% de metilformamida. Todas las muestras fueron previamente enfriadas por 20 min a 5°C y luego congeladas con el método automatizado siguiendo un protocolo de descenso térmico de: 1) $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde 5°C a -60°C y 2) $8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde -60°C a -100°C , o con el método convencional con caja térmica, donde demostraron que el método de congelación automatizado con una curva de descenso térmico precisa y repetible, es más indicado comparado al método convencional con caja térmica por presentar mejores resultados de motilidad progresiva post calentamiento ($44,5\pm 3,9\%$ y $39,9\pm 2,6\%$, respectivamente).

Se ha ensayado congelar el semen en pajuelas de 0,25mL, 0,5mL o esferas (suspensiones de 30 μl depositadas en nitrógeno líquido) y los mejores resultados en cuanto a motilidad, integridad de la membrana y del acrosoma post calentamiento fueron obtenidos con protocolos de enfriamiento controlado previo utilizando pajuelas de 0,25mL (Diaz-Jimenez *et al.*, 2018b; Diaz-Jimenez *et al.*, 2019a), sin diferencias relacionadas a los diluyentes utilizados (Diaz-Jimenez *et al.*, 2017).

El factor hembra: la burra

La inseminación artificial con semen fresco en burras se utiliza desde hace más de 50 años con tasas de preñez entre 60 y 80% (Svendsen, 2008), recientemente ha sido reportada una tasa de preñez de 86% (Canisso *et al.*, 2019). A la fecha, no se ha publicado la obtención de tasas de preñez similares a las yeguas y repetibles cuando se utiliza semen congelado de burro para la inseminación en burras. Las diferencias anatómicas del sistema reproductivo entre las yeguas y burras pueden influir en estos resultados, dado que el cérvix es más largo y tortuoso y, el posicionamiento de la vulva y vestíbulo son factores predisponentes para las endometritis post inseminación artificial en burras (Miró & Papas, 2018). Cuando se utilizó semen congelado de burro, se obtuvo una tasa de preñez significativamente menor en burras que en yeguas (11% y 36%, respectivamente) (Vidament *et al.*, 2009). Una tasa de preñez de 28,26% fue lograda cuando se realizó la técnica de inseminación profunda en el cuerno uterino (Oliveira *et al.* 2016).

Las burras inseminadas con semen congelado, utilizando dosis de 500×10^6 espermatozoides, mostraron una respuesta inflamatoria con mayor reclutamiento de neutrófilos a las 6 que a las 10 horas post inseminación (Rota *et al.*, 2012). La respuesta inflamatoria uterina post inseminación puede ser modulada por el plasma seminal, disminuyendo su duración, pero no su intensidad, a través de la disminución de activación de complemento, quimiotaxis de PMN y la fagocitosis (De Barros, 2019).

En burras no está demostrado que la modulación desencadenada por el plasma seminal disminuye directamente el número de PMN pero sí que reduce la expresión de proteína ciclooxygenasa-2 (COX-2) (Vilés *et al.*, 2013b). Incluso se demostró que la re-dilución de semen congelado en el plasma seminal aumentó la concentración de PMN en el lavado uterino cuando se comparó con semen congelado y semen re-extendido en diluyente enriquecido con 2% de yema de huevo y 2,2% de glicerol. El mismo semen que se re extendió en plasma seminal llevó a una tasa de preñez de 61,5% versus 23,1% de tasa de preñez de burras inseminadas con semen re-extendido en diluyente (Rota *et al.*, 2012).

Una alternativa que se propone para mejorar las tasas de preñez o al menos el grado de inflamación endometrial en la burra, es el uso parenteral del antiinflamatorio no esterooidal ketoprofeno el cual disminuiría la expresión de COX-2, siendo una opción para el tratamiento de endometritis inducidas por inseminación con semen congelado (Vilés *et al.*, 2013a).

Conclusiones

Diversas alternativas han sido estudiadas en cuanto a la crio preservación de semen de burro, algunas de estas han sido extrapoladas de los métodos de crio preservación utilizados en equinos, como el uso de diluyente suplementado con yema de huevo que demostró, *in vitro*, resultados inferiores que el diluyente suplementado con calostro de burra, aunque por su condición de componentes biológicos su composición química exacta es desconocida, inestable y variable, lo que condiciona la repetibilidad de los resultados, siendo así necesario más estudios para determinar cuáles son los principios químicos relacionados a la crioprotección espermática.

En la elección de un crio protector, mejores resultados fueron logrados cuando se sustituyó el glicerol por etilenglicol o dimetilformamida, además los parámetros de integridad de membrana mejoraron cuando se utilizaron crioprotectores no permeables. Ante tales resultados podríamos inferir que el semen de burro no se adapta al mismo proceso de crio

RESEÑA

Machado Dornelles *et al.*

Inseminación artificial [...]

preservación utilizado para el semen de padrillo, además de eso pruebas de diluyentes deben ser hechas en relación a cada burro, visto que cada individuo responde de manera distinta.

Otra alternativa extrapolada de la crio preservación de semen equino es la adición de antioxidantes, para algunos de ellos ya se obtuvieron resultados *in vitro* donde el semen post calentamiento demostró una mejor calidad.

En cuanto al protocolo de congelación, pajuelas de 0,25mL y el método automatizado con una estabilización de temperatura previa a la congelación causó menores daños a los espermatozoides, quizás por tratarse de un descenso de temperatura más paulatino.

Además de buscar un método de crio preservación adecuado hay que tener en cuenta el tipo de técnica de inseminación y acompañar la respuesta inflamatoria generada por la burra ante la misma. Inducción controlada de la ovulación, inseminación profunda y lavajes uterinos pueden ser procedimientos que elevarían las tasas de preñez, técnicas que son comúnmente utilizadas en yeguas, pero que pueden ser de difícil realización cuando trabajamos con razas de burras más chicas debido a su estructura anatómica.

Aunque fueron alcanzados buenos resultados *in vitro*, es necesario realizar más estudios *in vivo* para poder esclarecer la interacción semen-endometrio, la respuesta inflamatoria generada en la burra y finalmente la obtención de mejores tasas de preñez.

Bibliografía

Acha D, Hidalgo M, Ortiz I, Gálvez MJ, Carrasco JJ, Gómez-Arrones V, Dorado J. (2016). Freezability of Andalusian donkey (*Equus asinus*) spermatozoa: effect of extenders and permeating cryoprotectants. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(12), 1990-1998.

Alvarenga MA, Papa FO, Neto CR. (2016). Advances in stallion semen cryopreservation. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 32(3), 521-530.

Álvarez C, González N, Luño V, Martínez F, Gil L. (2019^a). Alternatives in Donkey semen cryopreservation: Mare vs. Jenny Colostrum. *Reproduction in Domestic Animals*, 54, 94-97.

Álvarez C, Luño V, González N, Gil L. (2019^b). A preliminary study on the use of jenny colostrum to improve quality in extenders for freezing donkey semen. *Cryobiology*, 87, 110-114.

Bottrel M, Acha D, Ortiz I, Hidalgo M, Gósalvez J, Camisão J, Dorado J. (2018). Cryoprotective effect of glutamine, taurine, and proline on post-thaw semen quality and DNA integrity of donkey spermatozoa. *Animal reproduction science*, 189, 128-135.

Camargo CE, Rechsteiner SF, Macan RC, Kozicki LE, Gastal MO, Gastal EL. (2020). The mule (*Equus mulus*) as a recipient of horse (*Equus caballus*) embryos: Comparative aspects of early pregnancy with mares. *Theriogenology*, 145, 217-225.

Canisso IF, Panzani D, Miró J, Ellerbrock RE. (2019). Key Aspects of Donkey and Mule Reproduction. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 35(3), 607-642.

De Barros MRM. (2019). The Ex Vivo and in Vitro Transcriptomic Profiles of Equine Endometrium Using an Explant Model to Further Study Endometritis. Aberystwyth University, tesis de doctorado.

RESEÑA

Machado Dornelles *et al.*

Inseminación artificial [...]

Demyda-Peyrás S, Bottrel M, Acha D, Ortiz I, Hidalgo M, Carrasco JJ, Gómez-Arrones V, Gósalvez J, Dorado J. (2018). Effect of cooling rate on sperm quality of cryopreserved Andalusian donkey spermatozoa. *Animal reproduction science*, 193, 201-208.

Diaz-Jimenez M, Dorado J, Consuegra C, Ortiz I, Pereira B, Carrasco JJ, Gomez-Arrones V, Domingo A, Hidalgo M. (2019a). Optimization of donkey sperm vitrification: Effect of sucrose, sperm concentration, volume and package (0.25 and 0.5 mL straws). *Animal reproduction science*, 204, 31-38.

Diaz-Jimenez M, Dorado J, Ortiz I, Consuegra C, Pereira B, Gonzalez-De Cara CA, Aguilera R, Mari G, Mislei B, Love CC, Hidalgo M. (2018a). Cryopreservation of donkey sperm using non-permeable cryoprotectants. *Animal reproduction science*, 189, 103-109.

Diaz-Jimenez M, Dorado J, Pereira B, Consuegra C, Ortiz I, Hidalgo M. (2019b). Is sperm cryopreservation in absence of permeable cryoprotectants suitable for subfertile donkeys. *Reproduction in Domestic Animals*, 54, 102-105.

Diaz-Jimenez M, Dorado J, Pereira B, Ortiz I, Consuegra C, Bottrel M, Ortiz E, Hidalgo M. (2018b). Vitrification in straws conserves motility features better than spheres in donkey sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 53, 56-58.

Diaz-Jimenez M, Pereira B, Ortiz I, Consuegra C, Partyka A, Dorado J, Hidalgo M. (2017). Effect of different extenders for donkey sperm vitrification in straws. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 55-57.

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2020). Sistema de Información sobre la Diversidad de los Animales Domésticos (DAD-IS). Recuperado de: <http://www.fao.org/dad-is/es/>

Ferrante A, Castex C B, Bruno S, Arraztoa C, Plaza J, Neild D, Miragaya M. (2018). Comparison of Whole and Centrifuged Egg Yolk Added to Kenney's and Lactose-EDTA Extenders for Donkey Semen Cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 65, 12-18.

Ghallab AM, Shahat AM, Fadl AM, Ayoub MM, Moawad AR. (2017). Impact of supplementation of semen extender with antioxidants on the quality of chilled or cryopreserved Arabian stallion spermatozoa. *Cryobiology*, 79, 14-20.

Gibb Z, Aitken RJ. (2016). Recent developments in stallion semen preservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 43, S29-S36.

Hu J, Li Q, Zan L, Jiang Z, An J, Wang L, Jia Y. (2010). The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing–thawing. *Animal reproduction science*, 117, 11-17.

Kumar P, Kumar R, Mehta JS, Chaudhary AK, Ravi SK, Mehta SC, Ansari MM, Legha RA, Tripathi BN, Talluri TR. (2019). Ameliorative Effect of Ascorbic Acid and Glutathione in Combating the Cryoinjuries During Cryopreservation of Exotic Jack Semen. *Journal of equine veterinary science*, 81, 102796.

Losinno L, Flores AB. (2019). Leche de burra en casos de alergia a la leche de vaca en humanos. *Un desafío para Argentina*. *Ab Intus*, 3(2), 81-99.

RESEÑA

Machado Dornelles *et al.*

Inseminación artificial [...]

Martini M, Altomonte I, Licitra R, Salari F. (2018). Nutritional and nutraceutical quality of donkey milk. *Journal of Equine Veterinary Science*, 65, 33-37.

Miró J, Papas M. (2018). Post artificial insemination endometrial inflammation and its control in donkeys. *Journal of Equine Veterinary Science*, 65, 38-43.

Nayak CM, Ramachandra CT, Nidoni U, Hiregoudar S, Ram J, Naik N. (2020). Physico-chemical composition, minerals, vitamins, amino acids, fatty acid profile and sensory evaluation of donkey milk from Indian small grey breed. *Journal of Food Science and Technology*, 1-8.

Oliveira JV, Alvarenga MA, Melo CM, Macedo LM, Dell'aqua JAJ, Papa FO. (2006). Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. *Animal reproduction science*, 82-84.

Oliveira JV, Oliveira PVL, Melo e Oña CM, Guasti PN, Monteiro GA, da Silva YFRS, Papa PM, Alvarenga MA, Dell'Aqua Junior JA, Papa FO. (2016). Strategies to improve the fertility of fresh and frozen donkey semen. *Theriogenology*, 85(7), 1267-1273.

Ortiz I, Dorado J, Morrell JM, Crespo F, Gosálvez J, Gálvez MJ, Acha D, Hidalgo M. (2015). Effect of single-layer centrifugation or washing on frozen–thawed donkey semen quality: Do they have the same effect regardless of the quality of the sample? *Theriogenology*, 84(2), 294-300.

Páez, JDM. (2016). Congelación de sêmen de asnos criollos colombianos empleando diferentes alternativas de suplementación en los diluyentes. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Colombia.

Papas M, Catalan J, Barranco I, Arroyo L, Bassols A, Yeste M, Miró J. (2020). Total and specific activities of superoxide dismutase (SOD) in seminal plasma are related with the cryotolerance of jackass spermatozoa. *Cryobiology*, 92, 109-116.

Rota A, Panzani D, Sabatini C, Camillo F. (2012). Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. *Theriogenology*, 78(8), 1846-1854.

Seifi-Jamadi A, Kohram H, Zareh-Shahne A, Dehghanizadeh P, Ahmad E. (2016). Effect of various concentrations of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on freezing capacity of Turkman stallion sperm. *Animal reproduction science*, 170, 108-113.

Svendsen ED. (2008). The professional handbook of the donkey. Pag 331. Yatesbury: Whittet Books Limited.

Trimeche A, Renard P, Tainturier D. (1998). A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. *Theriogenology*, 50(5), 793-806.

Vidament M, Vincent P, Martin FX, Magistrini M, Blesbois E. (2009). Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Animal reproduction science*, 112(1-2), 22-35.

Vilés K, Rabanal R, Rodríguez-Prado M, Miró J. 2013a. Effect of ketoprofen treatment on the uterine inflammatory response after AI of jennies with frozen semen. *Theriogenology*, 79(7), 1019-1026.

RESEÑA

Machado Dornelles *et al.*

Inseminación artificial [...]

Vilés K, Rabanal R, Rodríguez-Prado M, Miró, J. (2013b). Influence of seminal plasma on leucocyte migration and amount of COX-2 protein in the jenny endometrium after insemination with frozen–thawed semen. *Animal reproduction science*, 143(1-4), 57-63.

Vyvial M, Horáčková E, Sedlinská M, Jánová E, Krisová S, Mráčková M. (2019). Determination of selected components in seminal plasma of donkey stallions and their correlation to semen quality parameters. *Acta Veterinaria Brno*, 88, 377-384.

Yousef MS, López-Lorente AI, Diaz-Jimenez M, Consuegra C, Dorado J, Pereira B, Ortiz I, Cárdenas S, Hidalgo M. (2020). Nano-depletion of acrosome-damaged donkey sperm by using lectin peanut agglutinin (PNA)-magnetic nanoparticles. *Theriogenology*.

Yu X, He S, Wang L, Kang M, Zhu Y, Wang S, Sun X. (2019). Effects of Vitamin C and Vitamin E on Cryopreservation of Guanzhong Donkey Semen. *Pakistan Journal of Zoology*, 51(5), 1777-1781.