



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**EVALUACIÓN DE INDUCTORES DE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA EN SEMEN
CRIOPRESERVADO DE ASNOS (*Equus asinus*)**

Luis Fernando Mendoza Arenas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Área Curricular de Biotecnología
Medellín, Colombia

2022

**EVALUACIÓN DE INDUCTORES DE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA EN SEMEN
CRIOPRESERVADO DE ASNOS (*Equus asinus*)**

Luis Fernando Mendoza Arenas

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Biotecnología

Director (a):

Giovanni Restrepo Betancur

Zootecnista, Médico Veterinario, M.Sc y Ph.D en Biotecnología

Línea de Investigación:

Reproducción Animal

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Área Curricular de Biotecnología

Medellín, Colombia

2022

Dedicado a:

A mi papá, quien con su ejemplo me enseñó que, con disciplina, fortaleza y constancia, se puede llegar más lejos, a mi mamá, quien siempre fue, es y será mi profesora de vida y a mis hermanos gracias por enseñarme el significado de compartir. ¡Los amo!

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

A handwritten signature in black ink, appearing to be the initials 'JMA' with a stylized flourish.

Fecha 6/05/2022

Agradecimientos

Deseo agradecerme inicialmente a mí mismo, por mantener la perseverancia que ha caracterizado a toda mi familia, por querer ir más allá de lo que está en mi mente.

A Kelly Vanessa Zapata Carmona por ser mi apoyo incondicional, mi consejera y mi aliento de moral en cada etapa de esta aventura.

Agradezco de la forma más sincera al profesor Giovanni Restrepo, por darme la oportunidad, por creer en mis capacidades y sobre todo por ser mi guía y poner a disposición todo su conocimiento.

A Juan David Montoya, por enseñarme, a los diferentes propietarios de los burros por apoyar el proyecto y en general a los integrantes del Grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA).

Resumen

Las biotecnologías reproductivas, constituyen una serie de herramientas para la conservación de las razas consideradas en peligro de extinción como los burros. El objetivo de esta investigación fue evaluar el uso de inductores de capacitación espermática en semen congelado-descongelado de asnos. Se colectaron 5 asnos, localizados en el Valle de Aburrá con edades entre 4-8 años, se obtuvieron 3 eyaculados por animal, mediante vagina artificial, el semen recién recolectado fue diluido en proporción 1:1 en Equiplus® para ser criopreservado. Después, se descongelaron dos pajillas de 0.5 mL cada una del mismo eyaculado en un baño María a 37 °C, este volumen fue dividido en 8 submuestras y 125 µL de semen fueron depositados en tubos eppendorf, posteriormente se adicionó a cada tubo el inductor de capacitación pentoxifilina (PTX) 2.5, 5 y 7.5 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5, 1 y 1.5 mM, heparina (HEP) 1.1 mM como control positivo y sin aditivo (control) por 20 minutos. Se evaluaron variables de cinética espermática sistema IVOS (Hamilton Thorne), vitalidad espermática (VE) mediante el kit de viabilidad LIVE/DEAD, integridad acrosómica con (FITC-PSA), mientras que la capacitación, potencial mitocondrial e ingreso de Ca^{2+} , fue evaluado usando un citómetro de flujo (FORTESSA LSR, BD Biosciences, EE. UU). Se observó que la movilidad total (MT) y la vitalidad espermática (VE) aumentaron en relación con el control, con el uso de 2.5 y 5.0 mM de PTX respectivamente ($p < 0.05$), mientras que la movilidad progresiva (MP) disminuyó para las 3 concentraciones de EDTA ($p < 0.05$), otras variables como velocidad lineal (VSL), velocidad curvilínea (VCL), amplitud lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida (BCF) disminuyen su proporción ($p < 0.05$) al adicionar de EDTA 1, 1.5 y PTX 7.5 mM. En cuanto a la capacitación, se encontró que las concentraciones de EDTA 1, 1.5 mM y PTX 5, 7.5 mM ($p < 0.01$) favorecen eventos asociados a la capacitación espermática y además disminuye la concentración de Ca^{2+} intracelular para todas las concentraciones de PTX y EDTA 0.5 mM ($p < 0.01$). No se observaron efectos en la actividad mitocondrial. Se concluye que la adición de PTX a 2.5, 5 mM, incrementa la proporción de la MT y VE, por el contrario, la MP disminuye al aumentar la concentración de EDTA, además cambios en la estructura de la membrana plasmática asociados a eventos de capacitación de semen congelado-descongelado de burro, puede ser modulada por la suplementación con PTX (5 mM y 7.5 mM) y EDTA (1 mM y 1.5 mM). Sin embargo, la adición de estos inductores de la capacitación, no logró influencia en el ingreso de Ca^{2+} ,

por lo tanto, se requiere mayor nivel de investigación ya que los mecanismos e implicaciones en la capacitación espermática para semen de burro aún son desconocidos.

Palabras claves: Capacitación, biotecnología, pentoxifilina, movilidad

Abstract

EVALUATION OF SPERMATIC CAPACITY INDUCERS IN CRIOPRESERVED SEMEN OF DONKEYS (*Equus asinus*)

Reproductive biotechnologies constitute a series of tools for the conservation of breeds considered in danger of extinction, such as donkeys. The objective of this research was to evaluate the use of sperm capacitation inducers in frozen-thawed donkey semen. Five donkeys were collected, located in the Valle de Aburrá with ages between 4-8 years, 3 ejaculates were obtained per animal, by means of an artificial vagina, the recently collected semen was diluted in a 1:1 ratio in Eplus® to be cryopreserved. Afterwards, two straws of 0.5 mL each of the same ejaculate were thawed in a water bath at 37 °C, this volume was divided into 8 sub-samples and 125 µL of semen were deposited in eppendorf tubes, later the sperm inducer was added to each tube. capacitation pentoxifylline (PTX) 2.5, 5 and 7.5 mM, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0.5, 1 and 1.5 mM, heparin (HEP) 1.1 mM as positive control and without additive (control) for 20 minutes. Sperm kinetic variables IVOS system (Hamilton Thorne), sperm vitality (SV) using the LIVE/DEAD viability kit, acrosomal integrity with (FITC-PSA), while capacitation, mitochondrial potential and Ca²⁺ ingress were evaluated. using a flow cytometer (FORTESSA LSR, BD Biosciences, USA). It was observed that the total motility (MT) and the sperm vitality (VE) increased in relation to the control, with the use of 2.5 and 5.0 mM of PTX respectively ($p < 0.05$), while the progressive motility (MP) decreased for the 3 concentrations of EDTA ($p < 0.05$), other variables such as linear velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), lateral amplitude of the head (ALH) and beat frequency (BCF) decrease its proportion ($p < 0.05$) by adding EDTA 1, 1.5 and PTX 7.5 mM. Regarding capacitation, it was found that concentrations of EDTA 1, 1.5 mM and PTX 5, 7.5 mM ($p < 0.01$) favor events associated with sperm capacitation and also decrease intracellular Ca²⁺ concentration for all concentrations of PTX and 0.5mM EDTA ($p < 0.01$). No effects

on mitochondrial activity were observed. It is concluded that the addition of PTX at 2.5, 5 mM, increases the proportion of MT and VE, on the contrary, MP decreases with increasing concentration of EDTA, in addition to changes in the structure of the plasma membrane associated with capacitation events. of frozen-thawed donkey semen, can be modulated by supplementation with PTX (5 mM and 7.5 mM) and EDTA (1 mM and 1.5 mM). However, the addition of these capacitation inducers did not influence Ca²⁺ entry, therefore, a higher level of research is required since the mechanisms and implications in sperm capacitation for donkey semen are still unknown.

Key words: capacitation, biotechnology, pentoxifylline, motility.

Contenido

Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIV
Lista de tablas	XV
Lista de símbolos y abreviaturas	17
Introducción	18
OBJETIVO GENERAL.....	20
Objetivos específicos	20
1. MARCO TEÓRICO	21
1.1. Origen y domesticación	21
1.2. Comportamiento sexual del burro.....	22
1.3. Criopreservación seminal	23
1.4. Crioprotectores para uso en semen asnal	24
1.5. Capacitación y reacción del acrosoma	26
1.6. Inductores de la capacitación	27
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
2.1. Burros y colecta de semen	30
2.2. Criopreservación del semen asnal	31
2.3. Procedimiento de descongelación y adición de inductores.....	31
2.4. Evaluación movilidad, cinética espermática.....	32
2.5. Evaluación de reacción del acrosoma	32
2.6. Integridad estructural de la membrana plasmática (Vitalidad)	33
2.7. Citometría de Flujo	33
2.8. Análisis estadístico.....	34
3. RESULTADOS	34
4. DISCUSIÓN	41
4.1. Evaluación de inductores sobre la cinética, vitalidad y reacción del acrosoma.	41
4.2. Efecto de inductores de la capacitación espermática sobre la estabilidad de membrana, el flujo de calcio y actividad mitocondrial.....	46
5. CONCLUSIONES	49
6. RECOMENDACIONES	50
7. BIBLIOGRAFIA	50

Lista de figuras**Pág.**

Figura 1 Movilidad del semen de burro congelado-descongelado con diferentes inductores de capacitación.....	35
Figura 2 Índice de linealidad (LIN) e índice de rectitud (STR) para semen de burro congelado - descongelado con diferentes inductores de capacitación	36
Figura 3 Vitalidad espermática de semen de burro congelado - descongelado con diferentes inductores de capacitación	37
Figura 4 Integridad del acrosoma de semen de burro congelado-descongelado con diferentes inductores de capacitación	38
Figura 5 Estabilidad de la membrana del semen congelado-descongelado de burro	39
Figura 6 Actividad mitocondrial del semen congelado-descongelado de burro.....	40
Figura 7 Aumento del Ca ²⁺ intracelular dependiente de las concentraciones de cada tratamiento.....	41

Lista de tablas**Pág.**

Tabla 1 Efecto del tratamiento (comparado con el control) y sus diferentes concentraciones sobre parámetros de cinética espermática	34
---	----

Lista de símbolos y abreviaturas**Abreviatura Término**

ACP	Agentes crioprotectores
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALH	Amplitud lateral de la cabeza
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
BCF	Frecuencia de batido de cola
CSA	Comportamiento sexual apetitoso
CSC	Comportamiento sexual consumatorio
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GLY	Glicerol
GPMc	Guanosín monofosfato cíclico
HA	Hiperactivación
HEP	Heparina
MP	Movilidad progresiva
MPL	Membrana plasmática
MT	Movilidad total
PKA	Proteína Quinasa A
PTX	Pentoxifilina
PVP	Polivinilpirrolidona
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOR	Sorbitol
TK	Tirosina quinasa
VAP	Velocidad promedio
VCL	Velocidad curvilínea
VSL	Velocidad rectilínea
YHC	Yema de huevo centrifugada

Introducción

La historia marca el continente africano como el origen de la domesticación de muchos animales, como el gato, la gallina de guinea, los bovinos y por su puesto el burro, este proceso se remonta a uno 5000 años, donde sus poblaciones salvajes se extendieron desde las montañas del Atlas, hasta el mar rojo y la frontera norte de la hoy Kenia (Blench, 2012). Hito que transformó los sistemas de transporte tanto de África como Asia convirtiéndose en baluartes de grandes civilizaciones como la egipcia modificando de este modo las sociedades nacientes, lo que a su vez permitió la expansión y desarrollo del comercio terrestre, además la colonización de territorios (Rossel et al., 2008).

A diferencia de otros animales domésticos, el burro no ha sufrido cambios fundamentales en su uso o en el desarrollo en sus 7.000 años, y se destacan atributos como longevidad, ya que viven entre 30 y 35 años, trabajan activamente incluso en situaciones de adversidad, son fáciles de cuidar, resistentes a las enfermedades, rústicos y poco exigentes nutricionalmente, pues se adaptan fácilmente a zonas áridas (Kugler et al., 2008).

Los burros, constituyen una fuerza laboral importante en la agricultura, el comercio y la milicia (Miragaya et al., 2018), de tal magnitud que gracias a ellos en regiones como Antioquia, se llevó a buen fin la construcción del puente de occidente en el municipio de Santa Fe, atractivo turístico actual, pero que para la época constituía en eslabón que permitía conectar la región antioqueña con el mar Caribe, lo que fue posible gracias a que las mulas transportaban los materiales desde el Magdalena Medio (López, 2018).

Así mismo continúan siendo igual de importantes para las sociedades en desarrollo, usados para un sinnúmero de actividades diarias en estas regiones remotas o de acceso difícil, como el trabajo, transporte, arado, carga, recreación, usos novedosos como la asinoterapia y aunque su carne, leche y derivados lácteos no son de consumo diario comparado con otras fuentes de proteínas como la bovina o porcina, su importancia e interés están aumentando en el nuevo siglo (Blench, 2012; Carminati & Tidona, 2017; Quaresma et al., 2014; Rossel et al., 2008).

No obstante, debido al avance tecnológico y la mecanización del suelo, su uso para todas las tareas rutinarias de los campos es cada vez menos frecuente, sentenciándolos al olvido y la extinción (Carneiro et al., 2018; Douet et al., 2019), pues ya sea salvajes o

domésticos están siendo presionados por otro tipo de mercado, como la demanda de su piel para la fabricación de ejiao, una gelatina que en la cultura popular china se le atribuyen propiedades curativas (Dong et al., 2012; Kumeta et al., 2014; Shen et al., 2016).

Esto ha tenido como consecuencia un rápido aumento de los precios de las pieles de burro, por este motivo, la gran mayoría son sustraídos de manera ilegal de sus propietarios, afectando no solo a quienes depende de ellos como sustento, sino también el bienestar de los burros, pues son desollados para hacerse con su piel, en plantas de beneficio ilegales, en condiciones de higiene deplorables, lo que a su vez representa un riesgo para la salud pública (Bennett & Pfuderer, 2020; The Donkey Sanctuary, 2017).

Por lo anterior el uso de las biotecnologías representa una de las herramientas más importante que propende la conservación y futura reproducción especies diezmadas por alguna de las razones mencionadas al inicio, en este orden de ideas, podemos encontrar apoyo en la criopreservación de semen y/o embriones, pues esta permite mantener células a baja temperatura sin perder su vitalidad y utilidad, aumentando la mejora de las tecnologías reproductivas en las ciencias animales (Canisso et al., 2019; de Vasconcelos Franco et al., 2016; Sjunnesson, 2020).

Estas herramientas son de gran interés, pues a pesar de que las biotecnología reproductivas ha sido aplicada desde los años 1900 (Verma et al., 2011) con la incorporación de la inseminación artificial, después se evolucionó al control hormonal, transferencia de embriones y clonación (Massip, 2001), estas técnicas han sido implementadas la mayoría de las ocasiones en bovinos (Ferré et al., 2020), cerdos (Nguyen et al., 2021; Zheng et al., 2016), camélidos, (Miragaya et al., 2006), equinos (Zhao et al., 2021) y burros (Panzani et al., 2018; Peña-Alfaro et al., 2014).

No obstante, para la especie asnal, es frecuente encontrar que se aplican protocolos de criopreservación de semen usados en equinos (Ferrante et al., 2018a), como consecuencia los resultados no pueden ser malos, por lo tanto, se necesitan más estudios sobre la fisiología reproductiva de los burros para ampliar la aplicación prospectiva de las técnicas de reproducción asistida en esta especie (Miragaya et al., 2018).

La capacitación espermática, es considerada uno de los eventos mas importantes, ya que experimenta una serie de modificaciones, en la reorganización de las proteínas, lípidos de membrana y canales de Ca^{2+} (Gervasi & Visconti, 2016). Hasta ahora, se han utilizado inductores de capacitación como pentoxifilina en humanos (Stanic et al., 2002) equinos (Rota et al., 2019), cafeína, taurina (Stephens et al., 2013), prolina (Li et al., 2021), sin embargo en el burro, todavía continúan vacíos, sobre el efecto de la adición de inductores, en el semen descongelado y como influye en los cambios de estructura de membrana, flujo de calcio y cinética.

Se conoce que los cambios en la cinética espermática son un factor asociado a la capacitación de los espermatozoides de los equinos (Thomas et al., 2006). Así mismo se ha reportado que entre las medidas de movimiento de los espermatozoides derivadas de CASA, los valores medios de VCL, VAP y BCF fueron más altos en los burros que lograron un porcentaje de preñez por ciclo $\geq 60\%$ lo que indica que la tasa de preñez por ciclo pare estar relacionada con las mediciones asistidas por computadora de la motilidad de los espermatozoides (Dorado et al., 2013).

La finalidad de esta investigación es evaluar inductores de la capacitación espermática en semen criopreservado de asnos, y su impacto en parámetros de calidad seminal como cinética, integridad de membrana y eventos asociados a la capacitación con la finalidad de obtener conocimiento básico y aplicado necesario para el desarrollo futuro de procesos de reproducción asistida orientados a la conservación de esta especie.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el uso de inductores de capacitación espermática en semen congelado-descongelado de asnos, en función de su efecto sobre la calidad seminal.

Objetivos específicos

- I. Evaluar la movilidad y cinética espermática, la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de semen criopreservado-descongelado de asnos sometido a inductores de capacitación.

- II. Determinar el efecto de inductores de la capacitación espermática sobre, la estabilidad de membrana, el flujo de calcio y la actividad mitocondrial, como eventos asociados a la capacitación de semen criopreservado de asnos.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Origen y domesticación

Taxonómicamente los burros pertenecen al orden *perissodactyla*, aquí encontramos la familia de équidos, que a su vez incluyen el género *Equus*, con diferentes especies, entre ellas *przewalskii* (caballo salvaje), *quagga* (cebra de Grant), *caballus* (caballo domestico) y *asinus* (burro o asno)(Kugler et al., 2008).

Los datos arqueológicos sobre la existencia de burros en las antiguas sociedades, son difíciles de obtener, porque a diferencia de algunas especies de ganadería no eran sepultados ceremonialmente o incluidos en obras de artes (Marshall, 2007).

No obstante, en la actualidad se reportan varias teorías sobre el origen y la forma de domesticación, Charles Darwin (Darwin, 1859) manifiesta que estos tienen origen de un ancestro común africano (*E.asinusafricanus*), otros indican que tiene un antepasado además del africano, el europeo (*E.asinuseuropeans*) originario de la cuenca mediterránea (Carneiro et al., 2018). A pesar de esta dicotomía, descubrimiento de esqueletos en una tumba de la Primera Dinastía en Tarkhan en Egipto, llevan a concluir que su origen es africano y que el proceso de domesticación se inició por los aldeanos del Valle de Nilo, motivados por la búsqueda de agua y recursos alimenticio que se habían vuelto más distantes(Rossel et al., 2008).Sin embargo con los avances tecnológicos y el uso de DNA mitocondrial se ha postulado que no fue domesticado uno, sino dos subespecies de asno salvaje africano (Somalí y Nubia)(Guo et al., 2006).

Este proceso fue realizado por pastores africanos hace 6000 años, hito que transformó las sociedades antiguas, el transporte terrestre en África y Eurasia, desarrollando rutas comerciales y contribuyendo a la expansión de civilizaciones como la egipcia o mesopotámica(Marshall, 2007) ya que eran apreciados como animales de carga y los agricultores asentados también encontraron usos para los burros, destacando, el

transporte, plantar semillas, trillar y moler granos, por tanto este animal siempre ha sido de gran interés, hoy en día incluso los nómadas del norte de África los utilizan mucho más que los beduinos (Kugler et al., 2008).

Desde que inició este proceso, hasta la actualidad siempre han sido valorados por su resistencia a enfermedades, fácil cuidado, longevidad, adaptación a temperaturas altas y nutrición, pues buscan cualquier forraje disponible y recorren de 4 a 6 kilómetros en busca de agua (Yilmaz et al., 2012), además son importantes para la producción de mulas, que han sido de gran atractivo ya que logra reunir las cualidades de los equinos y asnos en un solo biotipo (Canisso & McDonnell et al., 2010)

1.2. Comportamiento sexual del burro

Uno de los desafíos fundamentales que enfrentan todos los animales es exponer las respuestas conductuales necesarias para lograr la reproducción, conocer estas características es clave para un apareamiento exitoso (Carluccio et al., 2013), en el macho están plenamente identificados dos tipos de conductas sexuales, uno referente al deseo o comportamiento sexual apetitoso (CSA) que involucra el galanteo, la postura, expresiones auditivas, emisión de señales químicas (feromonas), contacto con la contraparte y el comportamiento sexual consumatorio (CSC) que se refiere propiamente al coito (Ball & Balthazart, 2008).

En este ámbito resaltamos la importancia de las feromonas, representan una gran variedad de moléculas que pueden estar conformadas por estructuras químicas muy pequeñas hasta grandes compuestos solubles; una vez liberadas así sea en bajas concentraciones y detectadas por el órgano receptor vomeronasal en el macho, que tiene como función unir estas moléculas, se desarrollan acciones en la conducta, como el conocido reflejo de flehmen, esas alteraciones activan el CSA, esperando que finalmente se logre el CSC (Haddad et al., 2008; Hu et al., 2007; Keverne, 2002).

Aunque lo anterior puede ser común para equinos y asnos, cabe resaltar que la organización reproductiva es diferente, pues naturalmente los burros son territoriales, no se aparean en harén y no tienen un comportamiento gregario con las yeguas y burras, por el contrario, los caballos no son territoriales, son gregarios y se aparean en harén (McDonnell, 2003).

En la naturaleza, el burro se acerca a la burra una vez ella haya entrado en su territorio o viceversa cuando ella está en estro, establecido este interés, el burro comienza a recelar a la burra por medio de vocalizaciones ruidosas, respuesta de flehmen y olfateo del área perineal de la burra, la región inguinal, patas traseras y parte ventral del abdomen así como evacuación de orina o líquidos vaginales en el piso, en la mayoría de ocasiones se logrará una montura de 10 a 30 segundos sin erección (I F Canisso & McDonnell, 2010; Miragaya et al., 2018). Cabe destacar que las vocalizaciones periódicas emitidas por el burro parecen mantener a las hembras sexualmente activas, si estas están cerca de su área de descanso, además si están en grupo se estimula la actividad sexual entre las burras (Miragaya et al., 2018).

Estas interacciones precopulatorias entre burros y burras, son muy llamativas y de corta duración. Otros signos clave en el actuar del burro antes de exponer el pene, incluyen la secreción que cae de la cavidad nasal, baja la cabeza y el cuello y después da un ligero tirón hacia arriba y la mayoría de las veces da una patada recta hacia atrás (McLean et al., 2019).

El pleno desarrollo y conocimiento de la CSA y CSC es necesario para determinar las condiciones idóneas si el objetivo es llevar a cabo programas de recolección de semen para su posterior IA, pues los trabajadores involucrados deben estar en la capacidad de reconocer alteraciones que no permitan llevar a buen fin la eyaculación del burro y realizar los correctivos necesarios. Determinar el progreso típico de estas actividades requiere paciencia y una preparación de otras herramientas como la vagina artificial o un maniquí sea el caso (Carluccio et al., 2013).

1.3. Criopreservación seminal

El método que permite mantener estable las células a temperaturas criogénicas se le conoce como criopreservación. Desde su primer reporte de uso por el científico italiano Lazzaro Spallanzani en 1776 hasta la actualidad se han desarrollado nuevas técnicas que permiten mantener funcionales variedad de células, incluidos gametos femeninos, masculinos, pequeños organismos multicelulares e incluso elementos más complejos como los embriones (Di Santo et al., 2012).

La criopreservación de semen representa una importante biotecnología reproductiva a nivel mundial, que busca la conservación del germoplasma masculino por tiempo indeterminado y que, en sinergia con la IA representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad (Ribeiro-Peres et al., 2014).

Sin embargo, la técnica en sí, genera daños celulares a través de mecanismos distintos, como la creación de hielo extracelular que modifica el equilibrio isotónico por el aumento en la concentración de solutos disueltos en el medio extracelular y la deshidratación celular o estrés osmótico, lo cual está relacionado con la velocidad de enfriamiento (Grötter et al., 2019; Mazur et al., 1972). Además se manifiesta la oxidación de los compuestos celulares, así como la interrupción y el daño de las estructuras, como el ADN, el acrosoma y la membrana plasmática, lo que finalmente reduce la fertilidad (O'Connell et al., 2002) igualmente, las especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), los aniones superóxido (O₂⁻) y los radicales hidroxilo (OH⁻) pueden inducir apoptosis, peroxidación lipídica de membrana, alteración de las mitocondrias y daños en el ADN (Bollwein et al., 2008).

La ejecución de esta técnica, incluye la adición de agentes crioprotectores (ACP) que tienen como objetivo proteger la célula de los cristales que se forman durante el proceso de congelación y el enfriamiento de manera controlada que pretende llevar los espermatozoides a temperaturas de -196°C, donde se detienen los procesos metabólicos; por tanto la viabilidad y posterior recuperación de los espermatozoides para procesos de IA puede verse afectada por este tipo de procesos (Nannou et al., 2016). En general, múltiples factores influyen en la calidad de los espermatozoides criopreservados, entre ellos se destaca la elección de crioprotectores, protocolo de enfriamiento, características físicas, morfológicas y bioquímicas inherentes a la célula espermática (Carvalho et al., 2017).

1.4. Crioprotectores para uso en semen asnal

Los agentes crioprotectores (ACP) se definen como sustancias químicas agregadas a las células espermáticas para alterar el comportamiento físico de las mismas y tiene como objetivo disminuir los efectos de la lesión criogénica durante el congelamiento o la vitrificación (Bhattacharya, 2018).

Existen numerosos ACP de diferentes tipos, que además pueden combinarse de muchas maneras. Los ACP más utilizados a nivel mundial son dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol (GLY), sacarosa y trehalosa. Estos generalmente se clasifican en dos tipos, de acuerdo con su capacidad de penetrar la membrana celular; ACP permeables, como DMSO, GLY, propilenglicol (Soni et al., 2019) y ACP no permeables, principalmente polímeros polivinilpirrolidona (PVP), hidroxietilalmidón (HES) y azúcares (Consuegra et al., 2018).

Las bajas concentraciones de ACP son capaces de proteger las células contra los efectos de la solución evitando la formación de hielo intracelular, sin embargo, su mecanismo de protección depende de su tipo (Nannou et al., 2016; Shahsavari et al., 2019).

Una de las estrategias para potenciar el desempeño del proceso fue adaptar técnicas desarrolladas para equinos, dado el parecido de las especies, por lo tanto, se han evaluado diferentes variables como las tasas de enfriamiento y congelación (Demyda-Peyrás et al., 2018; Dorado et al., 2019) los compuestos utilizados y las cantidades incluidas en los crioprotectores (Montoya et al., 2017; Oliveira et al., 2016), así como se ha ensayado la inclusión de compuestos permeables (Acha et al., 2016) y no permeables (Diaz-Jimenez et al., 2018) para mejorar el resultado general.

Pese a lo anterior, la congelación del semen équido, particularmente de burros, continúa siendo un desafío para las futuras investigaciones (Smits et al., 2012) pues identificar un método adecuado de esta técnica para la especie asina representaría un elemento muy valioso para el manejo *ex situ* de la diversidad genética ya que los resultados no han sido óptimos y varios autores documentan una baja fertilidad con semen de burro congelado bajo diferentes crioprotectores y cantidades o combinaciones de los mismos (Miragaya et al., 2018).

Uno de los procesos convencionales para criopreservación es la centrifugación del eyaculado (Restrepo et al., 2016; Restrepo et al., 2017), con la finalidad de retirar el plasma seminal, al ser considerado perjudicial para los espermatozoides durante el almacenamiento a bajas temperaturas (Contri, et al., 2012b; Pizarro et al., 2013); pero en équidos se ha reportado que altas proporciones de dilución de los eyaculados, así como la eliminación parcial o total del plasma seminal, pueden reducirlos efectos nocivos de

este fluido biológico sobre los espermatozoides (Miró et al., 2009; Restrepo et al., 2015; Úsuga et al., 2018).

La adición de glicerol (GLY) es muy frecuente en la industria equina, sin embargo parece que la mitad de la dosis usadas para los caballos, es dañino para los espermatozoides de los asnos, lo que por su puesto compromete la posterior fertilidad (Vidament et al., 2009).

Investigadores como (Montoya et al., 2017) han descrito alternativas a este compuesto químico, como dimetilformamida (DMF) mezclado con yema de huevo centrifugada (YHC) al 5% y plasma seminal (PS) al 10% concluyendo que esto, permite mejorar la calidad espermática postdescongelación de movilidad, vitalidad y la integridad de membrana en asnos. Resultados satisfactorios también han sido reportados por (Dorado et al., 2019) quien observó que la adición de sorbitol (SOR) postdescongelación para semen de asnos, mejoró las variables generales del patrón de motilidad de los espermatozoides, por ejemplo, la movilidad total (MT) fue de 58.36% ($p < 0.05$) y la glucosa (GLU) 49.04%, que a pesar de ser inferior mejora la morfología ya que no se afecta la integridad de la membrana, aunque otro tipo de azúcar como fructosa no representa un beneficio 38.41%

1.5. Capacitación y reacción del acrosoma

Las células espermáticas de los mamíferos deben sobrellevar cambios bioquímicos y morfológicos en el tracto reproductivo femenino, denominados conjuntamente capacitación, con le finalidad de adquirir competencia para fertilizar el ovulo (Breitbart & Finkelstein, 2015). Estos cambios incluyen activación de AMPc/PKA, salida de colesterol de la membrana plasmática (MPL), fosforilación de tirosina de proteínas dependiente de PKA, polimerización de actina y el desarrollo de la motilidad de hiperactivación (HA) (Buffone et al., 2014; Visconti, 2009).

El acrosoma es uno de los lugares anatómicos del espermatozoide donde ocurren estos cambios, esta es una vesícula secretora que envuelve la porción anterior de la cabeza del espermatozoide debajo de la membrana plasmática (MPL). Esta es procedente del aparato de Golgi y consiste en una matriz envuelta dentro de un sistema continuo de membranas de dos capas, la membrana acrosómica externa (MAE) adyacente a la MPL del espermatozoide.

y la membrana acrosómica interna (MAI) ubicada cerca de la envoltura nuclear (Breitbart & Shabtay, 2018).

Se ha demostrado que la polimerización de actina es crítica para capacitar a los espermatozoides, mientras que la despolimerización muy rápida de actina ocurre antes de la reacción del acrosoma (Brenner et al., 2003) este evento también es importante en la cola del espermatozoide durante la capacitación ya que permite el desarrollo de la HA. Esta actividad está mediada por la polimerización de actina dependiente de fosfolipasa D (PLD) (Itach et al., 2012). Se ha reportado que el 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) es un cofactor para la activación de PLD en muchos tipos de células y su extraordinaria versatilidad lo ubica en la dinámica de la membrana plasmática que gobierna la motilidad celular, adhesión, endo y exocitosis (Di Paolo & De Camilli, 2006).

Autores como (Finkelstein et al., 2010, 2013) han logrado verificar que la liberación de gelsolina unida a partir de PIP₂ provoca una rápida despolimerización de la actina F dependiente de Ca²⁺, así como un aumento de la reacción del acrosoma, además que PIP₂ y la gelsolina participan en la regulación de la motilidad de los espermatozoides y el desarrollo de hiperactivación (HA).

1.6. Inductores de la capacitación

En la actualidad, a pesar de los grandes avances científicos, se reconoce que aún falta mucho por conocer acerca de los mecanismos que inducen la capacitación, no obstante, se entiende que existen modificaciones lipoproteicas en la membrana celular que permiten al espermatozoide responder a inductores específicos y experimentar la reacción acrosomal (Arenas et al., 2010).

Autores se han planteado mejorar la cualidades del semen descongelado agregando concentraciones bajas de plasma seminal tanto en el caballo como en el burro (de Andrade et al., 2011; Sabatini et al., 2014) y llegaron a demostrar que atributos como la movilidad mejoraron en el equino, pero afecto negativamente la calidad seminal de burros en pruebas *in vitro* (Rota et al., 2019)

También se han utilizado fármacos como las pentoxifilina (PTX), derivado de las metilxantinas, para estimular las funciones de los espermatozoides mamíferos, este ha

reportado efectos positivos en humano (Negri et al., 1996), bovinos (Barakat et al., 2015) perros (Mirshokraei et al., 2011) donde una alta concentración aumentó la calidad de los espermatozoides, la capacitación y la reacción del acrosoma (Mirshokraei et al., 2011)

En burros la suplementación con PTX a 5 y 10 mM, después de la descongelación, no aumentó la proporción espermatozoides móviles evaluada para los tiempos 0, 60 y 120 minutos, mientras que en equinos, si fue reportado un efecto significativo para ambas concentraciones ($p < 0.05$) (Rota et al., 2019)

Sus efectos se deben a que PTX es un inhibidor de la fosfodiesterasa (PDE) del grupo de la metilxantina que inhibe la descomposición del adenosin monofosfato cíclico (AMPc) (Stephens et al., 2013) lo que aumenta la concentración de AMPc intracelular y la fosforilación de tirosina a nivel de la cola (Calogero et al., 1998) y aunque ejerce sus efectos a través de diferentes mecanismos, se reporta que el más importante es la inhibición de la fosfodiesterasa (PDE) produciendo una inhibición del 50% de AMPc cuando se utiliza una concentración superior a $1\mu\text{M}$ (Meskini et al., 1994) a su vez, investigadores como (Fredholm & Lindström, 1986) se informaron que la pentoxifilina inhibe la recaptación de adenosina, aumentando así el AMPc. Otros autores también han reportado un aumento en AMPc pero no en guanosin monofosfato cíclico (GMPc) durante la infusión de pentoxifilina, lo que sugiere que la pentoxifilina inhibió la degradación de AMPc, pero no la degradación de GMPc (Sinha et al., 1995).

En el espermatozoide, el AMPc activa la proteína quinasa (PKA) que a su vez regula la fosforilación de la proteína tirosina, que es una vía reguladora importante en la modulación de los eventos asociados a la capacitación (Naz & Rajesh, 2004).

En equinos, resultados indican que la suplementación con PTX logro aumentar el AMPc intracelular en los espermatozoides del epidídimo y, en consecuencia, el número de espermatozoides móviles (Guasti et al., 2017)

Autores como (Fernández et al., 2020) han encontrado que la tirosina quinasa (TK) y adenilciclase asociada a la membrana (mAC) modulan la capacitación inducida por ácido hialurónico (HA), este tiene un efecto en la capacidad de fertilización de los espermatozoides, pero disminuye las tasas de clivaje y producción de blastocistos en bovinos.

El mecanismo de acción de este inductor, está relacionado con la interacción de una glicoproteína de la superficie celular llamada CD44 que estimula la actividad la tirosina quinasa (c-Src) aumentando la fosforilación de tirosina de proteínas citoesqueléticas en células cancerígenas (Turley et al., 2002). Se ha encontrado que en el gameto humano masculino, el HA propicia cambios similares en el esquema de fosforilación de tirosina, probablemente mediado por tirosina quinasas (TK) (Sati et al., 2014).

También han sido introducidos agentes quelantes como EDTA, que agregados al medio se pueden combinar con cationes divalentes formando complejos estables y así proteger el ADN del espermatozoide de la degradación (Kaneko & Nakagata, 2006). Sin embargo, otros autores han reportado que el EDTA tiene actividad espermicida y este efecto depende del tiempo y de la dosis (Okazaki et al., 2011).

Esta sustancia, también ha sido adicionada como complemento al diluyente en semen de burro, sin embargo, la adición de EDTA a los medios de congelación de burro no mostró beneficios y su efecto fue contraproducente, con efecto perjudicial sobre la movilidad de los espermatozoides, la función de la membrana y los acrosomas (Ferrante et al., 2018a).

Por el contrario (Keshtgar et al., 2016) informa que la combinación de EDTA con Trolox influye significativamente en la viabilidad de los espermatozoides congelados-descongelados, aunque no ocurre lo mismo en semen fresco, ya que los canales de calcio en el espermatozoide fresco no se abren sin estimulación (Patrat et al., 2000).

De igual forma, la fibronectina (Fn) y la anandamida (AEA), han sido implementados como inductores de la capacitación, una glicoproteína de la matriz extracelular y un endocannabinoide respectivamente presentes en el líquido oviductal de la vaca y modulan las funciones del espermatozoide de toro (Gervasi et al., 2013; Martínez-León et al., 2015; Osycka-Salut et al., 2017).

La anterior glicoproteína activa las vías de señalización implicadas en la regulación de las funciones de los espermatozoides (Strohmeyer et al., 2017). Por ejemplo en humanos, induce la capacitación de los espermatozoides y la reacción del acrosoma mediante la activación de la vía AMPc/PKA (Martínez-León et al., 2015), mientras que en toros se activa $\alpha 5\beta 1$ por medio de Fn (Fibronectina) y tiene como objetivo regular la interacción

esperma-oviducto promoviendo la liberación de espermatozoides del epitelio oviductal (Oszycka-Salut et al., 2017).

Por lo anterior se ha propuesto que Fn podría considerarse como un nuevo factor que promueve la capacitación espermática en bovinos y estos hallazgos podrían contribuir a comprender mejor la importancia de la señalización de Fn en la adquisición de la competencia de fertilización de espermatozoides en mamíferos (Oszycka-Salut et al., 2020)

Por último, cabe destacar que la mayoría de los inductores mencionada y su modo de acción, aún siguen siendo una incógnita en la especie asnal, por lo que las investigaciones futuras, deben apuntar a determinar cuáles inductores y en que concentración, pueden representar beneficios para esta especie, lo que representa un avance a nivel *in vitro*, será determinante para fertilizaciones *in vivo*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Burros y colecta de semen

Se utilizaron cinco asnos (*Equus asinus*), localizados en el Valle del Aburra, Antioquia (Colombia), con edades entre 4 y 8 años, condición corporal entre 7 y 8 (escala 1-9) (Warren, 2009) y con fertilidad comprobada. Bajo un régimen de una colecta semanal, se colectaron tres eyaculados por animal mediante vagina artificial modelo Missouri (Minitube, Alemania), empleando una yegua para incrementar el estímulo sexual, para un total de 15 eyaculados. Los machos se mantuvieron estabulados bajo condiciones similares de confinamiento, ejercicio y alimentación. Una vez obtenido cada eyaculado, la fracción de gel se retiró por filtración usando una malla de nylon.

El semen recién recolectado fue diluido en proporción 1:1 en un diluyente a base de leche semidescremadas, caseinatos, azúcares y antibióticos Equiplus® (Minitube) precalentado a 37°C. El material biológico fue empacado en bolsas para recolección de semen y transportado en un equipo de refrigeración (Equitainer®, Minitube) al laboratorio de Biotecnología Animal del Politécnico Jaime Isaza Cadavid, ubicado en Bello (Antioquia), recorriendo una distancia máxima de 60 km entre el sitio de colecta y el laboratorio, en un tiempo aproximado de hora y media. Como criterio de selección, solo

fueron procesados los eyaculados con mínimo 60% de movilidad progresiva y 100 millones de espermatozoides por mL (Henry et al., 2002; Perez-Osorio et al., 2008).

2.2. Criopreservación del semen asnal

La criopreservación del semen se realizó mediante un protocolo modificado de congelación (Bustamante et al., 2009; Medeiros et al., 2002). El semen diluido fue centrifugado por 12 minutos a 850 x g y se descartó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en diluyente Equipro® y suplementado con 5% de DMF y 5% yema de huevo (YH) centrifugada, preparada de acuerdo a un protocolo descrito por (Nouri et al., 2013), diluyendo la yema en agua ultra pura a una proporción 3:1 (v:v) y centrifugandola a 1600 x g durante 100 minutos.

Posterior a la dilución y centrifugación, el semen fue sometido a refrigeración, en condiciones de 5°C por 60 minutos y empacado en pajillas de 0.5mL con la ayuda de un equipo automático de empaque y sellado de pajillas por ultrasonido (MRS1 Dual V2, IMV Technologies). Las pajillas se sometieron a vapores de nitrógeno líquido, durante 15 minutos, a 6 cm de la superficie. Para finalmente, ser sumergidas en nitrógeno líquido por 20s, y almacenadas en un tanque criogénico hasta su descongelación, siguiendo el protocolo de criopreservación previamente estandarizado (Restrepo et al., 2017)

2.3. Procedimiento de descongelación y adición de inductores

Para cada eyaculado, se descongelaron dos pajillas en un baño de agua a 37°C durante 1 minuto. Las dos pajillas descongeladas por eyaculado, fueron depositadas en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Después, este contenido fue dividido en 8 de estos mismos tubos, donde cada uno fue mezclado con el inductor de la capacitación respectivo según cada tratamiento. En ese sentido, se adicionó pentoxifilina, EDTA y Heparina a concentraciones previamente evaluadas y adaptadas según las cantidades suplementadas. De esta manera, las concentraciones usadas en el presente estudio se establecieron en 2.5, 5 y 7.5 mM de PTX. De manera similar, las concentraciones de EDTA usadas en este trabajo (0.5, 1.0 y 1.5 mM), fueron previamente evaluadas y adaptadas del protocolo utilizado por (Hussain et al., 2019; Rota et al., 2019) (Talukdar et al., 2015)

Por último, se tuvo un control positivo con la adición de heparina (1.1 mM) y un control sin la adición de ningún inductor. Posterior a la suplementación de los inductores de capacitación, las muestras fueron incubadas por 30 minutos a 37°C (Stephens et al., 2013) en condiciones de oscuridad. Culminado este tiempo de incubación, se procedió a evaluar los parámetros de movilidad y cinética espermática mediante el sistema de análisis computarizado (CASA) y la integridad estructural de membrana (vitalidad) e integridad del acrosoma, por microscopía de fluorescencia. Dichas evaluaciones constaron de dos repeticiones por tratamiento.

2.4. Evaluación movilidad, cinética espermática

La movilidad y la cinética de los espermatozoides de burro fueron evaluadas mediante el sistema de análisis computarizado (CASA, Hamilton Thorne Semen Analyser, HTM-IVOS versión 12.3, Hamilton Thorne Research, Massachusetts, USA), dotado de una placa térmica a 37°C, y previamente configurado con información específica de la muestra, en aspectos como volumen, dilución, campos de lectura y especie. Para esta evaluación, se depositó una gota de 5 µL de semen en un portaobjetos de vidrio precalentado a 37°C y se cubrió con un cubreobjetos, esto se realizó para cada tratamiento con su respectiva repetición. Durante este análisis, se evaluaron mínimo 500 espermatozoides en cinco campos de observación. Y se reportaron los siguientes parámetros: movilidad total (MT), movilidad progresiva (MP), velocidad líneal (VSL), velocidad curvilínea (VCL), velocidad media (VAP), desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), frecuencia de batido (BCF), linealidad (LIN) e índice de rectitud (STR). Protocolo modificado con base a lo descrito por (Mesa et al., 2012)

2.5. Evaluación de reacción del acrosoma

La integridad del acrosoma se evaluó utilizando aglutinina de maní conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) (Mendoza et al., 1992). El estado del acrosoma de los espermatozoides se examinó utilizando un microscopio con óptica de contraste de fase y epifluorescencia bajo FITC / filtro azul (T670Q-PL-FL, Amscope, EEUU). Todo el acrosoma observado con fluorescencia verde en la región apical de la cabeza, se clasificó como espermatozoide con acrosoma intacto, mientras que una fluorescencia baja o nula en la región acrosómica indicó pérdida de acrosoma / reacción acrosómica /

daño acrosómico. Para esta evaluación, se contaron 200 espermatozoides para cada repetición por cada tratamiento y se estableció la proporción de acrosomas intactos (%).

2.6. Integridad estructural de la membrana plasmática (Vitalidad)

Se determinó mediante el procedimiento descrito por (Gamboa et al., 2010), con el kit Live/Dead (Molecular Probes Inc). Donde una suspensión de células a una concentración de 20×10^6 espermatozoides/mL, fue incubada por 5 minutos a 35°C con SYBR14 a una concentración final de 6 mM y luego con yoduro de propidio a 0.48mM. Por último, se realizó el conteo de 200 células espermáticas mediante un microscopio E200 con fluorescencia HBO (Nikon Inc., Japón) a longitudes de onda entre 550 y 595 nm.

2.7. Citometría de Flujo

La criocapacitación y la apoptosis de los espermatozoides congelados-descongelados fueron evaluadas mediante tinción con la sonda fluorescente Merocianina 540 (Thermo Fisher Scientific, USA), realizando una adaptación al protocolo reportado por (Thomas et al., 2006). Para ello, 10 μl de semen descongelado fueron diluidos en medio HANKS' Balanced salt solution a una concentración de 1×10^6 /mL, y teñidos con Merocianina 540 a una concentración final de 0,68 μM . Paralelamente se determinó el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{M}$) de estas mismas muestras, mediante la tinción simultánea de yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocyanina (DiOC6, Molecular Probes) y Yoduro de Propidio (PI) (Molecular Probes, USA), con Merocianina 540. En este sentido, el $\Delta\Psi\text{M}$ se evaluó con una versión adaptada del protocolo descrito por (Zamzami et al., 1996) y (Varela et al., 2020).

Para la realización de este análisis, se adicionó DiOC6 a una concentración final de 80 nM a los 10 μl de semen diluidos en HANKS' y que fueron teñidos previamente con Merocianina 540. Adicionalmente, con el fin de realizar una tinción de exclusión e identificar las células viables y no viables, se aplicó Yoduro de Propidio (PI) (Molecular Probes, USA) a una concentración de 1 mg/ml. Las muestras teñidas previamente con las tres sondas, fueron incubadas en oscuridad a 25°C durante 15 minutos, y finalmente, fueron evaluadas mediante citometría de flujo (LSRFortessaTM, BD Biosciences). Estas muestras se excitaron utilizando un láser de fase sólida de 488 nm, y la fluorescencia se

detectó a 575/26, 530/30 y 610/20 nm para M540, DIOC6 y PI respectivamente. Los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, USA).

2.8. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se evaluó la normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk, se realizó el ajuste de modelos mixtos y se realizó la comparación de medias por la prueba de Tukey. Se estableció un nivel de significancia en $p < 0.05$. Todos los análisis se realizaron mediante el software SAS versión 9.2 (SAS Inst. Inc, USA).

3. RESULTADOS

En total, fueron evaluadas 60 pajillas de semen. En los modelos mixtos las variables con menor dispersión fueron BCF, STR, ALH y LIN, con un $CV < 20\%$, mientras que las demás variables estuvieron en un rango de 20 a 62% (CV), representando la de mayor variabilidad la integridad del acrosoma, además el modelo mixto para esta evaluación tuvo un rango de $R^2 = 0.47 - 0.55$

Los valores medios de mínimos cuadrados basados en modelos mixtos para los parámetros de cinética se pueden apreciar en la **tabla 1**.

Tabla 1 Efecto del tratamiento (comparado con el control) y sus diferentes concentraciones sobre parámetros de cinética espermática

TTO	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF
CONTROL	67,96 ± 3,42	54,79 ± 2,87	131,85 ± 6,40	7,13 ± 0,16	33,30 ± 0,90
EDTA 0,5	63,94 ± 3,42	50,63 ± 2,87	125,93 ± 6,40	7,21 ± 0,16	32,97 ± 0,90
EDTA 1,0	57,90 ± 3,42	44,92 ± 2,87 **	115,83 ± 6,39*	7,36 ± 0,16	31,72 ± 0,90
EDTA 1,5	53,46 ± 3,42	41,11 ± 2,87**	107,54 ± 6,39**	7,66 ± 0,15*	31,25 ± 0,90*
HEPARINA	69,54 ± 3,43	55,10 ± 2,88	135,7 ± 6,42	7,24 ± 0,15	33,75 ± 0,90
PTX 2,5	66,29 ± 3,44	51,88 ± 2,89	130,51 ± 6,44	7,30 ± 0,15	32,13 ± 0,91
PTX 5,0	65,93 ± 3,42	51,62 ± 2,87	131,24 ± 6,40	7,27 ± 0,16	32,06 ± 0,90
PTX 7,5	65,90 ± 3,42	51,65 ± 2,87	130,95 ± 6,40	7,26 ± 0,16	31,63 ± 0,90*

El asterisco (*) indica diferencia estadística significativa (por columna) comparado con el control ($p < 0.05$).

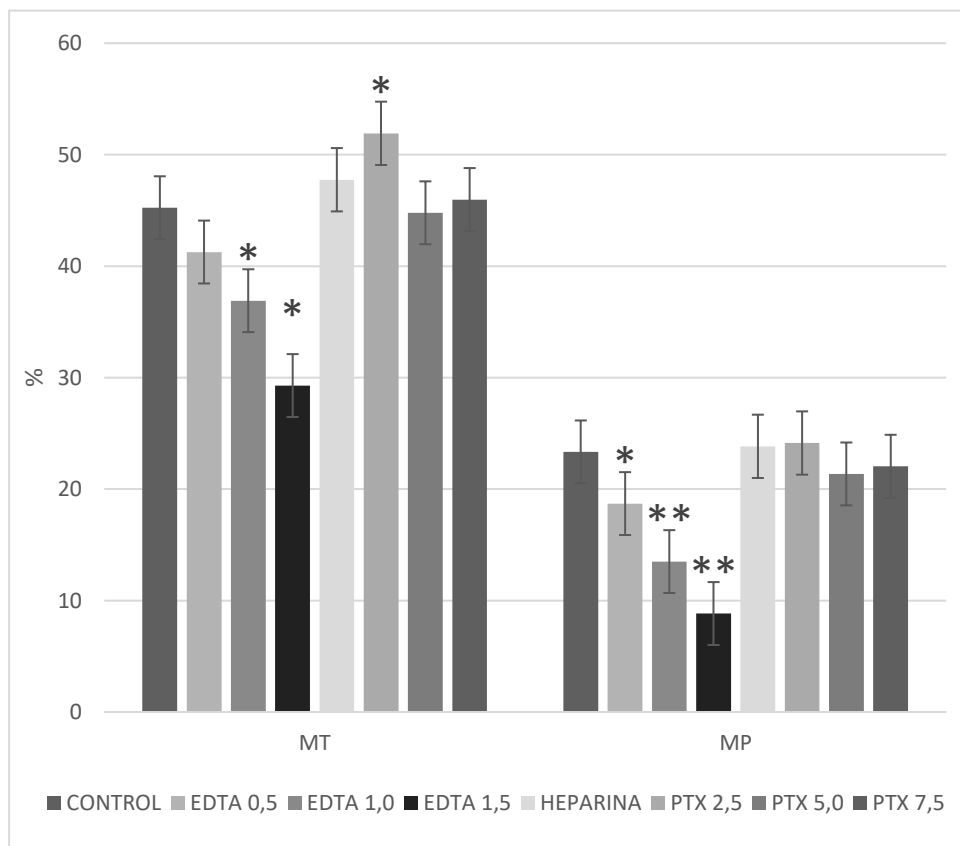
El asterisco (**) indica diferencia estadística significativa (por columna) comparado con el control ($p < 0.01$).

VAP: Velocidad media, VSL: Velocidad lineal, VCL: Velocidad curvilínea, ALH: Amplitud lateral de la cabeza, BCF: Frecuencia de batida.

Parámetros de cinética espermática como VSL, VCL, disminuyeron al adicionar los reactivos para un periodo posterior a la descongelación de 30 minutos en concentraciones de EDTA 1 y 1.5 mM ($p < 0.01$), igual comportamiento se registró para las variables ALH y BCF ($p < 0.05$) cuando se adicionó la concentración más alta de EDTA.

La PTX, también disminuyó la proporción de BCF respecto al control, cuando se adicionó la concentración de 7.5 mM ($p < 0.05$).

Figura 1 Movilidad del semen de burro congelado-descongelado con diferentes inductores de capacitación.



MT: movilidad total. MP: movilidad progresiva. El asterisco (*) indica diferencia estadística significativa comparado con el control ($p < 0.05$). El asterisco (**) indica diferencia estadística significativa comparado con el control ($p < 0.01$).

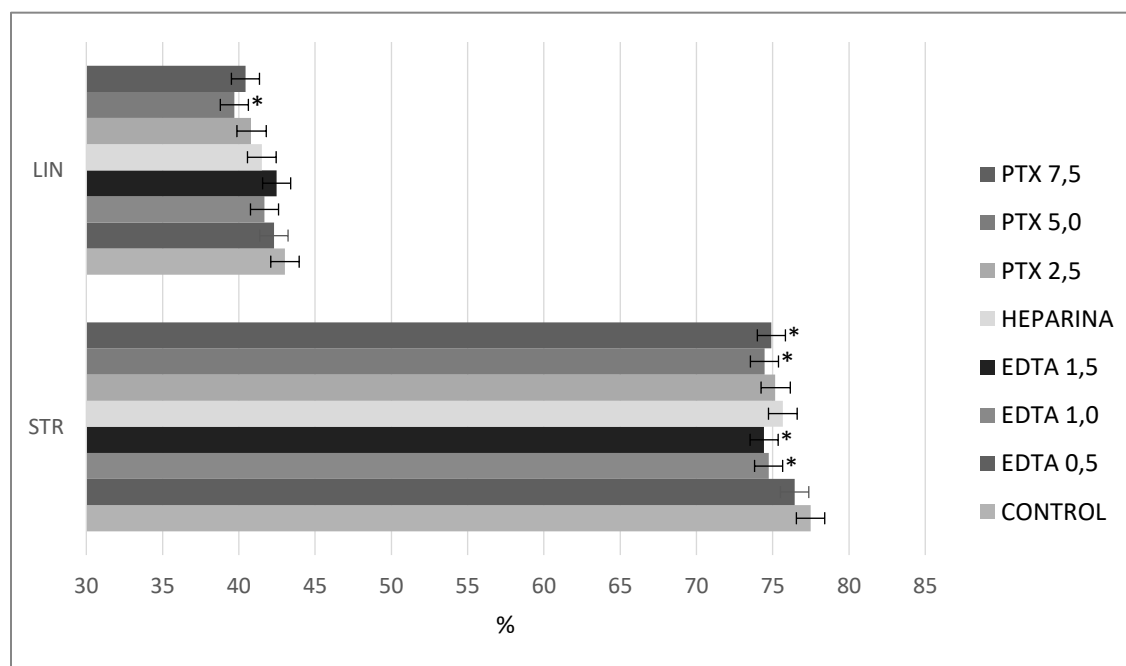
La **figura 1** que evidencia el comportamiento de MT y MP con la adición de los inductores de capacitación, muestra que a medida que aumentó la concentración de

EDTA disminuyó la MT para concentraciones de 1 mM ($p=0.0132$) y 1.5 mM ($p<.0001$), mientras que para MP, las tres concentraciones de este mismo reactivo decrecieron, con 0.5 mM ($p=0.0133$), 1.0 y 1.5 mM ($p<.0001$).

Por el contrario, la incubación con PTX 2.5 mM aumentó la MT ($p=0.0468$), mientras que, en ninguna de las demás concentraciones de este reactivo se apreciaron modificaciones respecto al control para esta variable ($p>0.05$). La MP, no mostró ningún efecto por la adición de este inductor ($p>0.05$).

Un comportamiento similar se observó al usar HEP. En ese sentido, la adición de HEP no alteró la MT y MP ($p>0.05$), aunque se mantuvo por encima del control sin ser estadísticamente diferente ($p>0.05$).

Figura 2 Índice de linealidad (LIN) e índice de rectitud (STR) para semen de burro congelado - descongelado con diferentes inductores de capacitación

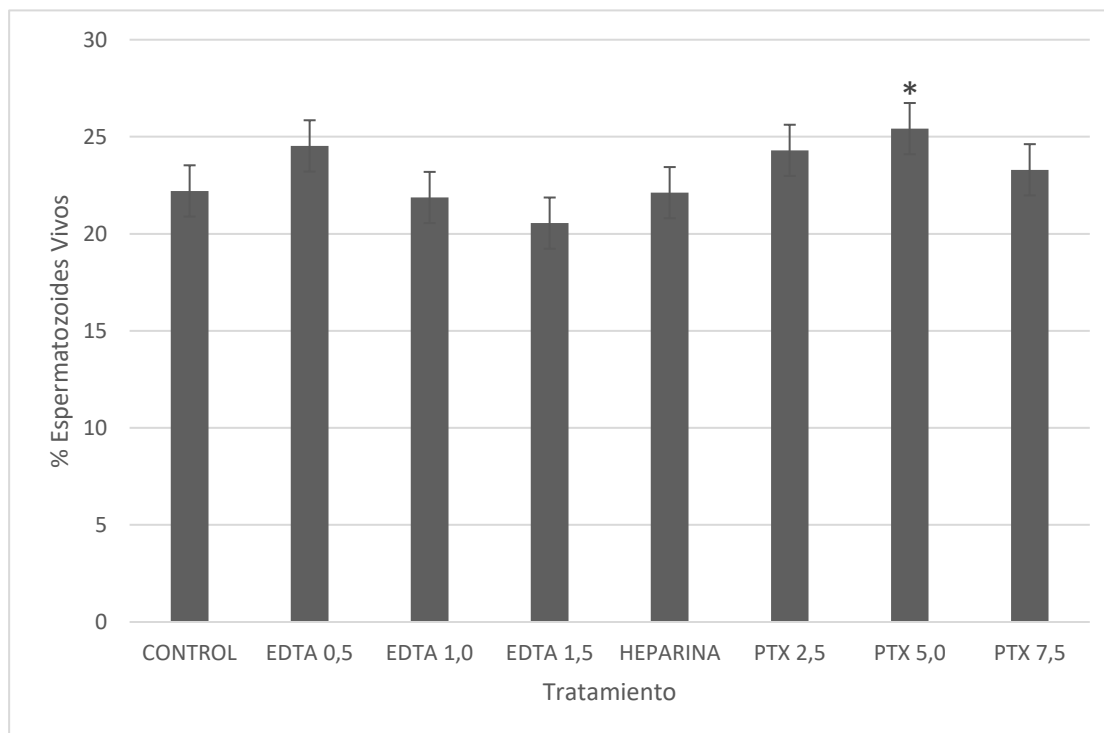


Linealidad (LIN) e índice de rectitud (STR). El asterisco (*) indica diferencia estadística significativa comparado con el control ($p<0.05$). El asterisco (**) indica diferencia estadística significativa comparado con el control ($p<0.01$).

Otras variables como LIN, redujeron su valor al adicionar EDTA 5 mM ($p=0.0326$). Mientras que este mismo comportamiento fue expresado por STR para las dos concentraciones más altas de EDTA, es decir, para 1mM ($p=0.0296$), 1.5 mM ($p=0.0162$).

y para PTX 5 mM ($p=0.0170$) y 7.5 mM ($p=0.0419$). Por otro lado, la suplementación con HEP no produjo ningún efecto sobre las dos variables mencionadas ($p>0.05$) (**Figura 2**)

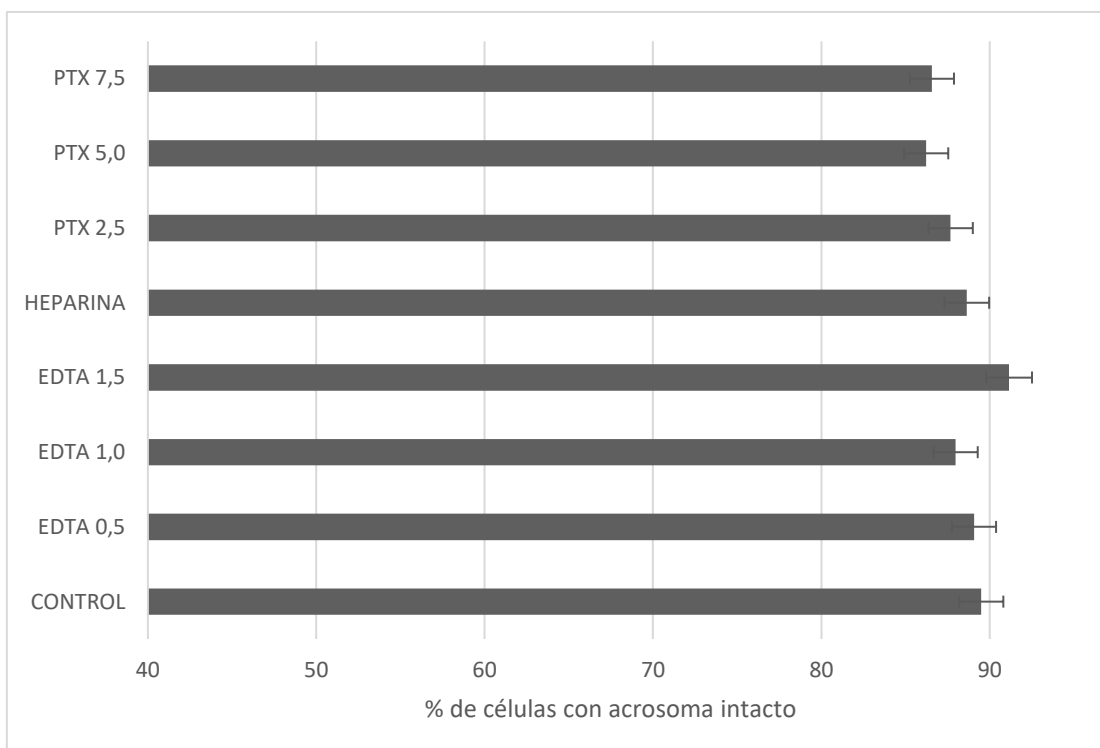
Figura 3 Vitalidad espermática de semen de burro congelado - descongelado con diferentes inductores de capacitación



El asterisco (*) indica diferencia estadística significativa comparado con el control ($p<0.05$). El asterisco (**) indica diferencia estadística significativa comparado con el control ($p<0.01$).

En la **figura 3**, se reporta el porcentaje de espermatozoides vivos postdescongelación obtenida mediante el uso del kit vivos/muertos en microscopia de fluorescencia. Aquí, la adición de PTX 5 mM aumentó este valor respecto al control ($p=0.0383$). Por el contrario, ninguna otra concentración analizada influyó en este parámetro ($p>0.05$). Por otro lado, se puede apreciar que los valores más bajos de vitalidad fueron presentados por las concentraciones más altas de EDTA.

Figura 4 Integridad del acrosoma de semen de burro congelado-descongelado con diferentes inductores de capacitación



El asterisco (*) indica diferencia estadística significativa comparado con el control ($p < 0.05$). El asterisco (**) indica diferencia estadística significativa comparado con el control ($p < 0.01$).

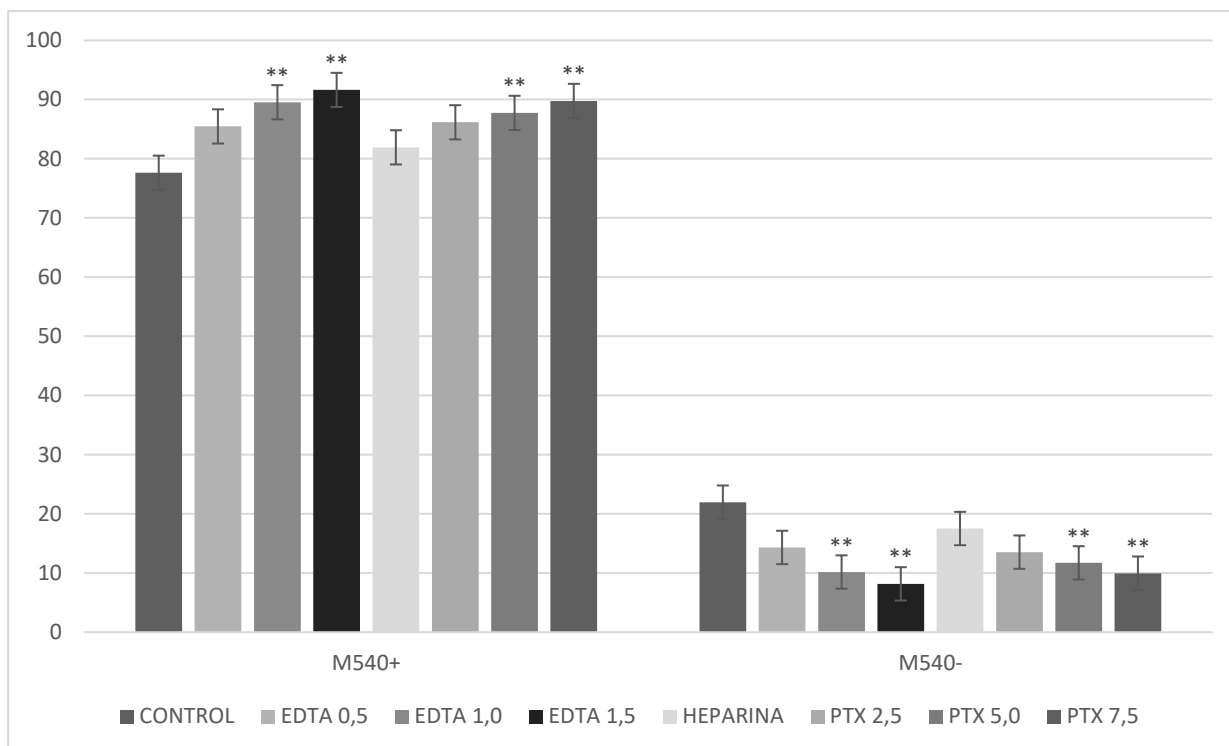
Con respecto a la integridad del acrosoma (**Figura 4**) no se vio influenciada por la adición de inductores de la capacitación estudiados ($p > 0.05$), aunque el mayor porcentaje de espermatozoides intactos se presentó cuando se incubó con EDTA 1.5 mM y HEP 1.1 mM.

Para los análisis realizados en citometría de flujo, fueron descongeladas un total de 40 pajillas, dos pajillas por cada eyaculado, en un total de 20 eyaculados (dos por burro). el modelo mixto las variables con menor dispersión fueron $\Delta\Psi$ altas, M540+, FURA bajas con un coeficiente de evaluación (CV) $< 20\%$, mientras que las demás variables estuvieron en un rango de 30 a 70%, donde la M540- presentó la mayor variabilidad.

Adicionalmente, el R^2 de las variables analizadas estuvo en un intervalo de 0.87 – 0.92, para las variables FURA altas y bajas, mientras que las variables $\Delta\Psi$ altas y bajas, M540- y M540+, estuvieron dentro del rango 0.31 – 0.32. Los valores medios de mínimos

cuadrados basados en modelos mixtos para los parámetros evaluados, se presentan en las figuras 4 y 5.

Figura 5 Estabilidad de la membrana del semen congelado-descongelado de burro



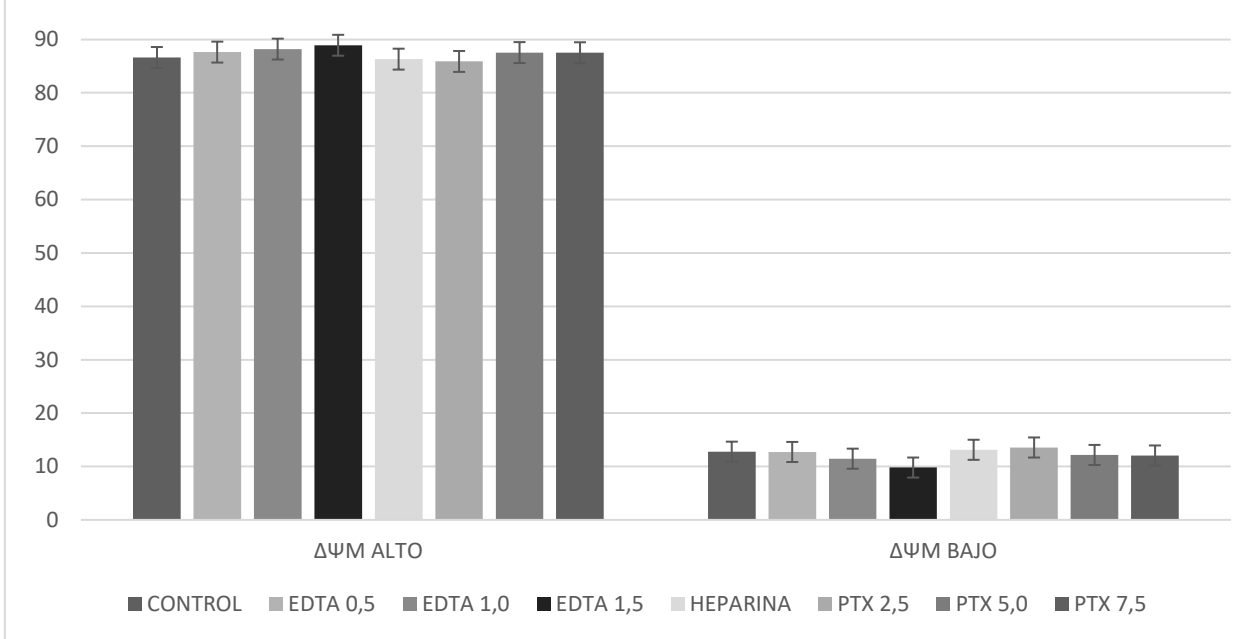
El asterisco (*) indica diferencia estadística significativa comparado con el control ($p < 0.05$). El asterisco (**) indica diferencia estadística significativa comparado con el control ($p < 0.01$).

La evaluación de la estabilidad de la membrana del semen congelado-descongelado se expresó en dos poblaciones de espermatozoides, en función de la capacitación (**Figura 5**) M540+ (Capacitados) y M540- (No Capacitados), se pudo observar que la mayor proporción de espermatozoides considerados capacitados, se presentaron en los tratamientos EDTA 1 mM y 1.5 mM, y PTX 5 mM y 7.5 mM ($p < 0.01$).

Entre los tratamientos evaluados, el mejor efecto se observó con EDTA 1.5 mM, seguido de 1 mM con mayores porcentajes de espermatozoides capacitados (91.63%) y (89.55%) respectivamente, vs el control. Mientras que EDTA 1.5mM y PTX 7.5 mM presentaron los menores porcentajes de espermatozoides no capacitados M540- con 8.17% y 10.17%, respectivamente. A pesar de que los tratamientos EDTA 0.5 mM, PTX 2.5 mM y HEP 1.1

mM, estuvieron numéricamente por encima de la media del control, estos no influyeron en la estabilidad de la membrana tras las descongelaciones de semen de burro, dado que no se halló una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

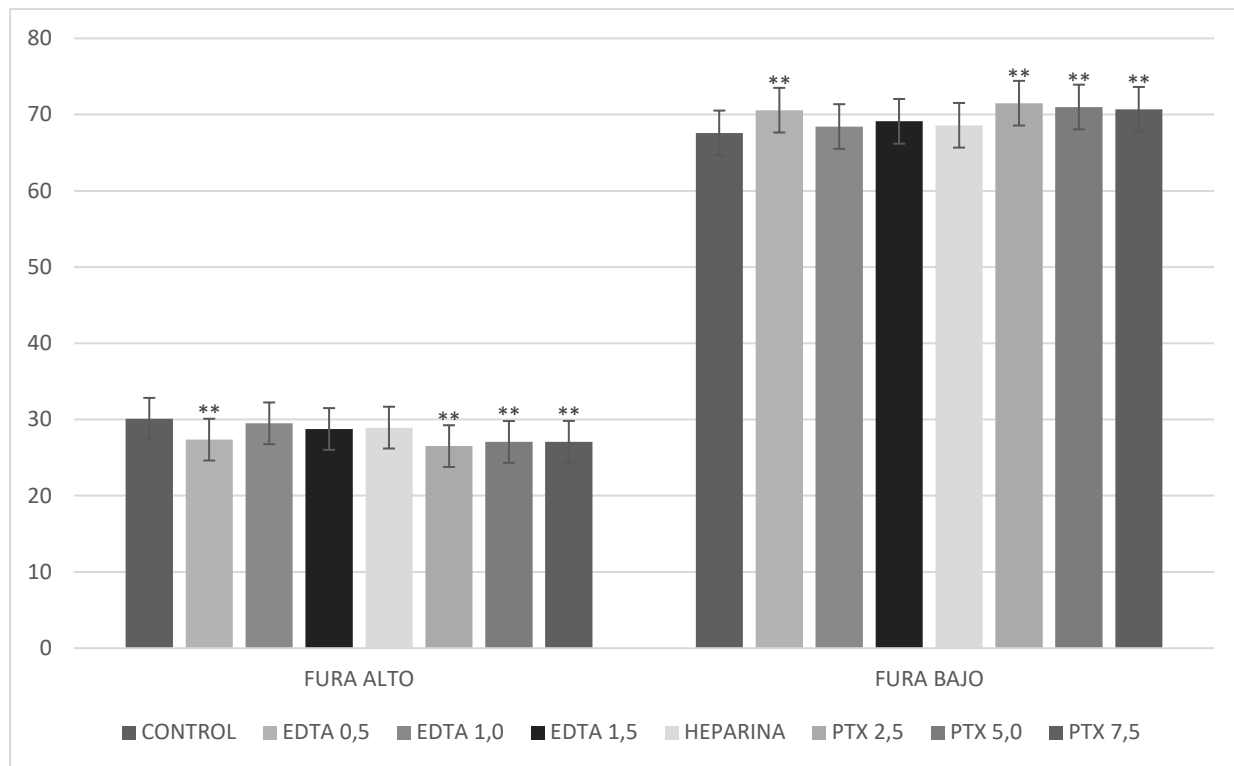
Figura 6 Actividad mitocondrial del semen congelado-descongelado de burro



El asterisco (*) indica diferencia estadística significativa comparado con el control ($p < 0.05$). El asterisco (**) indica diferencia estadística significativa comparado con el control ($p < 0.01$).

La actividad mitocondrial del semen congelado-descongelado se expresó como el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi M$). Basados en la tinción de DIOC6, las células fueron clasificadas como espermatozoides con bajo y alto $\Delta\Psi M$ (**Figura 6**). Para ninguna de las concentraciones hubo un efecto significativo del tratamiento sobre el $\Delta\Psi M$.

Figura 7 Aumento del Ca^{2+} intracelular dependiente de las concentraciones de cada tratamiento



El asterisco (*) indica diferencia estadística significativa comparado con el control ($p < 0.05$). El asterisco (**) indica diferencia estadística significativa comparado con el control ($p < 0.01$).

Finalmente, en la **figura 7**, se encontró que la adición de EDTA 0.5 mM y las tres concentraciones de PTX disminuyeron el contenido de Ca^{2+} intracelular, presentando un mayor porcentaje de células espermáticas con bajo contenido de FURA respecto al control ($p < 0.05$). Mientras que, EDTA 1.0 y 1.5 mM y HEP no generaron ningún efecto sobre la concentración de calcio Intracelular vs el control.

4. DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de inductores sobre la cinética, vitalidad y reacción del acrosoma

El uso de inductores de la capacitación postdescongelación como las metilxantinas, EDTA y HEP, se ha utilizado en diferentes experimentos con el objetivo de mejorar cualidades seminales, observándose que, la eficacia de los aditivos depende de factores

como la especie, la concentración y del uso de semen fresco, refrigerado o congelado (Stephens et al., 2013).

En cuanto a valores de cinética espermática, ninguno de los valores reportados (**Tabla 1**), coincide con valores reconocidos que puedan asociar a características de espermatozoides hiperactivados, valorados con CASA como VCL $\geq 180 \mu\text{m}$ y ALH $\geq 12 \mu\text{m}$ (Rathi et al., 2001).

No obstante, estos resultados si pueden coincidir con algunas correlaciones de las variables, investigadores como (Ortgies et al., 2012), indican que es característico de los espermatozoides hiperactivados la disminución de parámetros como VSL, STR, LIN y BCF, con el aumento de ALH, lo que sucedió, cuando se incubo con EDTA 1.5 mM ($p < 0.05$) (**Tabla 1 – Figura 2**)

Respecto a la adición de PTX postdescongelación se han reportado mejoras en la motilidad de especies como la humana (Keshtgar et al., 2016), canina (Mirshokraei et al., 2011), bovina (Barakat et al., 2015), equina (Guasti et al., 2017; Rota et al., 2019) y en ratones (Davoodi et al., 2020), sin embargo, este efecto al parecer no se había observado en el semen congelado-descongelado de burro (Rota et al., 2019), tal como sucedió en la presente investigación, donde la incubación con PTX 2.5 mM fue capaz de incrementar la MT (**Figura 1**). Esta mejora, podría explicarse, ya que en el presente estudio se utilizó una concentración de PTX menor a la reportada por (Rota et al., 2019), donde tanto a 5 mM como a 10 mM la incubación con PTX aumentó la motilidad total y la velocidad de los espermatozoides tras la descongelación en equinos, pero sin resultados positivos en burros. Esta concentración de PTX 2.5 mM, posiblemente pudo incrementar los niveles de AMPc, que a su vez incrementa la tasa de glucólisis y mantienen niveles altos de ATP necesarios para la motilidad de los espermatozoides (Glogowski et al., 2002; Tash & Means, 1982). Sin embargo, hasta ahora no se sabe mucho sobre las diferencias en la anatomía, la bioquímica y el metabolismo de los espermatozoides del burro y del caballo, algunos autores, describen que las diferencias radian en la sensibilidad del ADN espermático a los agentes desnaturizantes, probablemente debido a las diferencias en la organización de la cromatina en las dos especies (Cortés-Gutiérrez et al., 2014).

Pocos estudios han investigado los efectos de inductores de la capacitación como HEP; en bovinos, por ejemplo, la incubación por un periodo de 45 min, representó un incremento de la MP ($p < 0.05$) (Rodríguez et al., 2012), lo que difiere de los resultados expuestos en la presente investigación, dado que cuando el semen fue suplementado con HEP no se apreciaron diferencias en cuanto a MT y MP (**Figura 1**).

En cabras, independientemente del tiempo de incubación, hubo un aumento altamente significativo ($p < 0.05$) en el porcentaje de movilidad de los espermatozoides frescos tratados con 10, 25, 50, 75 y 100 mg/mL de heparina en comparación con el control (El-Shahat et al., 2016). Otros investigadores han observado que la heparina induce cambios de capacitación *in vitro* en los espermatozoides de búfalo de agua, y encontraron mejores resultados cuando estos son incubados por un periodo de 4 horas (Talukdar et al., 2015).

En la presente investigación, la incubación con HEP, no influyó de manera positiva o negativa en ninguna de las variables analizadas (Figuras 1 – 4) y se resalta que, en la revisión bibliográfica, no encontraron reportes del uso de HEP como inductor de la capacitación posdescongelación, ni resultados de la cinética espermática para semen de burro (**Tabla 1**).

Otra sustancia que cuenta con pocos reportes en semen de burro es el EDTA. Investigadores como (Okazaki et al., 2011) encontraron que este agente quelante utilizado en algunos estudios para mejorar la función espermática, tiene actividad espermicida, dependiente del tiempo y de la dosis. Dicha observación podría explicar la disminución de la MT y MP, dado que, para ambas variables, los valores disminuyeron progresivamente con el incremento de la concentración suplementada (**Figura 1**). Esto fue contrario con los resultados revelados por (Keshtgar et al., 2016), donde el EDTA no tuvo ningún efecto sobre la motilidad de los espermatozoides, ni por separado ni en combinación con otros reactivos como Trolox.

Sin embargo, cabe destacar, que a pesar de los pocos reportes del uso de EDTA en semen de burro descongelado, esta sustancia ha sido utilizada como complemento a los diluyentes que tienen como base la yema de huevo, y ha permitido obtener incremento en la MT y MP ($p < 0.05$) en muestras criopreservados con yema de huevo sin centrifugar

(Ferrante et al., 2018a). Además, este mismo autor reporta que el porcentaje de espermatozoides congelados-descongelados con acrosomas intactos fue mayor ($p < 0.05$) en las muestras con diluyentes donde se combinó yema de huevo y EDTA (Ferrante et al., 2018a), comportamiento similar, se obtuvo en los resultados de esa investigación, donde aunque no fue significativo, la concentración más elevada de EDTA, representó el mayor porcentaje de acrosomas intactos (**figura 4**). Del mismo modo, otras investigaciones han declarado que la presencia de EDTA como agente quelante bloquearía la acción del calcio como mediador de la capacitación espermática y de la reacción acrosómica (Orrego et al., 2019).

Autores como (Keshtgar et al., 2016) reportan que el uso de EDTA no incrementa la proporción de la movilidad, después de incubar durante una hora los espermatozoides en la especie humana, en este caso, variables como MT y MP, pasaron de 91.7 ± 0.9 y 76.3 ± 2 , a 41.3 ± 3 y 23.4 ± 2.3 respectivamente, usando una concentración de 1.1 mM EDTA.

Resultados similares obtuvieron (Chi et al., 2008), cuando se agregó EDTA al medio de preparación de espermatozoides a una concentración de (1 mM), la movilidad de los espermatozoides en humanos, disminuyó bruscamente hasta casi cero, lo que indica que una quelación excesiva de iones divalentes como el calcio que es perjudicial para la movilidad de los espermatozoides.

En cuanto a los valores de cinética espermática al incubar con PTX en todas las concentraciones, VAP estuvo por debajo de los valores reportados por (Guasti et al., 2017) para equinos, aunque los resultados de ALH fueron similares los reportados por este mismo autor (**Tabla1**).

De acuerdo con la búsqueda realizada, este reporte con EDTA y HEP como suplemento en el semen de burro postdescongelación, sería el primero en realizarse, dado que, hasta la fecha, estas moléculas han sido principalmente implementadas como aditivos en diferentes diluyentes antes de la criopreservación y para diversos efectos farmacológicos (Davoodi et al., 2020; Keshtgar et al., 2016).

Reportándose uso de diferentes concentraciones de HEP en medio Fert-TALP 10 UI/ml, 10 µg/ml para espermatozoides eyaculados; 40 µg/ml para espermatozoides epididimarios con el objetivo de determinar capacitación espermática en diferentes intervalos de tiempo (0, 15, 30 y 60 min) usando el método de fluorescencia de clortetraciclina (CTC) en bovinos (Rodríguez-Villamil et al., 2020). Otras especies como los carneros se han desarrollado medios de capacitación para semen congelado-descongelado, usando concentraciones de HEP desde 1 µL (García-Álvarez et al., 2015). En cuanto a EDTA, la literatura es más incipiente, pero se reportan concentraciones de 0.37g (EDTA) en diluyentes compuestos por lactosa-EDTA-glucosa usados para criopreservación de semen de burro (Ferrante et al., 2018b).

Otros autores como (Mercati et al., 2020) han sugerido el uso 50 mM de EDTA, como complemento a medio de liofilización compuesto por (tampón Tris-HCl 10 mM y NaCl 50 mM) en conejos, mientras que como se mencionó anteriormente (Keshtgar et al., 2016), proponen incubar EDTA 1.1 mM por 60 minutos a fin de mejorar la función espermática en semen congelado-descongelado en humanos.

Variables como LIN redujo su proporción cuando se adicionó PTX 5 mM, mientras que para STR, disminuyó tanto para PTX 5 y 7.5 mM como para EDTA 1 y 1.5 mM ($p < 0.05$) (Figura 2), esto es contrario a lo reportado por (Rota et al., 2019) donde ninguno de estos valores resultó en diferencias significativas para burros. Un comportamiento similar fue reportado en equinos por (Ortgies et al., 2012), quienes utilizaron PTX como inductor de la capacitación.

Hasta ahora, es ampliamente aceptado que el almacenamiento a temperaturas ultrabajas (dilución, enfriamiento, congelación y descongelación) deteriora la membrana plasmática de los espermatozoides y provoca la pérdida de lípidos, lo que conlleva a una disminución de la vitalidad (White, 1993).

Sin embargo, en la presente investigación, se reporta que el uso de PTX a 5 mM, incrementa el porcentaje de espermatozoides vivos (**Figura 3**), esto puede ser explicado, por la dosis usada, investigadores como (Esteves et al., 2007) han reportado que a esta

concentración la PTX tiene la capacidad de eliminación de radicales libres de oxígeno al reducir la liberación de superóxido de los espermatozoides en humanos.

Esto es contrario a lo reportado por (Slanina et al., 2018) donde las concentraciones de cafeína (un tipo de metilxantinas) probadas no tenían un efecto significativo sobre la viabilidad de los espermatozoides incubados en aves. Aunque, se ha publicado que por ejemplo en humanos, la pentoxifilina con una dosis de 200 µg/ml aumentó significativamente la tasa de viabilidad de los espermatozoides en hombres infértiles que sufrían oligoastenozoospermia (Ghasemzadeh et al., 2016). Hasta ahora no se han reportado estos efectos en burros.

La adición de PTX, tampoco influyó sobre la integridad acrosomal (Figura 4), aunque en otras especies como la canina, este parámetro fue significativamente mayor que los controles a 10 mM de PTX ($p < 0.05$), y no se reportaron efectos con concentraciones bajas como 0.1 y 1mM comparadas con el control después de una hora de incubación (Mirshokraei et al., 2011). Por otro lado, los resultados con EDTA, coinciden con (Keshtgar et al., 2016), donde manifestó que la reacción acrosómica en los espermatozoides frescos no se vio afectada por el EDTA; sin embargo, el EDTA disminuyó la pérdida acrosómica en los espermatozoides congelados-descongelado. Esta tendencia se puede apreciar en los resultados aquí expuesto, pues el mayor porcentaje de integridad acrosómica se vio, cuando se adiciono la concentración EDTA 1.5 mM (Figura 4).

Finalmente es importante resaltar, que varios de resultados aquí expuestos, pueden ser inéditos para semen de burro evaluado postdescongelación y es necesario continuar ahondando sobre el modo de acción de los diferentes reactivos, que otro tipo de concentraciones pueden permitir mejorar características espermáticas deseables, ya sea para programas de reproducción *in vivo* o *in vitro*.

4.2. Efecto de inductores de la capacitación espermática sobre la estabilidad de membrana, el flujo de calcio y actividad mitocondrial

Nuestros resultados mostraron que la adición posdescongelación de EDTA 1 y 1.5 mM y PTX 2.5 y 7.5 mM influyeron en los cambios arquitectónicos de la membrana asociados a la capacitación de los espermatozoides (**Figura 5**). Esto coincidió con lo reportado por

(Ortgies et al., 2012) donde la adición de PTX a una concentración de 3.5 mmol aumentó la proporción de espermatozoides equinos capacitados (35-55%).

Aunque durante la revisión bibliográfica, no se encontraron reportes sobre la evaluación de cambios en la estructura de la membrana con la adición de EDTA postdescongelación en burros, si existen algunos reportes con el uso de PTX, enfocados en la cinética espermática de semen congelado-descongelado (Rota et al., 2019). Sin embargo, la incubación con PTX no generó efecto alguno en parámetros asociados con la movilidad espermática.

Otras sustancias utilizadas para inducir cambios asociados a la capacitación como la reorganización de las proteínas de la membrana, el metabolismo de los fosfolípidos, la reducción del nivel de colesterol y la hiperactivación de los espermatozoides (Dhanju et al., 2009) de semen congelado-descongelado de burro tampoco han sido fructíferos, pues por ejemplo el uso de prolina en concentraciones de 30 y 40 mM, no indujo cambios en la membrana plasmática (Li et al., 2021).

Hasta ahora, continúan los vacíos sobre las diferencias en la anatomía, la bioquímica y el metabolismo de los espermatozoides del burro y del caballo, autores, describen que existen diferencias en la sensibilidad del ADN espermático a los agentes desnaturalizantes, eso se explica en parte a las diferencias en la organización de la cromatina en las dos especies (Cortés-Gutiérrez et al., 2014).

Estas sustancias y las concentraciones usadas en esta investigación pueden ser representativos en la activación de los espermatozoides tras la descongelación, coincidente con lo reportado por (Stanic et al., 2002) para muestras humanas usando PTX. El mecanismo por el cual se supone que este compuesto actúa, es debido a que promueve la acumulación de AMPc, inhibiendo la enzima fosfodiesterasa, y este aumento de los niveles de AMPc incrementaría la tasa de glicólisis, que a su vez genera trifosfato de adenosina, necesario para la motilidad de los espermatozoides (Glogowski et al., 2002; Yovich, 1993). Sin embargo, es claro que el papel de PTX y EDTA en la conservación del semen de mamíferos sigue siendo indeterminado, y la información relativa a los efectos estos en la criopreservación del semen de burro es limitada.

La actividad mitocondrial (**Figura 6**) no fue influenciada por ninguno de los tratamientos, sin embargo los valores hallados, mayores al 85%, parecen coincidir con lo reportado por (Gloria et al., 2011), para espermatozoides del epidídimo (85.7 ± 3.1 %) y fueron superiores a la actividad para semen fresco ($77.6 \pm 2.6\%$) en burros. Investigadores como (Contri, et al., 2012a) también reportaron valores inferiores de actividad mitocondrial a los del presente estudio, para diferentes porciones anatómicas de los testículos de burro (50 – 70%).

Se ha reportado que, en los espermatozoides de burro, la actividad mitocondrial esta positivamente correlacionada con la cinética de los espermatozoides y negativamente con algunos indicadores de ROS, como LPO (Peroxidación lipídica) y NBT (Solución de sal de tetrazolio) (Di Palma et al., 2020). Esta actividad podría desempeñar un papel vital en el mantenimiento energético de la motilidad del espermatozoide, crucial para la fertilidad de los mamíferos (Mackenna, 1995).

La proporción de Ca^{2+} intracelular, disminuyó para todas las concentraciones de PTX y para EDTA 0.5 mM ($p < 0.01$), mientras que no se observaron efectos respecto al control para HEP y EDTA 1 y 1.5 mM. Esto es importante ya que la señalización del influjo de Ca^{2+} es un punto crítico para la motilidad de los espermatozoides, la capacitación, la reacción del acrosoma y el Ca^{2+} puede cruzar la cascada de AMPc a través de la activación de la adenilato ciclasa soluble (Molina et al., 2018). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que las tres concentraciones de PTX y EDTA 0.5 mM parecen inhibir el ingreso de Ca^{2+} , lo que indica que otros mecanismos pueden estar implicados en la hiperactivación y capacitación de los espermatozoides no dependiente de Ca^{2+} intracelular.

Estos datos coinciden con lo reportado por (Nassar et al., 1998) donde observaron que la PTX 3.6 mM, produjo una disminución marginalmente significativa de la Ca^{2+} intracelular después de 30 segundos de estimulación y la misma se mantuvo durante aproximadamente 20 minutos.

Por otro lado, autores como (El-Shahat et al., 2016) usaron otro tipo de metalxantinas como la cafeína en espermatozoides de carnero con 1 mg/mL y consideraron que la incubación durante 4 h es la mejor opción para ser usado la FIV.

Otros investigadores han tenido resultados similares donde la incubación de PTX con semen congelado-descongelado no incrementa la concentración de Ca^{2+} y que su efecto es variable en función del tiempo para semen bovino (Boni et al., 2017).

El resultado de la HEP, es similar a los publicados por (Leclerc et al., 1992) donde la incubación de los espermatozoides bovinos congelados-descongelados, durante 6 horas en presencia de HEP (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), no incrementó la proporción de Ca^{2+} intracelular comparado con el control ($p < 0.05$). Mientras que la incubación con EDTA 6 mmol/L , durante 3 o 6 horas, representó incrementos los niveles de Ca^{2+} ($p < 0.01$) para espermatozoides de cerdos posdescongelación (Okazaki et al., 2011), aunque no es equiparable la especie, esto en parte puede explicar porque no se aumentaron los niveles de Ca^{2+} . Lo anterior puede sugerir que el efecto de estos potenciadores del metabolismo espermático usados en la presente investigación y sus diferentes concentraciones, están en función del tiempo, pues el tiempo incubación con este promotor de la capacitación fue considerada por un espacio de 30 minutos.

Finalmente, a pesar de que es necesario profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados en la capacitación de semen de burro y sus implicaciones en la estructura de membrana, actividad mitocondrial y flujo de calcio, nuestros resultados estarían mostrando que los espermatozoides de burro se ven influenciados por el uso de estos mediadores del metabolismo.

5. CONCLUSIONES

- La adición de PTX en la concentración más baja, tiene efecto positivo significativo en la MT de semen de burro congelado-descongelado y aunque no mejora el resto de variables de movilidad cinética evaluadas, tampoco tiene un efecto deletéreo cuando se incrementan la dosis.
- El uso de EDTA en altas concentraciones tienen un efecto reductor la cinética espermática del semen de burro congelado-descongelado.
- Ninguno de los inductores de la capacitación adicionados al semen de burro, logro aumentar las variables VCL y ALH a valores cercanos a un espermatozoide hiperactivado.

- Los cambios en la estructura de la membrana plasmática asociados a eventos de capacitación de semen congelado-descongelado de burro, puede ser modulada por la suplementación con PTX (5 mM y 7.5 mM) y EDTA (1 mM y 1.5 mM). Sin embargo, la adición de estos inductores de la capacitación, no logró influencia en el ingreso de Ca^{2+} , por lo tanto, se requiere mayor nivel de investigación ya que los mecanismos e implicaciones en la capacitación espermática para semen de burro aún son desconocidos.
- El Ca^{2+} intracelular de los espermatozoides de burro descongelados, disminuye significativamente con la adición de PTX a 2.5, 5 y 7.5 mM, mientras que este efecto se observó en EDTA a 0.5 mM.

6. RECOMENDACIONES

Aún continúan vacíos sobre qué características propias del burro como su comportamiento, anatomía y fisiología espermática pueden contribuir a mejorar las características espermáticas, muchas de las publicaciones son enfocadas en los equinos y de una manera ligera, las técnicas biotecnológicas son extrapoladas a la reproducción y cría de burros.

Por lo anterior se sugiere ahondar más en el tipo de factores que pueden lograr potenciar las características deseables en el semen de burro, contribuyendo a lograr mantener la especie aun considerada en vía de extinción.

7. BIBLIOGRAFIA

- Acha, D., Hidalgo, M., Ortiz, I., Gálvez, M. J., Carrasco, J. J., 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. <https://doi.org/10.1071/RD14449>
- Arenas, E., Cambron, A., Ambriz, D., Zuñiga, P., Rodriguez, A., & Rosado, A. (2010). Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. *Contactos*, 78, 5–11.
- Ball, G. F., & Balthazart, J. (2008). How useful is the appetitive and consummatory distinction for our understanding of the neuroendocrine control of sexual behavior? In

- Hormones and Behavior* (Vol. 53, Issue 2, pp. 307–311). NIH Public Access.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.09.023>
- Barakat, I. A. H., Danfour, M. A., Galewan, F. A. M., & Dkhil, M. A. (2015). Effect of Various Concentrations of Caffeine, Pentoxifylline, and Kallikrein on Hyperactivation of Frozen Bovine Semen. *BioMed Research International*, 2015, 948575.
<https://doi.org/10.1155/2015/948575>
- Bennett, R., & Pfuderer, S. (2020). The potential for new donkey farming systems to supply the growing demand for hides. *Animals*, 10(4).
<https://doi.org/10.3390/ani10040718>
- Bhattacharya, S. (2018). Cryoprotectants and Their Usage in Cryopreservation Process. *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.80477>
- Blench, R. (2012). Wild Asses and Donkeys in Africa: Interdisciplinary Evidence for Their Biogeography, History and Current Use. *Soas*, May 2012.
- Bollwein, H., Fuchs, I., & Koess, C. (2008). Interrelationship Between Plasma Membrane Integrity, Mitochondrial Membrane Potential and DNA Fragmentation in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(2), 189–195. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00876.x>
- Boni, R., Gallo, A., & Cecchini, S. (2017). Kinetic activity, membrane mitochondrial potential, lipid peroxidation, intracellular pH and calcium of frozen/thawed bovine spermatozoa treated with metabolic enhancers. *Andrology*, 5(1), 133–145.
<https://doi.org/10.1111/andr.12259>
- Breitbart, H., & Finkelstein, M. (2015). Regulation of Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction by PIP2 and Actin Modulation. *Asian Journal of Andrology*, 17(4), 597–600. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.154305>
- Breitbart, H., & Shabtay, O. (2018). Sperm acrosome reaction. In *Encyclopedia of Reproduction* (Second Ed, Vol. 3). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.66186-X>
- Brener, E., Rubinstein, S., Cohen, G., Shternall, K., Rivlin, J., & Breitbart, H. (2003). Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction*, 68(3), 837–845.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.009233>
- Buffone, M. G., Wertheimer, E. V., Visconti, P. E., & Krapf, D. (2014). Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. In *Biochimica et Biophysica*

Acta - Molecular Basis of Disease (Vol. 1842, Issue 12, pp. 2610–2620). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.013>

Bustamante, I. C., Pederzoli, C. D., Sgaravatti, A. M., Gregory, R. M., Dutra Filho, C. S., Jobim, M. I. M., & Mattos, R. C. (2009). Skim milk-egg yolk based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. In *Anim. Reprod.*, v (Vol. 6, Issue 2). Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.

Calogero, A. E., Fishel, S., Hall, J., Ferrara, E., Vicari, E., Green, S., Hunter, A., Burrello, N., Thornton, S., & D'Agata, R. (1998). Correlation between intracellular cAMP content, kinematic parameters and hyperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoxifylline. *Human Reproduction*, 13(4), 911–915.
<https://doi.org/10.1093/humrep/13.4.911>

Canisso, I. F., Carvalho, G. R., Morel, M. C. G. D., Guimarães, J. D., & McDonnell, S. M. (2010). Sexual behavior and ejaculate characteristics in Pêga donkeys (*Equus asinus*) mounting estrous horse mares (*Equus caballus*). *Theriogenology*, 73(1), 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.026>

Canisso, I. F., & McDonnell, S. M. (2010). Donkey breeding behavior with an emphasis on the Pêga breed. *MATTHEWS NS & TAYLOR TS. Veterinary Care of Donkeys. Ithaca: International Veterinary Information Service*, 310.

Canisso, I. F., Panzani, D., Miró, J., & Ellerbrock, R. E. (2019). Key Aspects of Donkey and Mule Reproduction. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 35(3), 607–642. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2019.08.014>

Carluccio, A., Contri, A., Amendola, S., De Angelis, E., De Amicis, I., & Mazzatenta, A. (2013). Male isolation: A behavioral representation of the pheromonal “female effect” in donkey (*Equus asinus*). *Physiology and Behavior*, 118, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.04.005>

Carminati, D., & Tidona, F. (2017). Nutritional Value and Potential Health Benefits of Donkey Milk. In *Nutrients in Dairy and Their Implications for Health and Disease*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809762-5.00031-0>

Carneiro, G. F., Cavalcante Lucena, J. E., & de Oliveira Barros, L. (2018). The Current Situation and Trend of the Donkey Industry in South America. *Journal of Equine Veterinary Science*, 65, 106–110. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.03.007>

Carvalho, L. E., Silva Filho, J. M., Palhares, M. S., Sales, A. L. R., Gonczarowska, A. T., Oliveira, H. N., Resende, M. C., Neves, M. G., & Madison, R. J. (2017). Physical characteristics and fertility of fractionated donkey semen cooled at 5°C. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 69(1), 29–38.
<https://doi.org/10.1590/1678-4162-7976>

- Consuegra, C., Crespo, F., Bottrel, M., Ortiz, I., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., & Hidalgo, M. (2018). Stallion sperm freezing with sucrose extenders: A strategy to avoid permeable cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*, *191*, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.013>
- Contri, A., Gloria, A., Robbe, D., De Amicis, I., & Carluccio, A. (2012a). Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis. *Theriogenology*, *77*(1), 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.031>
- Contri, A., Gloria, A., Robbe, D., Sfirro, M. P., & Carluccio, A. (2012b). Effect of sperm concentration on characteristics of frozen-thawed semen in donkeys. *Animal Reproduction Science*, *136*(1–2), 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.022>
- Cortés-Gutiérrez, E. I., Dávila-Rodríguez, M. I., López-Fernández, C., Fernández, J. L., Crespo, F., & Gosálvez, J. (2014). Localization of alkali-labile sites in donkey (*Equus asinus*) and stallion (*Equus caballus*) spermatozoa. *Theriogenology*, *81*(2), 321–325. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2013.10.001>
- Darwin, C. (1859). *Origem das espécies: E a seleção natural*.
- Davoodi, F., Raisi, A., Rajabzadeh, A., Hablolvarid, M. H., & Zakian, A. (2020). The effects of verapamil and heparin co-administration on sperm parameters and oxidative stress in prevention of testicular torsion/detorsion damage in rats. *Andrologia*, *52*(2), 1–8. <https://doi.org/10.1111/and.13479>
- de Andrade, A. F. C., Zaffalon, F. G., Celeghini, E. C. C., Nascimento, J., Tarragó, O. F. B., Martins, S., Alonso, M. A., & Arruda, R. P. (2011). Addition of Seminal Plasma to Post-thawing Equine Semen: What is the Effect on Sperm Cell Viability? *Reproduction in Domestic Animals*, *46*(4), 682–686. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01729.x>
- de Vasconcelos Franco, J. S., Faheem, M., Chaveiro, A., & Moreira da Silva, F. (2016). Effects of α -tocopherol and freezing rates on the quality and heterologous in vitro fertilization capacity of stallion sperm after cryopreservation. *Theriogenology*, *86*(4), 957–962. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.019>
- Demyda-Peyrás, S., Bottrel, M., Acha, D., Ortiz, I., Hidalgo, M., Carrasco, J. J., 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. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.069>
- Dhanju, C. K., Toor, G., & Cheema, R. S. (2009). Effect of seminal plasma on quantity and quality of proteins leaked during heparin - induced in vitro capacitation of bull sperm. *Indian Journal of Animal Research*, *43*(2), 136–138.

- Di Palma, T., Cecchini, S., MacChia, G., Pasolini, M. P., Cocchia, N., & Boni, R. (2020). Kinematic, bioenergetic and oxidative evaluations of donkey sperm preserved at +4°C. *Zygote*, 1–8. <https://doi.org/10.1017/S096719942000012X>
- Di Paolo, G., & De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, 443(7112), 651–657. <https://doi.org/10.1038/nature05185>
- Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., & Borini, A. (2012). Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Advances in Urology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/854837>
- Diaz-Jimenez, M., Dorado, J., Ortiz, I., Consuegra, C., Pereira, B., Gonzalez-De Cara, C. A., Aguilera, R., Mari, G., Mislei, B., Love, C. C., & Hidalgo, M. (2018). Cryopreservation of donkey sperm using non-permeable cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*, 189(December 2017), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.013>
- Dong, W. W., Zeng, Z. Da, Au, D., Chan, C. O., Yang, D. J., & Li, X. B. (2012). Quality control of Colla corii asini using near-infrared spectroscopy and chemometrics clustering techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*, 20(1), 152–158.
- Dorado, J., Acha, D., Ortiz, I., Gálvez, M. J., Carrasco, J. J., Díaz, B., Gómez-Arrones, V., Calero-Carretero, R., & Hidalgo, M. (2013). Relationship between conventional semen characteristics, sperm motility patterns and fertility of Andalusian donkeys (*Equus asinus*). *Animal Reproduction Science*, 143(1–4), 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.10.003>
- Dorado, J., Hidalgo, M., Acha, D., Ortiz, I., Bottrel, M., Azcona, F., Carrasco, J. J., Gómez-Arrones, V., & Demyda-Peyrás, S. (2019). Cryopreservation of Andalusian donkey (*Equus asinus*) spermatozoa: Use of alternative energy sources in the freezing extender affects post-thaw sperm motility patterns but not DNA stability. *Animal Reproduction Science*, 208(June), 106126. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106126>
- Douet, C., Reigner, F., Barrière, P., Blard, T., Deleuze, S., & Goudet, G. (2019). First attempts for vitrification of immature oocytes in donkey (*Equus asinus*): Comparison of two vitrification methods. *Theriogenology*, 126, 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.030>
- El-Shahat, K. H., Taysser, M. I., Badr, M. R., & Zaki, K. A. (2016). Effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A23187 on in vitro induction of the acrosome reaction of fresh ram spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(2), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.01.012>
- Esteves, S. C., Spaine, D. M., & Cedenho, A. P. (2007). Effects of pentoxifylline treatment before freezing on motility, viability and acrosome status of poor quality human spermatozoa cryopreserved by the liquid nitrogen vapor method. *Brazilian Journal of*

- Medical and Biological Research*, 40(7), 985–992. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2006005000118>
- Fernández, S., Morado, S., Cetica, P., & Córdoba, M. (2020). Hyaluronic acid capacitation induces intracellular signals modulated by membrane-associated adenylate cyclase and tyrosine kinase involved in bovine in vitro fertilization. *Theriogenology*, 148, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.033>
- Ferrante, A., Baca Castex, C., Bruno, S., Arraztoa, C., Plaza, J., Neild, D., & Miragaya, M. (2018a). 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. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.02.024>
- Ferrante, A., Baca Castex, C., Bruno, S., Arraztoa, C., Plaza, J., Neild, D., & Miragaya, M. (2018b). 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. <https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2018.02.024>
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991–1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
- Finkelstein, M., Etkovitz, N., & Breitbart, H. (2010). Role and regulation of sperm gelsolin prior to fertilization. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(51), 39702–39709. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.170951>
- Finkelstein, M., Megnagi, B., Ickowicz, D., & Breitbart, H. (2013). Regulation of sperm motility by PIP2(4,5) and actin polymerization. *Developmental Biology*, 381(1), 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.06.014>
- Fredholm, B. B., & Lindström, K. (1986). The Xanthine Derivative 1-(5'-Oxohexyl)-3-methyl-7-propyl Xanthine (HWA 285) Enhances the Actions of Adenosine. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 58(3), 187–192. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1986.tb00093.x>
- Gamboa, S., Rodrigues, A. S., Henriques, L., Batista, C., & Ramalho-Santos, J. (2010). Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 73(7), 950–958. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.023>
- García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Jiménez-Rabadán, P., Ramón, M., del Olmo, E., Iniesta-Cuerda, M., Anel-López, L., Fernández-Santos, M. R., Garde, J. J., & Soler, A. J. (2015). Effect of different media additives on capacitation of frozen–thawed ram

- spermatozoa as a potential replacement for estrous sheep serum. *Theriogenology*, 84(6), 948–955. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2015.05.032>
- Gervasi, M. G., Marczylo, T. H., Lam, P. M., Rana, S., Franchi, A. M., Konje, J. C., & Perez-Martinez, S. (2013). Anandamide Levels Fluctuate in the Bovine Oviduct during the Oestrous Cycle. *PLoS ONE*, 8(8), e72521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072521>
- Gervasi, M. G., & Visconti, P. E. (2016). Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective. *Molecular Reproduction and Development*, 83(10), 860–874. <https://doi.org/10.1002/mrd.22663>
- Ghasemzadeh, A., Karkon-Shayan, F., Yousefzadeh, S., Naghavi-Behzad, M., & Hamdi, K. (2016). Study of pentoxifylline effects on motility and viability of spermatozoa from infertile asthenozoospermic males. *Nigerian Medical Journal*, 57(6), 324. <https://doi.org/10.4103/0300-1652.193857>
- Glogowski, J., Danforth, D. R., & Ciereszko, A. (2002). Inhibition of alkaline phosphatase activity of boar semen by pentoxifylline, caffeine, and theophylline. *Journal of Andrology*, 23(6), 783–792.
- Gloria, A., Contri, A., De Amicis, I., Robbe, D., & Carluccio, A. (2011). Differences between epididymal and ejaculated sperm characteristics in donkey. *Animal Reproduction Science*, 128(1–4), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.09.007>
- Grötter, L. G., Cattaneo, L., Marini, P. E., Kjelland, M. E., & Ferré, L. B. (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(4), 655–665. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>
- Guasti, P. N., Monteiro, G. A., Maziero, R. R. D., Carmo, M. T., Dell'Aqua, J. A., Crespilho, A. M., Rifai, E. A., & Papa, F. O. (2017). Pentoxifylline effects on capacitation and fertility of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, 179, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.01.013>
- Guo, S., Savolainen, P., Su, J., Zhang, Q., Qi, D., Zhou, J., Zhong, Y., Zhao, X., & Liu, J. (2006). Origin of mitochondrial DNA diversity of domestic yaks. *BMC Evolutionary Biology*, 6, 73. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-73>
- Haddad, R., Khan, R., Takahashi, Y. K., Mori, K., Harel, D., & Sobel, N. (2008). A metric for odorant comparison. *Nature Methods*, 5(5), 425–429. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1197>
- Henry, M., Snoeck, P. P. N., & Cottorello, A. C. P. (2002). Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different

- cryoprotectants. *Theriogenology*, 58(2–4), 245–248. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00750-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00750-1)
- Hu, J., Zhong, C., Ding, C., Chi, Q., Walz, A., Mombaerts, P., Matsunami, H., & Luo, M. (2007). Detection of near-atmospheric concentrations of CO₂ by an olfactory subsystem in the mouse. *Science*, 317(5840), 953–957. <https://doi.org/10.1126/science.1144233>
- Hussain, N., Andrabi, S. M. H., & Mehmood, M. U. (2019). Effect of EDTA as Chelating Agent in Extender on the Post Thaw Quality of Buffalo Bull Spermatozoa. *Cryo Letters*, 40(3), 159–163.
- Itach, S. B.-S., Finklestein, M., Etkovitz, N., & Breitbart, H. (2012). Hyper-activated motility in sperm capacitation is mediated by phospholipase D-dependent actin polymerization. *Developmental Biology*, 362(2), 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.12.002>
- Kaneko, T., & Nakagata, N. (2006). Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. *Cryobiology*, 53(2), 279–282. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2006.06.004>
- Keshtgar, S., Iravanpour, F., Gharesi-Fard, B., & Kazerooni, M. (2016). Combined effect of trolox and EDTA on frozen-thawed sperm quality. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 41(3), 230–237.
- Keverne, E. B. (2002). Pheromones, vomeronasal function, and gender-specific behavior. In *Cell* (Vol. 108, Issue 6, pp. 735–738). Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00687-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00687-6)
- Kugler, W., Grunenfelder, H. P., & Broxham, E. (2008). Donkey Breeds in Europe: Inventory, Description, Need for Action, Conservation. In ... *and Seeds in Europe*.
- Kumeta, Y., Maruyama, T., Asama, H., Yamamoto, Y., Hakamatsuka, T., & Goda, Y. (2014). Species identification of *Asini Corii Collas* (donkey glue) by PCR amplification of cytochrome b gene. *Journal of Natural Medicines*, 68(1), 181–185. <https://doi.org/10.1007/s11418-013-0790-z>
- Leclerc, P., Sirard, M. A., Chafouleas, J. G., & Lambert, R. D. (1992). Decrease in calmodulin concentrations during heparin-induced capacitation in bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 94(1), 23–32. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0940023>
- Li, N., Yu, J., Yang, F., Shao, Y., Wu, S., Liu, B., Li, M., Wang, T., Li, J., & Zeng, S. (2021). L-Proline: An Effective Agent for Frozen and Post-thawed Donkey Semen

- Storage. *Journal of Equine Veterinary Science*, 101, 103393.
<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103393>
- López, L. F. M. (2018). *El puente de Occidente y la integración de Antioquia*. Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.
- Mackenna, A. (1995). Contribution of the male factor to unexplained infertility: a review. *International Journal of Andrology*, 18 Suppl 1, 58–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1995.tb00640.x>
- Marshall, F. (2007). African pastoral perspectives on domestication of the donkey. In *In Rethinking agriculture: archaeological and ethnoarchaeological perspectives* (eds T. P. Denham, J. Iriarte & L. Vrydaghs) (Walnut Cre, pp. 371–407).
- Martínez-León, E., Osycka-Salut, C., Signorelli, J., Pozo, P., Pérez, B., Kong, M., Morales, P., Pérez-Martínez, S., & Díaz, E. S. (2015). Fibronectin stimulates human sperm capacitation through the cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Human Reproduction*, 30(9), 2138–2151. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev154>
- Massip, A. (2001). Cryopreservation of embryos of farm animals. In *Reproduction in Domestic Animals* (Vol. 36, Issue 2, pp. 49–55). John Wiley & Sons, Ltd.
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2001.00248.x>
- Mazur, P., Leibo, S. P., & Chu, E. H. Y. (1972). A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Experimental Cell Research*, 71(2), 345–355. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90303-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90303-5)
- McDonnell, S. (2003). A Practical Field Guide to Horse Behavior: The Equid Ethogram. *Journal of Equine Veterinary Science*, 23(1), A1. [https://doi.org/10.1016/s0737-0806\(03\)70087-2](https://doi.org/10.1016/s0737-0806(03)70087-2)
- McLean, A. K., Navas González, F. J., & Canisso, I. F. (2019). Donkey and Mule Behavior. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 35(3), 575–588.
<https://doi.org/10.1016/j.cveq.2019.08.010>
- Medeiros, A. S. L., Gomes, G. M., Carmo, M. T., Papa, F. O., & Alvarenga, M. A. (2002). Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*, 58(2–4), 273–276. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00898-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00898-1)
- Mendoza, C., Carreras, A., Moos, J., & Tesarik, J. (1992). Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *Journal of Reproduction and Fertility*, 95(3), 755–763. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0950755>
- Mercati, F., Domingo, P., Pasquariello, R., Dall'Aglio, C., Di Michele, A., Forti, K., Cocci, P., Boiti, C., Gil, L., Zerani, M., & Maranesi, M. (2020). Effect of chelating and antioxidant agents on morphology and DNA methylation in freeze-drying rabbit

- (*Oryctolagus cuniculus*) spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(1), 29–37. <https://doi.org/10.1111/rda.13577>
- Mesa, A. M., Sc, M., R, G. H., & Sc, M. (2012). *Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos Effect of cholesterol and dimethyl-formamide on post-thawing parameters in Colombian creole stallion sperm*. 17(1), 2908–2915.
- Meskini, N., Némoz, G., Okyayuz-Baklouti, I., Lagarde, M., & Prigent, A. F. (1994). Phosphodiesterase inhibitory profile of some related xanthine derivatives pharmacologically active on the peripheral microcirculation. *Biochemical Pharmacology*, 47(5), 781–788. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)90477-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)90477-4)
- Miragaya, M. H., Chaves, M. G., & Agüero, A. (2006). Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Ruminant Research*, 61(2–3), 299–310. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2005.07.017>
- Miragaya, M. H., Neild, D. M., & Alonso, A. E. (2018). A Review of Reproductive Biology and Biotechnologies in Donkeys. *Journal of Equine Veterinary Science*, 65, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.12.005>
- Miró, J., Taberner, E., Rivera, M., Peña, A., Medrano, A., Rigau, T., & Peñalba, A. (2009). Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. *Theriogenology*, 72(8), 1017–1022. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.012>
- Mirshokraei, P., Hassanpour, H., Mehdizadeh, A., & Akhavan Taheri, M. (2011). Pentoxifylline induces capacitation and acrosome reaction and improves quality of motility in canine ejaculated spermatozoa. *Research in Veterinary Science*, 91(2), 281–284. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2011.01.002>
- Molina, L. C. P., Luque, G. M., Balestrini, P. A., Marín-Briggiler, C. I., Romarowski, A., & Buffone, M. G. (2018). Molecular basis of human sperm capacitation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(July), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00072>
- Montoya, J. D., Rojano, B. A., & Betancur, G. R. (2017). Efecto de la suplementación del diluyente sobre la calidad del semen de asno a la descongelación. *Archivos de Zootecnia*.
- Nannou, T. K., Jouhara, H., Trembley, J., & Herrmann, J. (2016). Cryopreservation: Methods, equipment and critical concerns. *Refrigeration Science and Technology*, 22-25-June, 247–258. <https://doi.org/10.18462/IIR.ICCRT.2016.0020>

- Nassar, A., Mahony, M., Blackmore, P., Morshedi, M., Ozgur, K., & Oehninger, S. (1998). Increase of intracellular calcium is not a cause of pentoxifylline- induced hyperactivated motility or acrosome reaction in human sperm. *Fertility and Sterility*, 69(4), 748–754. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00013-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00013-2)
- Naz, R. K., & Rajesh, P. B. (2004). Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-75>
- Negri, P., Grechi, E., Tomasi, A., Fabbri, E., & Capuzzo, A. (1996). Effectiveness of pentoxifylline in semen preparation for intrauterine insemination. *Human Reproduction*, 11(6), 1236–1239. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019363>
- Nguyen, V. K., Somfai, T., Salamone, D., Thu Huong, V. T., Le Thi Nguyen, H., Huu, Q. X., Hoang, A. T., Phan, H. T., Thi Pham, Y. K., & Pham, L. D. (2021). Optimization of donor cell cycle synchrony, maturation media and embryo culture system for somatic cell nuclear transfer in the critically endangered Vietnamese Ĩ pig. *Theriogenology*, 166, 21–28. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2021.02.008>
- Nouri, H., Towhidi, A., Zhandi, M., & Sadeghi, R. (2013). The Effects of Centrifuged Egg Yolk Used with INRA Plus Soybean Lecithin Extender on Semen Quality to Freeze Miniature Caspian Horse Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(12), 1050–1053. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.03.184>
- O’Connell, M., McClure, N., & Lewis, S. E. M. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, 17(3), 704–709. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.3.704>
- Okazaki, T., Yoshida, S., Teshima, H., & Shimada, M. (2011). The addition of calcium ion chelator, EGTA to thawing solution improves fertilizing ability in frozen-thawed boar sperm. *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho*, 82(3), 412–419. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2010.00856.x>
- Oliveira, J. V. de, Oliveira, P. V. de L. F., Melo e Oña, C. M., Guasti, P. N., Monteiro, G. A., Sancler da Silva, Y. F. R., Papa, P. de M., Alvarenga, M. A., Dell’Aqua Junior, J. A., & Papa, F. O. (2016). Strategies to improve the fertility of fresh and frozen donkey semen. *Theriogenology*, 85(7), 1267–1273. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.010>
- Orrego, M. T., Melian, S. I., Montenegro, J., Cimato, A. N., Cisale, H., & Piehl, L. L. (2019). Boar sperm protein tyrosine phosphorylation in the presence of egg yolk soluble and low density lipoprotein fractions during cooling. *Theriogenology*, 123, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.09.031>
- Ortgies, F., Klewitz, J., Görgens, A., Martinsson, G., & Sieme, H. (2012). Effect of procaine, pentoxifylline and trolox on capacitation and hyperactivation of stallion

- spermatozoa. *Andrologia*, 44(SUPPL.1), 130–138. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01150.x>
- Osycka-Salut, C. E., Castellano, L., Fornes, D., Beltrame, J. S., Alonso, C. A. I., Jawerbaum, A., Franchi, A., Díaz, E. S., & Perez Martinez, S. (2017). Fibronectin From Oviductal Cells Fluctuates During the Estrous Cycle and Contributes to Sperm–Oviduct Interaction in Cattle. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(11), 4095–4108. <https://doi.org/10.1002/jcb.26067>
- Osycka-Salut, C. E., Martínez-León, E., Gervasi, M. G., Castellano, L., Davio, C., Chiarante, N., Franchi, A. M., Ribeiro, M. L., Díaz, E. S., & Perez-Martinez, S. (2020). Fibronectin induces capacitation-associated events through the endocannabinoid system in bull sperm. *Theriogenology*, 153, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.031>
- Panzani, D., Rota, A., Tesi, M., Fanelli, D., & Camillo, F. (2018). Update on Donkey Embryo Transfer and Cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 65, 50–54. <https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2017.11.012>
- Patrat, C., Serres, C., & Jouannet, P. (2000). The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of the Cell*, 92(3–4), 255–266. [https://doi.org/10.1016/s0248-4900\(00\)01072-8](https://doi.org/10.1016/s0248-4900(00)01072-8)
- Peña-Alfaro, C. E., Barros, L. O., Carneiro, G. F., Gastal, M. O., & Gastal, E. L. (2014). Embryo transfer in Pega donkeys (*Equus asinus*) in Brazil. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(1), 185. <https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2013.10.135>
- Perez-Osorio, J., Mello, F. G., Juliani, G., Lagares, M., Lago, L., & Henry, M. (2008). Effect on post-thaw viability of equine sperm using stepwise addition of dimethyl formamide and varying cooling and freezing procedures. *Animal Reproduction*, 5(3–4), 103–109.
- Pizarro, E., Restrepo, G., Echeverry, J., & Rojano, B. (2013). Effect of seminal plasma on the redox state of cryopreserved stallion semen. *Revista MVZ Córdoba*, 18, 3672–3680.
- Quaresma, M., Martins, A. M. F., Rodrigues, J. B., Colaço, J., & Payan-Carreira, R. (2014). Pedigree and herd characterization of a donkey breed vulnerable to extinction. *Animal*, 8(3), 354–359. <https://doi.org/10.1017/S1751731113002218>
- Rathi, R., Colenbrander, B., Bevers, M. M., & Gadella, B. M. (2001). Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 65(2), 462–470. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.2.462>

- Restrepo, G., Cantero Naclares, J. M., & Montoya Paez, J. D. (2016). Efecto De La Centrifugación Sobre La Integridad Y La Funcionalidad De Espermatozoides Equinos. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(1), 119. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(14\)119-125](https://doi.org/10.18684/bsaa(14)119-125)
- Restrepo, G., Pérez, Daniel., Acosta, Mariano., Camacho, C., & Pérez, J. (2017). Freezing of Equine Semen Under Two Schemes of Addition of Dimethylformamide. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 28(4), 918–927. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13884>
- Restrepo, G., Zapata Acosta, K., & Rojano, B. (2015). Evaluación de la capacidad antioxidante total del plasma seminal equino. *Zootecnia Tropical*, 33(1), 79–87.
- Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M. I., & Ferreira De Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(1), 31–38. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100005>
- Rodriguez, P. C., Satorre, M. M., & Beconi, M. T. (2012). Effect of two intracellular calcium modulators on sperm motility and heparin-induced capacitation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 131(3–4), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.03.015>
- Rodríguez-Villamil, P., Mentz, D., Ongaratto, F. L., Aguiar, L. H., Rodrigues, J. L., Bertolini, M., & Moura, A. A. (2020). Assessment of binder of sperm protein 1 (BSP1) and heparin effects on *in vitro* capacitation and fertilization of bovine ejaculated and epididymal sperm. *Zygote*, 28(6), 489–494. <https://doi.org/10.1017/S0967199420000374>
- Rossel, S., Marshall, F., Peters, J., Pilgram, T., Adams, M. D., & O'Connor, D. (2008). Domestication of the donkey: Timing, processes, and indicators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), 3715–3720. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709692105>
- Rota, A., Sabatini, C., Przybył, A., Ciaramelli, A., Panzani, D., & Camillo, F. (2019). Post-thaw Addition of Caffeine and/or Pentoxifylline Affect Differently Motility of Horse and Donkey-Cryopreserved Spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 75, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.01.003>
- Sabatini, C., Mari, G., Mislei, B., Love, C. C., Panzani, D., Camillo, F., & Rota, A. (2014). Effect of Post-Thaw Addition of Seminal Plasma on Motility, Viability and Chromatin Integrity of Cryopreserved Donkey Jack (*Equus asinus*) Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(6), 989–994. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/rda.12419>

- Sati, L., Cayli, S., Delpiano, E., Sakkas, D., & Huszar, G. (2014). The pattern of tyrosine phosphorylation in human sperm in response to binding to zona pellucida or hyaluronic acid. *Reproductive Sciences*, 21(5), 573–581. <https://doi.org/10.1177/1933719113504467>
- Shahsavari, M. H., Moghaddam, G., Kia, H. D., & Rodrigues, A. P. R. (2019). Effects of new synthetic cryoprotectant agents on histological characteristics of various classes of vitrified bovine pre-antral follicles. *Veterinary Research Forum*, 10(1), 9–16. <https://doi.org/10.30466/vrf.2019.34306>
- Shen, L., Chen, H., Zhu, Q., Wang, Y., Wang, S., Qian, J., Wang, Y., & Qu, H. (2016). Identification of bioactive ingredients with immuno-enhancement and anti-oxidative effects from Fufang-Ejiao-Syrup by LC-MSn combined with bioassays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 117, 363–371. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.09.024>
- Sinha, B., Semmler, J., Eisenhut, T., Eigler, A., & Endres, S. (1995). Enhanced tumor necrosis factor suppression and cyclic adenosine monophosphate accumulation by combination of phosphodiesterase inhibitors and prostanoids. *European Journal of Immunology*, 25(1), 147–153. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/eji.1830250125](https://doi.org/10.1002/eji.1830250125)
- Sjunnesson, Y. (2020). In vitro fertilisation in domestic mammals—a brief overview. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 125(2), 68–76. <https://doi.org/10.1080/03009734.2019.1697911>
- Slanina, T., Miškeje, M., Tirpák, F., Błaszczuk, M., Formicki, G., & Massányi, P. (2018). Caffeine strongly improves motility parameters of Turkey spermatozoa with no effect on cell viability. *Acta Veterinaria Hungarica*, 66(1), 137–150. <https://doi.org/10.1556/004.2018.013>
- Smits, K., Hoogewijs, M., Woelders, H., Daels, P., & Van Soom, A. (2012). Breeding or assisted reproduction? Relevance of the horse model applied to the conservation of endangered equids. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(SUPPL.4), 239–248. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02082.x>
- Soni, Y., Talluri, T. R., Kumar, A., Ravi, S. K., Mehta, J. S., & Tripathi, B. N. (2019). Effects of different concentration and combinations of cryoprotectants on sperm quality, functional integrity in three Indian horse breeds. *Cryobiology*, 86(August 2018), 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.12.005>
- Stanic, P., Sonicki, Z., & Suchanek, E. (2002). Effect of pentoxifylline on motility and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 25(3), 186–190. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.2002.00348.x>

- Stephens, T. D., Brooks, R. M., Carrington, J. L., Cheng, L., Carrington, A. C., Porr, C. A., & Splan, R. K. (2013). Effects of pentoxifylline, caffeine, and taurine on post-thaw motility and longevity of equine frozen semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(8), 615–621. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.10.004>
- Strohmeier, N., Bharadwaj, M., Costell, M., Fässler, R., & Müller, D. J. (2017). Fibronectin-bound $\alpha 5 \beta 1$ integrins sense load and signal to reinforce adhesion in less than a second. *Nature Materials*, 16(12), 1262–1270. <https://doi.org/10.1038/nmat5023>
- Talukdar, D., Ahmed, K., Deori, S., & Das, G. C. (2015). Heparin-induced in vitro capacitation changes of swamp buffalo spermatozoa. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 39(5), 629–633. <https://doi.org/10.3906/vet-1501-16>
- Tash, J. S., & Means, A. R. (1982). Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium. *Biology of Reproduction*, 26(4), 745–763. <https://doi.org/10.1095/biolreprod26.4.745>
- The Donkey Sanctuary. (2017). *Bajo la Piel: El comercio emergente de las pieles de burro y sus consecuencias para el bienestar y la subsistencia de estos animales*.
- Thomas, A. D., Meyers, S. A., & Ball, B. A. (2006). Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*, 65(8), 1531–1550. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.022>
- Turley, E. A., Noble, P. W., & Bourguignon, L. Y. W. (2002). Signaling properties of hyaluronan receptors. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 277, Issue 7, pp. 4589–4592). <https://doi.org/10.1074/jbc.R100038200>
- Úsuga, A., Rojano, B. A., & Restrepo, G. (2018). Efecto de los componentes del plasma seminal en la calidad del semen equino. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 13, 281.
- Varela, E., Rojas, M., & Restrepo, G. (2020). Membrane stability and mitochondrial activity of bovine sperm frozen with low-density lipoproteins and trehalose. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 55(2), 146–153. <https://doi.org/10.1111/rda.13599>
- Verma, A. S., Agrahari, S., Rastogi, S., & Singh, A. (2011). Biotechnology in the realm of history. In *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* (Vol. 3, Issue 3, pp. 321–323). Wolters Kluwer -- Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.84430>
- Vidament, M., Vincent, P., Martin, F. X., 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. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.03.016>

- Visconti, P. E. (2009). Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 106, Issue 3, pp. 667–668). National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811895106>
- Warren, L. K. (2009). Feeding the Stallion. *Agri-Facts, January*, 1–4.
- White, I. G. (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction, Fertility, and Development*, 5(6), 639–658. <https://doi.org/10.1071/rd9930639>
- Yilmaz, O., Boztepe, S., & Ertugrul, M. (2012). Domesticated Donkeys – Part II: Types and Breeds. *Canadian Journal of Animal Science*, 2012(April).
- Yovich, J. L. (1993). Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction. *Human Reproduction*, 8(11), 1786–1791. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137935>
- Zamzami, N., Susin, S. A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gómez-Monterrey, I., Castedo, M., & Kroemer, G. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 183(4), 1533–1544. <https://doi.org/10.1084/jem.183.4.1533>
- Zhao, Q., Tao, C., Pan, J., Wei, Q., Zhu, Z., Wang, L., Liu, M., Huang, J., Yu, F., Chen, X., Zhang, L., & Li, J. (2021). Equine chorionic gonadotropin pretreatment 15 days before fixed-time artificial insemination improves the reproductive performance of replacement gilts. *Animal*, 15(12), 100406. <https://doi.org/10.1016/J.ANIMAL.2021.100406>
- Zheng, C., Jian-tao, Z., Hai-feng, L., & Hong-bin, W. (2016). Laparoscopic Embryo Transfer in Pigs: Knowledge for Surgical Procedures. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, 23(2), 52–58. [https://doi.org/10.1016/S1006-8104\(16\)30047-2](https://doi.org/10.1016/S1006-8104(16)30047-2)