

UNIVERSIDAD DE LA SALLE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS



DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LA CÉLULA ESPERMÁTICA DE ASNOS  
(EQUUS ASINUS) CRIOLLOS COLOMBIANOS UTILIZANDO MEDIO DILUYENTE  
INRA 82 MODIFICADO CON DIMETILFORMAMIDA Y GLICEROL PARA LA  
CRIOPRESERVACIÓN

Trabajo de Grado

DERIAN CALVACHE BENAVIDES

Trabajo de grado como requisito para optar el título de:

Magister en Ciencias Veterinaria

Bogotá, Colombia

2015

UNIVERSIDAD DE LA SALLE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS



DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LA CÉLULA ESPERMÁTICA DE ASNOS  
(EQUUS ASINUS) CRIOLLOS COLOMBIANOS UTILIZANDO MEDIO DILUYENTE  
INRA 82 MODIFICADO CON DIMETILFORMAMIDA Y GLICEROL PARA LA  
CRIOPRESERVACIÓN

Trabajo de Grado

DERIAN CALVACHE BENAVIDES

76111202

Director

JAIR PÉREZ OSÓRIO M.V. Z, M.Sc., Ph.D.

Codirector

LILIANA CHACÓN JARAMILLO M.V, M.Sc., Ph.D.

Bogotá, Colombia

2015

APROBACIÓN

DIRECTOR (A)

---

Jair Pérez Osorio

CODIRECTOR (A)

---

Liliana Chacón Jaramillo

JURADO

---

Piedad Cristina Rivas

JURADO

---

Cesar Augusto Díaz

JURADO

---

Geovanny Mendoza

## DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD DE LA SALLE

|   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| Rector  | Hno. Carlos Gabriel Gómez Restrepo  |
| Vicerrector Académico                           | Hno. Carlos Enrique Carvajal Costa  |
| Vicerrector De Investigación<br>Y Transferencia | Dr. Luis Fernando Ramírez Hernández |
| Vicerrector De Promoción Y<br>Desarrollo Humano | Hno. Frank Leonardo Ramos Baquero   |
| Vicerrector Administrativo                      | Dr. Eduardo Ángel Reyes             |
| Decano Facultad de Ciencias<br>Agropecuarias    | Dra. Claudia Aixa Mutis Borrero     |
| Secretario Académico                            | Dr. Alejandro Tobón González        |
| Director De Posgrados                           | Dr. Ernesto Andrés Dalmau Barros    |

## COMPROMISO

Los trabajos de grado no contienen ideas que sean contrarias a la doctrina católica en asuntos de dogma y moral.

Ni la Universidad, ni el director, ni el jurado calificador son responsables de las ideas expuestas por el graduando.

## AGRADECIMIENTOS

Al creador de todo, por darme la vida y el tiempo para hacer lo que más amo la Medicina Veterinaria.

Al Doctor Jair Pérez Osorio por permitirme trabajar en el tema de investigación, su disponibilidad, por haberme sabido orientar desde el comienzo y haber depositado en mí su confianza.

A la Doctora Liliana Chacón reciba mi agradecimiento perenne a su sensibilidad y humanismo, por su empeño al seguimiento del proyecto que me ha llevado a cristalizar mis propósitos profesionales.

A la universidad de la Salle por darme la oportunidad de engrandecer mis conocimientos y prestarme sus laboratorios para el procesamiento de las muestras

A todos los docentes que contribuyeron a mi formación académica durante estos cortos dos años y me enseñaron el camino de la investigación y que un Médico Veterinario no debe estancar sus conocimientos sino por el contrario día a día engrandecerlos.

Al señor zootecnista Javier Carrillo Ortigón, propietario del criadero asnal Las Islas ubicado en el municipio de Chiquinquirá (Boyacá) quien muy amablemente me prestó los sementales asnales para tomar las muestras sin los cuales no hubiese sido posible este proyecto.

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del diluyente INRA 82 modificado con el crioprotector glicerol (GLY) y el INRA 82 modificado con dimetilformamida (DMF) en la viabilidad de las células espermáticas de asnos criollos colombianos posdescongelación. Se recolectó el eyaculado de cinco asnos criollos colombianos, el semen sin gel se diluyó 1:1 con el diluyente INRA 82 modificado, se centrifugó a 3500 rpm. Eliminado el plasma seminal, el semen se resuspendió con el diluyente de congelación correspondiente (5% de glicerol y 5% de dimetilformamida) y se empacó en pajillas de 0,5 ml en una concentración de 150 millones de espermatozoides/ml. Las pajillas se enfriaron durante 145 minutos a cinco grados centígrados, luego se expusieron a vapores de nitrógeno líquido por un periodo 15 minutos y se sumergieron en el nitrógeno líquido. La descongelación de las pajillas se realizó a 37 grados centígrados durante 30 segundos. Las características del semen en fresco se evaluaron mediante microscopia óptica y posdescongelación mediante el sistema CASA. Los valores del semen en fresco en promedio fueron; volumen del eyaculado  $60 \pm 6,3$ , motilidad total  $71 \pm 9,6$ , motilidad progresiva  $66 \pm 9,6$  vigor  $3,0 \pm 0,0$  en la primera dilución los valores fueron los siguientes; con. INRA 82 modificado con glicerol la motilidad total  $71 \pm 13,0$  motilidad progresiva  $67 \pm 7,0$  y el vigor  $3,0 \pm 0,0$  con INRA 82 modificado con dimetilformamida la motilidad total  $70 \pm 6,0$ , motilidad progresiva  $66 \pm 8,0$ , vigor  $3,0 \pm 0,0$ . En la evaluación posdescongelación no se observaron diferencias estadísticas significativas ( $P > 0,05$ ) en la motilidad total (42,6 vs 47,4), motilidad progresiva (18,8 vs 17,0), viabilidad

(51,8 vs 48,1) respectivamente entre glicerol y dimetilformamida cuando se utiliza el medio INRA como diluyente. Los resultados obtenidos indican que el diluyente INRA82 modificado y los crioprotectores dimetilformamida y glicerol se pueden utilizar en la criopreservación de semen de asnos criollos colombianos.

Palabras claves: Criopreservación, diluyente, motilidad total, motilidad progresiva, vigor, asnos criollos.



## ABSTRACT

The aim objective of this study was to study the effect of INRA 82 diluent modified with glycerol cryoprotectant and dimethylformamide in the viability of sperm cells post-thaw Colombian donkeys. Ejaculate from five Colombian donkeys was collected. The sperm was diluted without gel 1:1 with diluent modified INRA 82, it was centrifuged at 3500 rpm, the seminal plasma was removed and the remaining seed was resuspended in freezing diluent (glycerol and dimethylformamide), it was packed in 0,5 ml straws in a proportion of 150 millions of sperm per milliliter of dilutor, it was cooled during 145 minutes to five centigrade degrees, then they were exposed to vapors of liquid nitrogen for 15 minutes, then they were immersed in the nitrogen liquid. The straws were performed at 37 centigrade degrees during 30 seconds. Semen characteristics in fresh were evaluated by light microscopy and post-thaw by CASA system. Values about fresh semen were: ejaculate volume  $60 \pm 6,3$ ,  $71 \pm 9,6$  total motility, progressive motility  $67 \pm 7,0$  force  $3 \pm 0,0$ , glycerol modified INRA 82 Total motility  $71 \pm 13$ ,  $67 \pm 7,0$  progressive motility and with dimethylformamide modified INRA 82 Total motility  $70 \pm 6$ ,  $66 \pm 8,0$  progressive motility, vigor  $3,0 \pm 0,0$ . Post-thaw the evaluation showed no statistically significant differences ( $P > 0,05$ ) in total motility (42,6 vs 47,4), progressive motility (18,8 vs 17,0), viability (51,8 vs 48,1) respectively between glycerol and dimethylformamide when using the INRA medium as diluent. The results indicate that the diluent INRA82 modified and dimethylformamide and glycerol cryoprotectants can be used in the cryopreservation of semen Colombian donkeys.

Key words: diluent, total motility, progressive motility, vigor.

## TABLA DE CONTENIDO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN   | 1  |
| 1.1 Objetivos   | 3  |
| 1.2 Hipótesis general del proyecto                      | 3  |
| 2. MARCO TEÓRICO  | 4  |
| 2.1 Evaluación del semen                                | 5  |
| 2.1.1 Volumen seminal                                   | 5  |
| 2.1.2 Motilidad espermática                             | 6  |
| 2.1.3 Concentración espermática                         | 6  |
| 2.1.4 Morfología espermática                            | 7  |
| 2.1.5 Prueba hipoosmótica                               | 9  |
| 2.1.6 Prueba de termoresistencia                        | 9  |
| 2.1.7 Evaluación de la integridad del ADN               | 9  |
| 2.2 Manejo del semen e inseminación artificial en asnos | 10 |
| 2.3 Criopreservación de semen de asnos                  | 14 |
| 3. METODOLOGÍA  | 17 |
| 3.1 Localización  | 17 |
| 3.2 Población y muestra                                 | 17 |
| 3.3 Métodos y procedimiento                             | 17 |
| 3.3.1 Colecta de semen                                  | 19 |
| 3.3.2 Dilución y centrifugación                         | 19 |
| 3.3.3 Dilución de congelamiento y envasado              | 19 |
| 3.3.4 Enfriamiento                                      | 19 |

|   |    |
|---|----|
| 3.3.5 La descongelación                         | 19 |
| 3.3.6 La evaluación del semen posdescongelación | 20 |
| 3.4 Diseño estadístico                          | 21 |
| 4. RESULTADOS                                   | 23 |
| 5. DISCUSIÓN                                    | 35 |
| 6. CONCLUSIONES                                 | 40 |
| 7. LISTA DE REFERENCIAS                         | 42 |

## LISTA DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Componentes del medio diluyente INRA 82.  | 11 |
| Tabla 2. Composición del medio diluyente INRA 82 modificado  | 18 |
| Tabla 3. Características de cinco eyaculados de asnos criollos colombianos   | 23 |
| Tabla 4. Parámetros seminales después de la adición de INRA 82 modificado y de los crioprotectores dimetilformamida y glicerol | 24 |
| Tabla 5. Características seminales posdescongelación de cinco asnos criollos   | 26 |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Efecto de cada proceso de criopreservación sobre la motilidad de la célula espermática de asnos criollos Colombianos 25
- Figura 2. Efecto del crioprotector sobre la motilidad total y motilidad progresiva espermática 27
- Figura 3. Efecto del crioprotector sobre los tipos de trayectoria espermática posdescongelación 28
- Figura 4. Evaluación de viabilidad, coloración realizada con eosina-nigrosina 29
- Figura 5. Porcentaje de espermatozoides íntegros posdescongelación. Resultado de la prueba hipoosmótico 30
- Figura 6. Motilidad total (%) de semen congelado-descongelado con INRA 82 modificado con glicerol y dimetilformamida, en diferentes tiempos de la prueba de termoresistencia. 31

Figura 7. Motilidad progresiva (%) de semen congelado-descongelado con INRA 82 modificado con glicerol y dimetilformamida, en diferentes tiempos de la prueba de termoresistencia 31

Figura 8. Vigor de semen congelado-descongelado con INRA 82 modificado con glicerol y dimetilformamida, en diferentes tiempos de la prueba de termoresistencia 32

Figura 9. Proporción (%) de células normales por tratamiento (tinción verde de malaquita). 33

Figura 10A. Coloración por naranja de acridina 33

Figura 10B. Porcentaje de espermatozoides intactos y lesados con la prueba de fluorescencia (NA) de semen descongelado 34

## LISTA DE SIGLAS

Sigla

|      |                         |
|------|-------------------------|
| DA   | Dimetilacetamida        |
| DMF  | Dimetilformamida        |
| DMSO | Dimetil sulfóxido       |
| °C   | Grados centígrados      |
| GLY  | Glicerol                |
| IA   | Inseminación artificial |
| MB   | Medio base              |
| µl   | microlitros             |
| mL   | mililitros              |
| mM   | miliosmoles             |
| PSH  | Plasma seminal homólogo |

## 1. INTRODUCCIÓN

La conservación de los recursos genéticos animales se puede realizar *in situ* manteniéndolos en su hábitad, *ex situ* conservándolos y estudiándolos en un lugar adaptado para ellos. También es posible extraer material genético de estos animales y mantenerlos en bancos de germoplasma mediante la criopreservación (Taberner, 2010).

El semen criopreservado ofrece beneficios adicionales como son: permitir la participación de los sementales en eventos y no tener que estar disponibles para la recolección, programar envíos más fácil y con suficiente antelación, almacenar en el criadero hasta el momento óptimo en que la yegua esté para la inseminación, en situaciones de enfermedad, lesión o muerte de un equino, permite optimizar el eyaculado, maximizar las dosis de semen, resultando en un promedio de 10 a 12 dosis por eyaculado, como desventajas: no todos los reproductores tienen semen congelable, la proporción de preñeces con semen congelado son inferiores a la inseminación con semen fresco o refrigerado, el semen congelado-descongelado tiene vida más corta (Loomis, 2011).

El proceso de criopreservación induce estrés térmico en las células germinal que produce cambios físicos y bioquímicos (Loomis y Graham, 2008). Estos cambios alteran composición y organización de la bicapa lipídica. Cuando la temperatura disminuye, el movimiento lateral de los fosfolípidos se torna más



restringido, exhibiendo una transición de fase fluida a gel. Las alteraciones fisicoquímicas de la membranas espermáticas, causadas por el enfriamiento, inducen disminución de la fluidez y aumento de la permeabilidad de la membrana, los cuales generan daños irreversibles en el acrosoma, liberación de enzimas y fosfolípidos, reducción de la actividad metabólica y el consumo del ATP del espermatozoide (Canisso, 2008). Además, los crioprotectores afectan las células cuando se agrega o se quitan e inducen cambios de volumen en las células que pueden dañarlas (Loomis y Graham, 2008).

El crecimiento de la industria equina en el país y el auge que tienen los asnales, de marcan una oportunidad de comercialización de semen criopreservado, desafortunadamente son muy pocos los estudios realizados en la criopreservación de semen asnal a nivel mundial y en Colombia no se tiene registro del manejo óptimo de los animales. De manera que es necesario, describir y caracterizar los parámetros espermáticos en el semen fresco y determinar la eficiencia posdescongelación de diluyentes y crioprotectores para la criopreservación del material espermático de los asnos criollos colombianos.

## 1.1 Objetivos

### Objetivo general

Determinar la eficiencia posdescongelación del diluyente INRA 82 modificado adicionado con los crioprotectores glicerol o con dimetilformamida en las características seminales de asnos criollos colombianos.

### Objetivos específicos

Describir los parámetros espermáticos en el semen fresco de asnos criollos colombianos ubicados en zona de trópico alto, Municipio de Chiquinquirá Departamento de Boyacá.

Identificar el efecto del INRA 82 modificado con glicerol y el INRA 82 modificado con dimetilformamida sobre parámetros de motilidad, integridad de membrana y sobrevivencia posdescongelación de semen de asno criollo colombiano.

## 1.2 Hipótesis general del proyecto

La adición de INRA 82 modificado dimetilformamida mantiene mejores parámetros espermáticos posdescongelación comparado con INRA 82 modificado glicerol en espermatozoides de asnos criollos colombianos.

## 2. MARCO TEÓRICO

Los asnos son de interés como machos reproductores debido a que se utilizan en la producción de ejemplares mulares. La monta de yeguas por asnales no es un hecho natural, sino algo artificial creado por el hombre que requiere una adaptación previa (Canisso *et al.*, 2008).

Según Henry *et al.*, (1998) sólo se consigue que los asnos monten yeguas después de un período de acondicionamiento, que se logra manteniendo los asnos destetados con potrancas evitando cualquier contacto con asnos antes de la edad adulta.

Los asnos pasan la mayor parte del tiempo, en una pequeña zona de descanso y ubicada dentro del territorio donde periódicamente producen vocalizaciones para mantener el grupo sexualmente activo cerca del área de descanso y despertar la actividad sexual de las hembras asnales (McDonnel, 1998).

Algunos asnos permiten a otros machos subordinados que se reproduzcan con algunas hembras asnales del territorio del macho dominante, después de que el macho dominante se ha apareado, el subordinado por lo general ayuda con el marcado y defensa territorial. Los límites territoriales parecen ser anunciados acústicamente y en algunos casos marcados con material fecal (McDonnel, 1998).

El comportamiento sexual del asno incluye la defensa del límite territorial, la exploración, orina las heces, cuidado del grupo sexualmente activo es decir hembras

en estro, muestra poca atención por montar hembras que no están en celo (Henry et al., 2008).

## 2.1 Evaluación de semen

Después de realizar la colecta del semen de asno con la vagina artificial, utilizando una yegua en estro o una hembra asnal como maniquí, se realiza la filtración y la evaluación inmediata del semen (Canisso, 2008).

La evaluación convencional con microscopio de luz es la más utilizada en la práctica reproductiva y es accesible a todos los veterinarios de campo y no requiere condiciones especiales para su realización. Otro aspecto favorable para utilizar la evaluación subjetiva fue la alta correlación entre el análisis objetivo y subjetivo (Canisso, 2008). Al menos 100 espermatozoides deben ser evaluados para evidenciar los defectos morfológicos.

2.1.1 Volumen seminal. Se mide volumen libre de gel, encontrando diferencias entre asnos jóvenes y adultos, en asnos de raza Pega el volumen seminal fue de 25.65 mililitros para los jóvenes frente a 62.84 mililitros para los adultos (Canisso, 2008).

Los parámetros seminales de los asnos según Boeta y Zarco (2000) que colectaron semen de un asno de raza Kentucky de 7 años de edad, en buen estado de salud con fertilidad probada, en promedio 70 ml. Cortés *et al.* (2008) en asnos Zamorano-Leonés encontraron un volumen de 67.6 ml. Miró *et al.* (2009) evaluaron las colectas de asnos de raza catalán y obtuvieron un volumen de 64.1 ml. Igualmente Gloria *et al.* (2011) trabajaron con asnos de raza Martina Franca entre los 5 y 6 años de edad y obtuvieron valores medios de 91.5 ml de volumen seminal sin filtrar.

2.1.2 Motilidad espermática. La valoración se puede realizar visualmente mediante microscopía óptica o usando un sistema de análisis computarizado (CASA) se basa en la captura sucesiva de imágenes a través de un microscopio de fase que son digitalizadas (Gama, 2009). La motilidad y vigor espermático y particularmente la motilidad progresiva, es un buen indicativo de viabilidad espermática en equinos. A pesar de no necesariamente ser un indicador de capacidad fecundante, la motilidad espermática, obligatoriamente debe estar presente para que los espermatozoides puedan fecundar (Canisso, 2008). Una evaluación de los parámetros de motilidad y vigor espermático se muestra con un método rápido, simple y de bajo costo en condiciones generales de poblaciones espermáticas presentes en el eyaculado. Sin embargo, es un análisis subjetivo y no necesariamente se constituye en un pronóstico seguro del potencial fecundante de un animal (Canisso, 2008).

Oliveira *et al.* (2006) en un estudio en asnos brasileiros encontraron 65.5 % de motilidad total y 39.8 % de motilidad progresiva en trece eyaculados que se tomaron de una población de 80 que hay en el Brasil. Flores *et al.* (2008) en siete asnos de la raza Catalán, de cuatro a ocho años de edad hallaron una motilidad total de 75.9 % y viabilidad de 85.1%. Cortés *et al.* (2008) en asnos Zamorano-Leonés la motilidad total reportada fue de 71.6 % y la motilidad progresiva de 60.6 %. Taberner *et al.* (2010) en asnos catalanes la motilidad total encontrada fue de 71.6 % y la motilidad progresiva de 31.3 %.

2.1.3 Concentración espermática. Evalúa el número total de espermatozoides de un eyaculado por consiguiente el número de dosis del eyaculado, existen varios métodos para determinar la concentración como la cámara de Neubauer, el

espectrofotómetro, citometría de flujo, colorimetría y programas informáticos (Taberner, 2010). La concentración espermática y número total de espermatozoides en un semental asnal de la raza Kentucky de 7 años de edad fue en promedio de 82 millones de espermatozoides/ml (Boeta y Zarco., 2000; Cortés *et al.*, 2008) encontraron en el asno Zamorano-Leonés una concentración de  $294.4 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Rota *et al.*, (2008) en un primer estudio con tres asnos de raza Amita obtuvieron  $195.9 \times 10^6$  espermatozoides/ml y un número total de espermatozoides de  $18.446 \times 10^6$  y, en un segundo, estudio con 5 asnos de la misma raza el número de espermatozoides por mililitro fue de  $133.9 \times 10^6$ . Las mediciones de la concentración espermática en ocho asnos sementales de la raza Ragusano fueron de 67 a  $200 \times 10^6$  espermatozoides/ml y el número total de espermatozoides en la eyaculación fue de 15 a  $41 \times 10^9$  espermatozoides (Quartuccio *et al.*, 2011). La concentración espermática en 6 reproductores de la raza Pega fue en promedio de  $25.6 \times 10^9$  (Canisso *et al.*, 2010). La concentración espermática fue mayor en animales más jóvenes y el número de espermatozoides totales presentes en el eyaculado fue mayor en el grupo de animales adultos estudio realizado en 6 asnos entre los 3.5 a 16 años de edad (Canisso, 2008).

2.1.4 Morfología espermática. Mediante la tinción vital de eosina-nigrosina y verde de malaquita se observan las anormalidades de los espermatozoides. La morfología espermática es uno de los criterios utilizados para evaluar el potencial reproductivo de un semental y se considera el número espermatozoides clasificados morfológicamente como normales (Pasch *et al.*, 2006; Taberner, 2010). Una serie de

defectos en los espermatozoides, se sospecha su transmisión genética en los equinos, estos incluyen:

- Defectos de la cabeza (piriformes, microcefalia, cabezas múltiples, cabeza cónica).
- Defectos del acrosoma (acrosoma nudoso, Vacúolas)
- Defectos de pieza intermedia (pieza intermedia reflejo, en espiral, defecto Dag, curva simple, enrollada con citoplasma retenido, aplasia, desarrollo anormal)
- Defectos de la cola (aplasia, hinchazón, gota citoplasmática, colas múltiples) (Brito, 2007).

Las anomalías en el espermatozoide se han clasificado sobre la base de su presunto origen. Los defectos que se producen durante la espermatogénesis, se consideran como primarios (testiculares) y los que se desarrollan con posterioridad a la espermiación se consideran como secundarios (fallas en el conducto seminífero y epidídimo). Los defectos primarios fueron originalmente causados por algún tipo de injuria al epitelio seminífero, pero se asume que son más perjudiciales los defectos secundarios para la fertilidad y en general el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales es similar a la motilidad progresiva (Chenoweth, 2005; Varner, 2008).

La correcta clasificación y cuantificación de los defectos en los espermatozoides provee de información valiosa sobre la fertilidad potencial de un semental y ayuda a formular un diagnóstico y pronóstico de los problemas reproductivos (Brito *et al.*, 2011).

2.1.5 Prueba hipoosmótico. Se evalúan motilidad y vigor comenzando de un tiempo cero a un periodo que varía de 1 a 240 minutos, (Eshleman y Pinto 2010). Se toma una pajilla descongelada, en un tubo se incuba en baño maria a 37° C y se evalúa la muestra a cada intervalos de tiempo en el microscopio con el objetivo 100x, se cuenta un total de 100 espermatozoides (Gama, 2009). La solución para la prueba hipoosmótica (HOS) se puede realizar con fructosa, sacarosa, lactosa y citrato de sodio con osmolaridad de 100, 50 o 25 miliosmoles (Neild et al., 1999), HOS positivo se interpreta como membrana plasmática intacta, los espermatozoides con membrana lesionada no presentan enrollamiento de la cola (Nie y Wenzol, 2001). La semipermeabilidad de la membrana celular intacta causa que los espermatozoides se hinchen en condiciones hipoosmóticas causando expansión en el volumen celular por entrada de agua (Caiza de la Cueva et al., 1997; Eshleman y Pinto., 2010; Pinto et al., 2008; Neild et al., 1999; Nie y Wenzol., 2001; Mesa, 2010).

2.1.6 Prueba termoresistencia. Se evalúa la motilidad y vigor comenzando del tiempo 0 cada 30 minutos hasta llegar a 90 o 240 minutos, el semen descongelado se pasa de la pajilla a un tubo de 1 mL y se incuban a 37°C, se retiran alicuotas de semen y se evalúan (Gama, 2009).

2.1.7 Evaluación de la integridad del ADN. Con el colorante naranja de acridina (NA) los espermatozoides de diferentes especies producen intensidades de fluorescencia de color rojo o verde. Se requiere la condensación de la cromatina para el paso del espermatozoide por el tracto reproductivo de la hembra y para la penetración del óvulo, el grado de condensación de la cromatina se puede evaluar



por el grado de separación del colorante naranja de acridina que se une al ADN, el colorante produce fluorescencia verde cuando se une a ácido nucleico de doble cadena y fluorescencia roja con ácido nucleico de cadena sencilla (Lewin et al., 1999). La tinción con NA es un método preciso para detectar cromatina anormal en los espermatozoides y de esta manera evaluar la fertilidad y habilidad de fertilización de un eyaculado (Katayose et al., 2003).

## 2.2 Manejo del semen e inseminación artificial en asnos.

El semen se maneja de forma natural, diluido, transportado refrigerado o congelado. Estos tratamientos permiten el transporte limitado de espermatozoides y el almacenamiento en un refrigerador o Equitainer®, siempre y cuando la temperatura se mantenga a 4°C en el Equitainer®, está diseñado de forma que asegura una caída gradual en la temperatura del semen, se mantiene el semen a esta temperatura durante un máximo de 24 a 48 horas. El almacenamiento prolongado solo se puede lograr con la criopreservación, (Morell y Wallgren, 2011).

Según Palma, (2008) los principales diluyentes con base leche son Kenney, E-Z Mixin, INRA 82 (Tabla 1), INRA 96, medio Tyrode, con base yema de huevo está el diluyente Dimitropoulos. La inseminación artificial depende de las cualidades o fertilidad del semen de los asnos. Se puede inseminar con semen fresco, refrigerado o congelado. La refrigeración del semen de asnos y la posterior inseminación artificial es un método alternativo para la reproducción de la especie aunque después de la eyaculación y durante toda la manipulación del semen la membrana plasmática del espermatozoide está expuesta a diversos factores

ambientales que pueden contribuir a la pérdida de la motilidad de capacidad fecundante (Taberner, 2010).

Tabla 1. Componentes del medio diluyente INRA 82 (Palma, 2008).

| <b>Componentes</b>          | <b>Cantidad</b> |
|-----------------------------|-----------------|
| Glucosa                     | 5.00 g          |
| Lactosa                     | 300.00 g        |
| Rafinosa                    | 300.00 g        |
| Citrato Trisódico Dihidrato | 60.00 g         |
| Citrato de Potasio          | 82.00 mg        |
| Hepes                       | 952.00 mg       |
| Penicilina                  | 10.00UI/ml      |
| Gentamicina                 | 10.00 µg/ ml    |
| Agua                        | 100.00 ml       |
| Leche Descremada UHT        | 100.00 ml       |

La criopreservación de semen de asnos tiene efectos marcados sobre los espermatozoides; varios de estos efectos pueden ser dañinos e incluso letales para las células, lo cual produce una subsecuente reducción en la fertilidad. Los efectos negativos de la congelación sobre los espermatozoides incluyen tantas alteraciones en la estructura como en la funcionalidad de las membranas, reducción en la movilidad progresiva, alteraciones morfológicas y generación de especies reactivas de oxígeno que producen daño en los fosfolípidos de membrana y en la cromatina.

La reducción en la fertilidad del semen congelado puede ser atribuida a alteraciones en la estructura y función de la membrana durante el enfriamiento, la congelación y la descongelación. Ensayos *in vitro* muestran que estas alteraciones en la membrana se ven reflejadas en la disminución de la movilidad, viabilidad e integridad de la membrana en los espermatozoides que han sido criopreservados, En este estado la membrana se vuelve más rígida y porosa, esto ocurre porque hay una reorganización de los lípidos y proteínas de membrana, induciendo disrupciones y haciéndola más susceptible a moléculas extracelulares y daños producidos por cristales de hielo intracelulares (Mesa, 2010; Morell y Wallgren, 2011).

Según Miller (2008) el semen congelado añade una nueva dimensión a la industria equina permitiendo la conservación a largo plazo y permite la distribución a todo el mundo, se maximiza la utilización de sementales y evita el transporte de yeguas a el lugar donde está el semental, el semen se puede seleccionar de un grupo más grande de sementales incluso ya muertos, el semen puede ser utilizado cuando los sementales están en competencia, enfermos o recuperándose de una lesión, puede ser almacenado hasta que la yegua entre en celo. Pero hay varias desventajas en el uso de semen congelado entre las que tenemos: El porcentaje de preñez de los sementales disminuye y es más costoso criopreservar el semen. Según Canisso (2008) las bajas tasas de preñez se deben a que solo cerca del 50% de las células sobreviven al congelamiento, por lo tanto la biotecnología del semen debe ser capaz de preservar algunos atributos esenciales para que los espermatozoides desempeñen correctamente sus funciones tales como:

- a) Retener la capacidad metabólica para producir la energía

- b) Presentar motilidad progresiva
- c) Retención de proteínas necesarias para sobrevivencia en el tracto reproductivo de la hembra
- d) Presencia y funcionalidad de enzimas acrosómicas esenciales para la penetración y paso de la estructura del ovocito
- e) Una apropiada distribución de lípidos y proteínas en la membrana plasmática para que posibilite la reacción acrosómica y la unión y fusión con el ovocito (Squires *et al.*, 1999 citado por Canisso *et al.*, 2008).

La membrana es uno de los principales sitios de la injuria durante el enfriamiento y la congelación. El daño causado por productos de la peroxidación lipídica, ocasiona que decrezca la integridad de la membrana. En la adición de lípidos, se presenta una alteración de la estructura de la membrana y la organización lateral. El congelamiento resulta en cambios en la membrana, temperatura dependiente y deshidratación inducida, lo cual resulta en la separación lateral de los componentes de la membrana e incremento de la permeabilidad para los solutos (Oldenhof *et al.*, 2010).

Cuando los espermatozoides son colectados y pasan a una temperatura de 5°C; ocurren daños irreversibles en la membrana espermática, algunos de estos cambios pueden aminorarse con la adición de colesterol, alterando los lípidos que la componen. (Spizziri *et al.*, 2010). La calidad espermática hace referencia a la membrana plasmática, y para una óptima interacción célula a célula (penetración espermática), requiere de una membrana intacta del espermatozoide, comúnmente usada para determinar la calidad del semen (Foster *et al.*, 2011).

La mayoría de las células requiere la presencia de un agente protector para sobrevivir al proceso de congelamiento; un agente que posea esa capacidad se denomina crioprotector. Los crioprotectores pueden ser adicionados al menos parcialmente para que protejan el espermatozoide durante el congelamiento y descongelamiento (Canisso, 2008).

### 2.3 Criopreservación de semen de asno.

Los medios más utilizados en asnos son diluyente Merck-yema, INRA 82 modificado, MP50 modificado, estos diluyentes presentan en su composición fosfolípidos derivados de leche o de yema de huevo (Gama, 2009).

Los reportes sobre criopreservación de semen de asno que fueron hechos por Trimeche *et al.* (1996) quienes congelaron semen de asnos Poitou, utilizando como diluyente INRA 82 y compararon los crioprotectores, glicerol al 4% y 80,160 o 240 mM de glutamina, concluyeron que el INRA 82 con 80 mM de glutamina, mejoró la motilidad total y progresiva del semen de asnos Poitou. Los mismo autores en 1997 reportaron la congelación de semen de asno Poitou con diluyente INRA 82 y 4% de glicerol y compararon el efecto crioprotector de yema de huevo de gallina y yema de huevo de codorniz esta última con un 10% de concentración y más eficiente durante la congelación. En 1998 Trimeche, Renard y Tainturier, compararon un medio base (MB) (compuesto de INRA 82 y 4% de glicerol), MB más 10% de yema de huevo de codorniz, MB más 80mM L-glutamina y MB más 10% yema de huevo de codorniz más 80mM glutamina (T<sub>2</sub>- 94) y llegaron a concluir que el T<sub>2</sub> – 94 mantiene la motilidad total y progresiva, preserva los núcleos espermáticos, el acrosoma y la integridad de la membrana durante la criopreservación; obtuvieron la primera cría de asno Poitou por medio de semen descongelado. Álvarez *et al.*,

2006 determinó el efecto del colesterol incorporado con ciclodextrina (CD) en la criopreservación de semen de asnos Zamorano-Leonés utilizó diluyente glucosa-EDTA y glicerol 2.5%, CD en proporción de 0, 1,5, 2, 2,5 y 3 mg/120 x 10<sup>6</sup> células espermáticas llegaron a la conclusión que la CD mejora la motilidad y viabilidad comparada con el control, la prueba hiposmótico fue similar para todas las proporciones de CD y la proporción de acrosoma intactos fue mayor para 2 y 2,5 mg de CD.

Oliveira *et al.*, (2006) evaluaron el efecto del crioprotector en la congelación de semen de asno y en la fertilidad, utilizaron eyaculados de semen de raza brasilera, los crioprotectores utilizados fueron dimetil sulfoxido (DMSO), dimetil formamida (DMF), dimetilacetamida (DA), glicerol (GLY), las combinaciones realizadas fueron 2% DMSO más 2% DMF, 3% DMF, 2% DA más 2% GLY, 3% DA, 3% GLY más 2% DMF, 3% DMSO más 2% GLY. Los resultados al aplicar estas combinaciones fueron; parámetros seminales iguales en las combinaciones probadas, no se obtuvo preñez en ninguna de las 53 hembras asnales inseminadas, pero si en las 10 yeguas inseminadas artificialmente, con el semen criopreservado con 3% de glicerol más 2% de dimetilformamida y diluyente MP 50 obtuvieron el 40% de preñez. Gama (2009), evaluó la fertilidad de semen congelado de asno de raza Pega en yeguas inseminadas pre y pos ovulación, encontró valores seminales posdescongelación similares a los encontrados por Canisso (2008) y además evaluó la fertilidad mediante la preñez de las yeguas; encontró que inseminadas post ovulación y diagnosticadas con ecografía el día 13 después de la IA, el 40% (10/25) y el día 25 el 36% (9/25) de las yeguas estaban preñadas, las yeguas inseminadas pre ovulación diagnosticadas el día 13 después de la IA el 26% (6/23) y al día 23,

17% (4/23) se encontraron preñadas. De la misma manera Vidament *et al.*, (2009) compararon la proporción de yeguas y hembras asnales inseminadas con semen refrigerado a 4 °C y semen congelado con medio diluyente INRA 82 y glicerol (0, 2,2, 3,5, 4,8 %) encontraron que la proporción de glicerol 2,2 es la mejor dando como resultado 11% (4/38) de hembras asnales preñadas y 36% (18/50) yeguas preñadas. Jepsen *et al.* (2010), obtuvieron 58,3% de preñeces en yeguas inseminadas con semen de asno congelado utilizando ciclodextrina. Rota *et al.*, (2008) investigaron los parámetros seminales, la respuesta inflamatoria y la fertilidad de hembras asnales, diluyeron el semen en INRA 96 y como crioprotector GLY y etilenglicol (EG) y se comparó con la adición de plasma seminal homólogo (PSH) Las hembras asnales se evaluaron a las 6 y 10 horas post IA para evaluar en el lavado uterino la concentración de polimorfo nucleares. Estos autores no encontraron diferencias entre los tratamientos.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Localización

La recolección y procesamiento de las muestras se realizaron en el Municipio de Chiquinquirá Boyacá, criadero Las Islas ubicado a 5°36'48" de longitud Norte y a 0°15'21" de longitud a una altura de 2580 metros sobre el nivel del mar y una temperatura promedio de 15 grados centígrados.

#### 3.2 Población y muestra

El experimento se llevó a cabo con cinco asnos criollos colombianos que se alimentaban con pasto picado y un kilo de concentrado al día, con edades entre los cinco a los siete años de edad. Cada experimento constó de dos tratamientos; cada eyaculado se dividió en dos, se evaluó y se congeló en nitrógeno líquido.

#### 3.3 Métodos y procedimiento

3.3.1 Colecta de semen. Teniendo en cuenta que se obtienen eyaculados homogéneos y concentraciones espermáticas constantes en los reproductores cuando el reproductor ha agotado sus reservas espermáticas extragonadales (Gama, 2009), se realizaron dos colectas o dos montas diarias con intervalo de 48 horas (como mínimo cinco colectas antes de iniciar las tomas para este trabajo). Se utilizó una hembra asnal como maniquí y una vagina artificial tipo Missouri.

Se realizó la recolección del eyaculado. Durante la colecta, el semen se filtró y la fracción gelatinosa se separó de la fracción rica en espermatozoides, posterior a la separación de las fracciones, se realizó la evaluación espermática de



forma subjetiva con el microscopio de luz. La evaluación utilizada en el precongelamiento del semen corresponde a la motilidad total, motilidad progresiva, vigor espermático, concentración espermática, volumen seminal sin gel, aspecto seminal y morfología espermática (Canisso *et al.*, 2008).

Luego de la recolección del eyaculado y la evaluación de parámetros seminales, se dividió el eyaculado en dos partes iguales y se aplicó a cada muestra el tratamiento 1 que consistió en: INRA 82 modificado (Tabla 2) con glicerol y el tratamiento 2: INRA 82 modificado con dimetilformamida, posteriormente se realizaron las curvas de enfriamiento y criopreservación en nitrógeno líquido (NL).

Tabla 2. Composición del medio diluyente INRA 82 modificado.

| Componente           | Cantidad  |
|----------------------|-----------|
| Glucosa anhidra      | 20 g      |
| Lactosa              | 1.5 g     |
| Fructosa             | 5 g       |
| Sacarosa             | 1.5 g     |
| Citrato de sodio     | 0.5 g     |
| Hepes                | 5 ml      |
| Penicilina G         | 50.000 UI |
| Agua mili q          | 431 ml    |
| Leche descremada UHT | 500 ml    |
| Yema de huevo        | 20 ml     |

3.3.2 Dilución y centrifugación. El semen y el medio diluyente deben encontrarse a la misma temperatura (37°C) en el momento de la dilución.

La proporción de dilución seminal fue 1:1, una parte de semen y una parte de diluyente. Diluido el semen se centrifugó, a fin de concentrar los espermatozoides para permitir una segunda dilución y remover parte del plasma seminal que tiene efectos nocivos sobre la motilidad espermática. Para la centrifugación se utilizaron tubos de ensayo graduados con capacidad de 15 ml, con fuerzas de centrifugación leves (400 a 600 g) por 15 minutos (Gama, 2009). Luego de la centrifugación, el sobrenadante se removió con una pipeta y el semen restante se resuspendió con el diluyente de congelamiento.

3.3.3 Dilución de congelamiento y envasado: se realizó en una proporción de dilución seminal de 150 millones de espermatozoides/ml del diluyente, que se envasó en pajillas de 0.5 ml, se selló manualmente con alcohol polivinilo.

3.3.4 Enfriamiento. El semen es enfriado a 5°C, durante una hora y cuarenta y cinco minutos. Posteriormente se llevaron a vapores de NL en una caja de icopor que contenía 6 cm de altura de NL y una bandeja que contenía pajillas a una distancia de 4 centímetros sobre el nitrógeno líquido, las pajillas permanecieron en vapores de NL durante 15 minutos, posteriormente se sumergió en el nitrógeno líquido para su preservación (Oliveira, 2005; Gama, 2009).

3.3.5 La descongelación. Se realizó en baño maría a 37°C por 30 segundos (Trimeche *et al.*, 1996; Trimeche, Renard, Tainturier., 1998; Trimeche *et al.*, 1997; y Flores *et al.*, 2008).

3.3.6 La evaluación del semen posdescongelación. Para la evaluación física del semen posdescongelación, se midieron la motilidad espermática total, motilidad espermática progresiva rectilínea y vigor espermático. Se tomó una muestra de 5 µl de semen se depositaron en una cámara, los parámetros del semen descongelado se reportaron después de evaluar la muestra usando el software analizador de imagen CASA (Sperm Analysis System, versión 123 IVOS). Se reportaron las siguientes características del semen: motilidad total (MT), motilidad progresiva (MP), velocidad lineal (VSL), velocidad curvilínea (VCL), velocidad promedio (VAP).

La longevidad de los espermatozoides posdescongelación se evaluó mediante la prueba de termoresistencia, el semen se descongeló y fue colocado en tubos de 1 ml, incubados en baño maría a 37 °C durante 90 minutos, La motilidad y el vigor espermático fueron evaluados por microscopía óptica a los 0, 30, 60, 90 minutos pos descongelación (Gama, 2009).

La integridad de la membrana fue evaluada usando la prueba hipo osmótica, se preparó la solución de sacarosa diluyendo 10.7 gramos del azúcar en 50 ml de agua con una concentración de 100 miliosmoles/Litro. Se incubó en baño maría 1ml de solución de sacarosa con 5 microlitros de semen a 37 °C durante 5 minutos. Los espermatozoides íntegros se diferenciaron por enrollamiento de la cola. Se observaron 100 células por muestra bajo un microscopio óptico con un objetivo de

40x. Se reportaron los espermatozoides con colas enrolladas como la proporción de espermatozoides con membrana íntegra.

La proporción de espermatozoides vivos se evaluó usando la tinción con eosina-nigrosina (Mesa, 2010). Se observó en microscopio de luz en 40x. Se contó 100 células, los espermatozoides que no tomaron la tinción son los vivos, los que se colorearon son los espermatozoides muertos.

Por medio de la prueba de naranja de acridina (NA) se midió la susceptibilidad del ADN del espermatozoide al ácido inducido por desnaturalización *in situ* por cambio meta cromático del naranja de acridina del verde (ADN natural) al rojo (ADN desnaturalizado). El NA se intercala entre la dos cadenas de ácido nucleicos como un agregado (Agarwal y Allamaneni, 2005). Para hacer la solución de trabajo se tomó 5 ml de NA y 45 de fosfato buffer salino (PBS). Se tomaron 200  $\mu$ l de semen y 200  $\mu$ l de solución de trabajo, se realizaron extendidos de manera tradicional, se secaron las láminas y se observaron bajo luz fluorescente para evaluar la fragmentación del ADN espermático (Graham y Mocé, 2005).

### 3.4 Diseño estadístico

El experimento se realizó con base en un diseño de bloques completos al azar con dos repeticiones por bloque, cada asno era un bloque. Se utilizó la prueba de Bonferroni para comparar las medias de los tratamientos.

Se evaluaron las variables: porcentaje de motilidad total. Motilidad progresiva, vigor en el semen fresco y posdescongelación se evaluó motilidad total, motilidad

progresiva, velocidad lineal, velocidad curvilínea, velocidad promedio con, termoresistencia, hipoosmótico y viabilidad (tinción de eosina-nigrosina y NA).

Tratamientos

Tratamiento 1 INRA82 modificado glicerol 5%

Tratamiento 2 INRA82 dimetil formamida 5%

El modelo matemático obedece a la fórmula:

$$Y_{ij} = U + \alpha_i + T_{ij} + E_{ij}$$

$Y_{ij}$  = Respuesta del i-ésimo bloque por acción del j-ésimo tratamiento.

$U$  = Media población

$\alpha_i$  = Efecto del i-ésimo bloque.

$T_{ij}$  = Efecto del j-ésimo tratamiento.

$E_{ij}$  = Error asociado del i-ésimo bloque que recibió el j-ésimo tratamiento

Se realizó una prueba de Shapiro-wills para determinar la normalidad de la muestra, solo en algunas variables se requirió emplear una transformación angular para que satisficieran el supuesto de normalidad. Se realizó un análisis de varianza para cada una de las variables respuesta y se compararon las medias.

#### 4. RESULTADOS

Este estudio se basó en comparar dos crioprotectores, la dimetilformamida y el glicerol en el medio diluyente INRA 82 modificado en la criopreservación de cinco eyaculados de asnos criollos colombianos. Los siguientes son los datos del material biológico que se utilizó en el proyecto. El semen fresco, se midió el volumen (ml)  $60\pm 6,3$ , movilidad total (%)  $71\pm 9,6$ , movilidad progresiva (%)  $66\pm 9,6$  y vigor  $3,0\pm 0,0$ . En la tabla 3, se presentan los datos de cada asno criollo con la respectiva media y desviación estándar de cada característica del semen fresco.

Tabla 3. Características de cinco eyaculados en fresco de asnos criollos colombianos.

| <b>Semental Asnal</b> | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>Media<math>\pm</math>SD</b> |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|--------------------------------|
| Volumen               | 70,0     | 60,0     | 60,0     | 60,0     | 50,0     | 60,0 $\pm$ 6,3                 |
| Motilidad Total       | 80,0     | 65,0     | 85,0     | 60,0     | 65,0     | 71,0 $\pm$ 9,6                 |
| Motilidad Progresiva  | 75,0     | 60,0     | 80,0     | 55,0     | 60,0     | 66,0 $\pm$ 9,6                 |
| Vigor (escala 1 a 5)  | 3,0      | 3,0      | 3,0      | 3,0      | 3,0      | 3,0 $\pm$ 0,0                  |

SD: Desviación Estándar

Los datos de las características seminales después de adición del medio diluyente INRA 82 modificado sin el crioprotector y luego de la adición de cada crioprotector se expresan en la tabla 4, donde se encuentran los parámetros espermáticos de cada asno con su media y su respectiva desviación estándar.

Tabla 4. Parámetros seminales después de la adición de INRA 82 modificado y de los crioprotectores dimetilformamida y glicerol.

| <b>Semental Asnal</b>                           | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>Media±SD</b> |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|-----------------|
| <b>INRA 82 modificado sin crioprotector</b>     |          |          |          |          |          |                 |
| Motilidad Total (%)                             | 80,0     | 65,0     | 85,0     | 65,0     | 75,0     | 74±6,4          |
| Motilidad Progresiva (%)                        | 75,0     | 60,0     | 80,0     | 60,0     | 65,0     | 68±8,1          |
| Vigor (1-5)                                     | 3,0      | 3,0      | 3,0      | 3,0      | 3,0      | 3,0±0,0         |
| <b>INRA 82 modificado + 5% Dimetilformamida</b> |          |          |          |          |          |                 |
| Motilidad Total (%)                             | 80,0     | 65,0     | 75,0     | 65,0     | 65,0     | 70±6,3          |
| Motilidad Progresiva (%)                        | 80,0     | 60,0     | 70,0     | 60,0     | 65,0     | 66±8,0          |
| Vigor (1-5)                                     | 3,0      | 3,0      | 3,0      | 3,0      | 3,0      | 3,0±0,0         |
| <b>INRA 82 modificado + 5% Glicerol</b>         |          |          |          |          |          |                 |
| Motilidad Total (%)                             | 80,0     | 65,0     | 75,0     | 65,0     | 70,0     | 71±5,8          |
| Motilidad Progresiva (%)                        | 80,0     | 60,0     | 70,0     | 60,0     | 65,0     | 67±7,4          |
| Vigor (1-5)                                     | 3,0      | 3,0      | 3,0      | 3,0      | 3,0      | 3,0±0,0         |

SD: Desviación Estándar

Los parámetros seminales de motilidad total y motilidad progresiva del semen fresco, los obtenidos en los procesos al adicionar INRA 82 modificado, INRA 82 modificado más crioprotector y las motilidades pos descongelación, se muestran en

la figura 1, donde se observa disminución de la motilidad total y la motilidad progresiva posdescongelación con ambos crioprotectores.

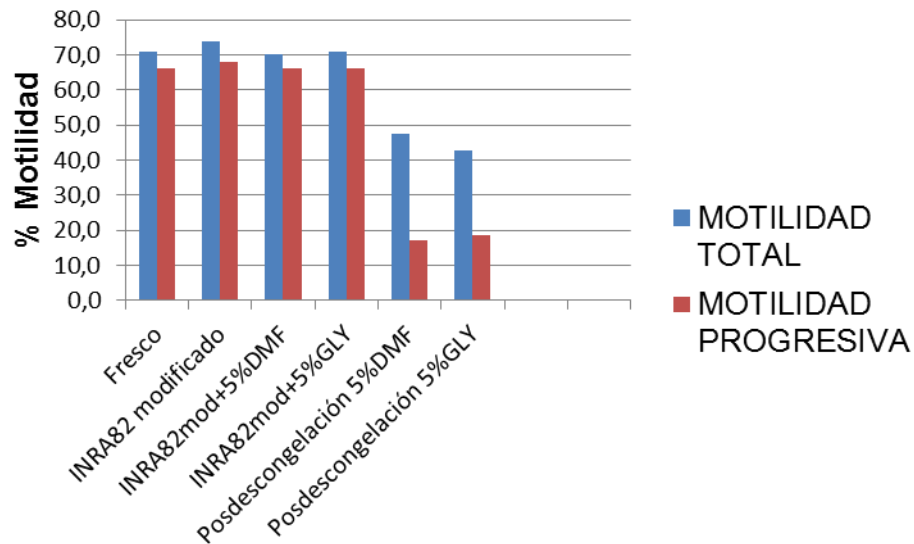


Figura 1. Efecto de cada proceso de criopreservación sobre la motilidad de la célula espermática de asnos criollos Colombianos.

Las medias de las características espermáticas posdescongelación de los asnos criollos colombianos que se utilizaron en este trabajo de criopreservación de semen de asnos con diluyente INRA 82 modificado y como crioprotector dimetilformamida y glicerol se observan en la tabla 5.



Tabla 5. Características seminales posdescongelación de cinco asnos criollos

| Características<br>espermáticas         | Asno 1 |       | Asno 2 |       | Asno 3 |       | Asno 4 |      | Asno 5 |       |
|---|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|------|--------|-------|
|   | DMF    | GLY   | DMF    | GLY   | DMF    | GLY   | DMF    | GLY  | DMF    | GLY   |
| Motilidad Total (%)                     | 66,0   | 61,0  | 36,0   | 27,0  | 34,0   | 47,0  | 41,0   | 23,0 | 60,0   | 55,0  |
| Motilidad<br>Progresiva (%)             | 20,0   | 25,0  | 11,0   | 10,0  | 14,0   | 23,0  | 13,0   | 10,0 | 27,0   | 31,0  |
| Velocidad promedio<br>VAP ( $\mu/s$ )   | 58,7   | 62,2  | 63,9   | 66,1  | 61,9   | 67,5  | 58,7   | 62,1 | 75,9   | 82,7  |
| Velocidad lineal<br>VSL ( $\mu/s$ )     | 42,1   | 48,9  | 43,4   | 43,8  | 48,7   | 54,9  | 42,7   | 51,3 | 59,9   | 68,9  |
| Velocidad curvilínea<br>VCL ( $\mu/s$ ) | 112,6  | 108,7 | 139,1  | 124,2 | 101,7  | 117,7 | 112,6  | 98,3 | 142,2  | 133,3 |
| Prueba hipoosmótico<br>(+)              | 52,0   | 32,0  | 45,0   | 48,0  | 22,0   | 11,0  | 20,0   | 19,0 | 15,0   | 12,0  |
| Morfología normal<br>(%)                | 77,5   | 82,5  | 86,0   | 95,0  | 65,5   | 83,0  | 82,0   | 80,5 | 66,0   | 82,5  |
| Integridad del ADN<br>(%)               | 46,0   | 65,0  | 65,0   | 68,0  | 52,0   | 56,0  | 52,0   | 54,0 | 71,0   | 55,0  |

Para las variables motilidad espermática total y motilidad espermática progresiva el análisis de varianza no mostró una diferencia significativamente estadística entre tratamientos comportándose de manera similar, como se observa en la figura 2.

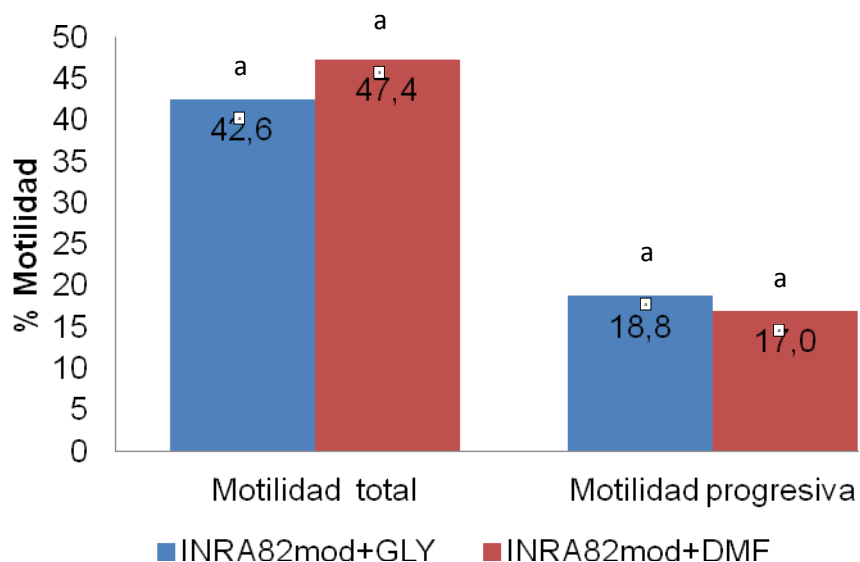


Figura 2. Efecto del crioprotector sobre la motilidad total y motilidad progresiva espermática. Letras minúsculas iguales ( $p > 0,05$ ); prueba de Bonferroni.

La velocidad curvilínea no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), entre la velocidad lineal y la velocidad promedio se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) figura 3.

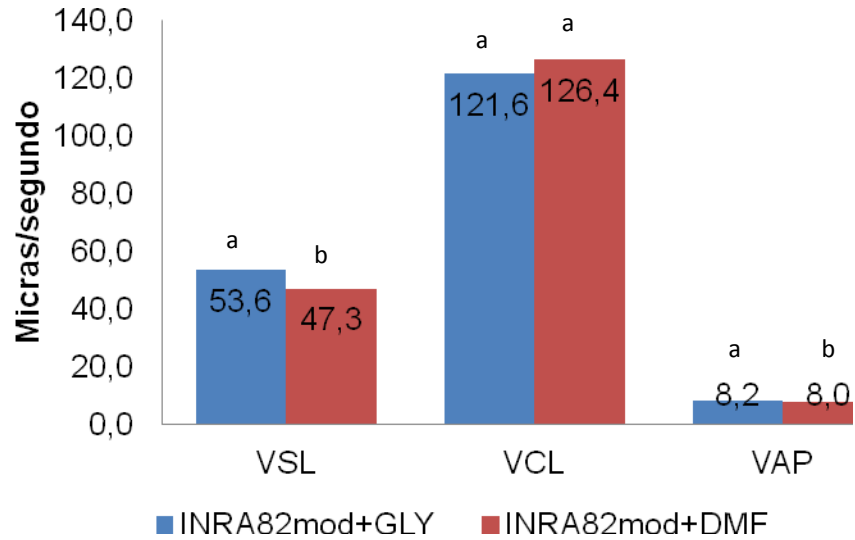


Figura 3. Efecto del crioprotector sobre los tipos de trayectoria espermática posdescongelación, la figura muestra la velocidad curvilínea (VCL) letras minúsculas iguales ( $P > 0,05$ ), la velocidad lineal (VSL), la velocidad promedio (VAP). Letras minúsculas diferentes ( $P < 0,05$ ); prueba de Bonferroni.

Al usar glicerol como crioprotector hubo aumento en las células espermáticas vivas en comparación cuando se usó dimetilformamida como crioprotector (figura 4).

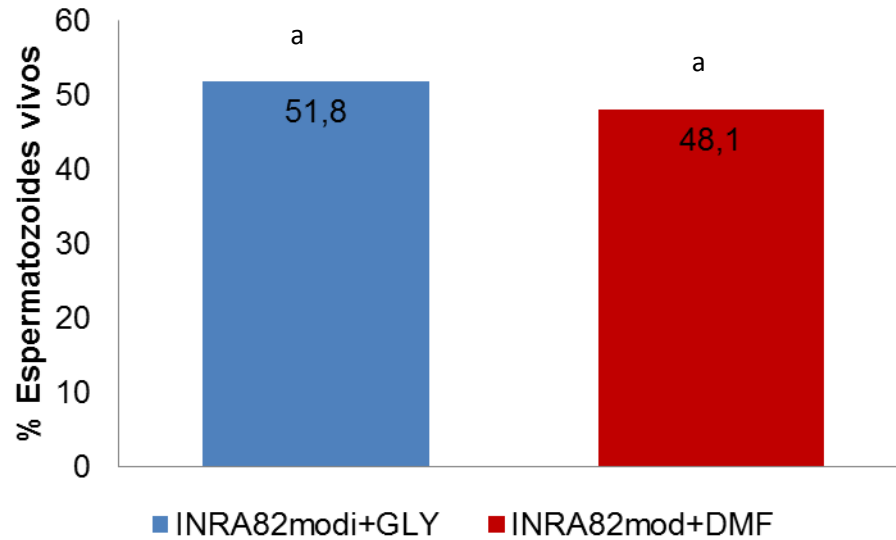


Figura 4. Evaluación de viabilidad, coloración realizada con eosina-nigrosina, la figura muestra el efecto del crioprotector en el porcentaje de espermatozoides vivos. Letras minúsculas iguales ( $P > 0,05$ ); prueba de Bonferroni.

En la evaluación hipoosmótica, la proporción de espermatozoides reactivos a la prueba, los que presentaron una membrana plasmática íntegra y funcional a los treinta minutos presentaron una media de 24,4 variando de 11% a 48% para los espermatozoides criopreservados con glicerol y los espermatozoides criopreservados con dimetilformamida tuvieron una media de 30,8% variando de 52,0% a 15,0%, la figura 5, muestra un incremento de las células positivas al HOST con dimetilformamida respecto al glicerol, donde no se observaron diferencias significativa entre los dos tratamientos ( $P > 0,05$ ).

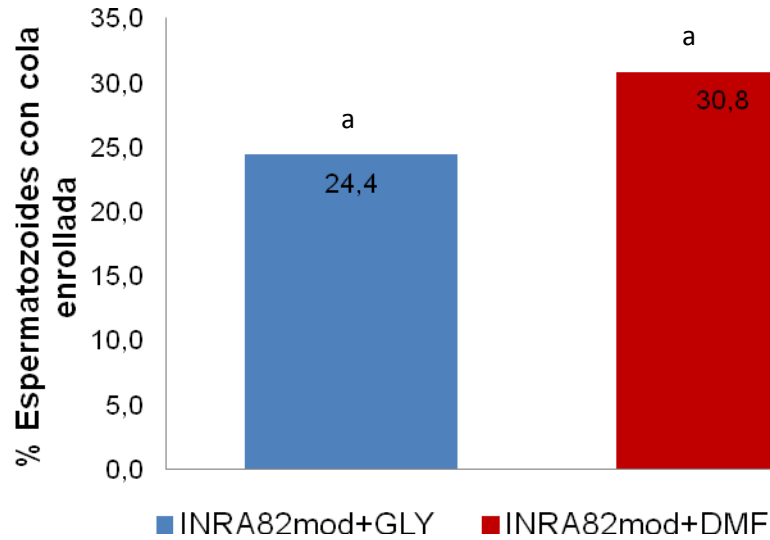


Figura 5. Porcentaje de espermatozoides íntegros posdescongelación. Resultado de la prueba hipoosmótico. Letras minúsculas iguales ( $P > 0,05$ ); prueba de Bonferroni.

Además posdescongelación se realizó la prueba de termoresistencia (PTR) en la cual se evaluó la viabilidad de la célula espermática en relación a los parámetros como motilidad y vigor después de la descongelación del semen en los tiempos 30, 60 y 90 minutos de PTR, se observó una disminución progresiva de la motilidad total y motilidad progresiva sin mostrar diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos en cada monitoreo ( $P > 0,05$ ) (figura 6,7 y 8).

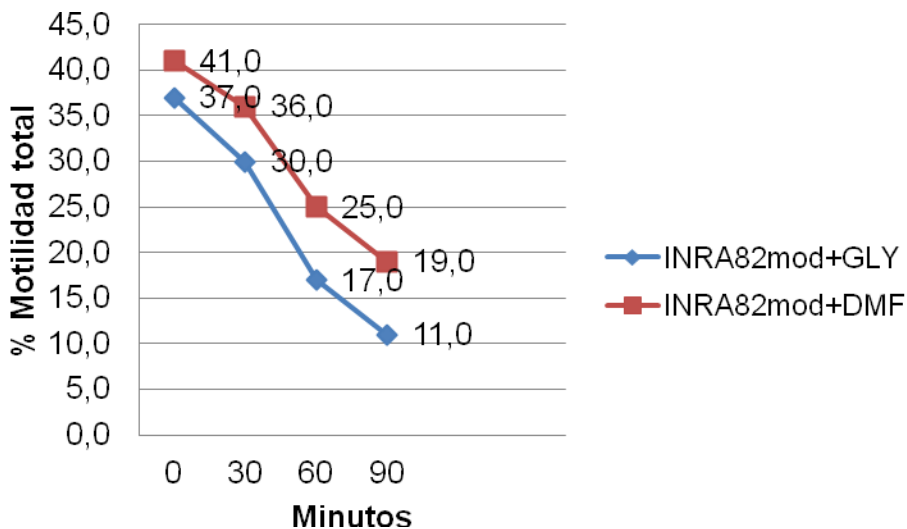


Figura 6. Motilidad total (%) de semen congelado-descongelado con INRA 82 modificado con glicerol y dimetilformamida, en diferentes tiempos de la prueba de termoresistencia. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos en los monitoreos ( $P > 0,05$ ).

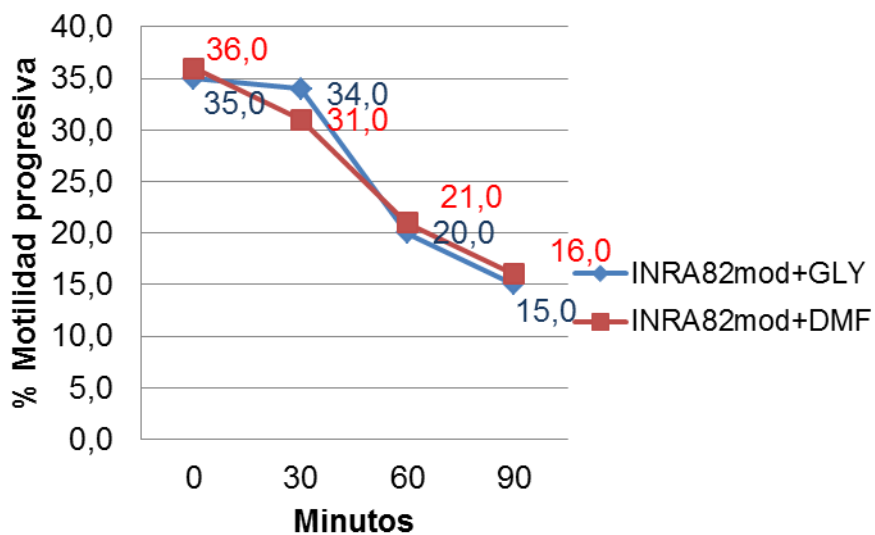


Figura 7. Motilidad progresiva (%) de semen congelado-descongelado con INRA 82 modificado con glicerol y dimetilformamida, en diferentes tiempos de la prueba

de termoresistencia. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos en los monitoreos ( $P>0,05$ ).

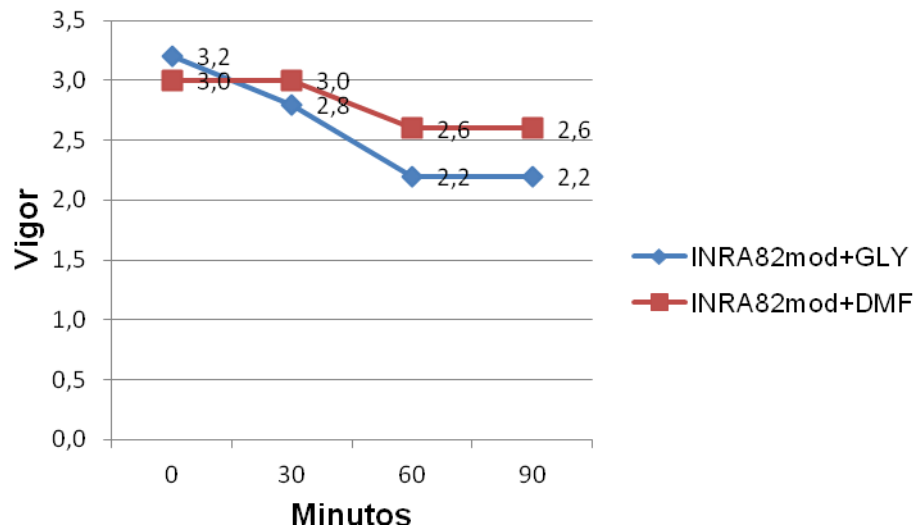


Figura 8. Vigor de semen congelado-descongelado con INRA 82 modificado con glicerol y dimetilformamida, en diferentes tiempos de la prueba de termoresistencia. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos en los monitoreos ( $P>0,05$ ).

La morfología se evaluó utilizando verde de malaquita y se muestra en la figura 9, donde se observa la comparación de las células que presentaron morfología normal, se observó un leve aumento de las células espermáticas normales con el tratamiento INRA 82 modificado con glicerol, sin mostrar una diferencia estadística significativa. Los defectos morfológicos más observados fueron cola enrollada, sin cola, ruptura de pieza intermedia, ruptura del cuello y gota citoplasmática

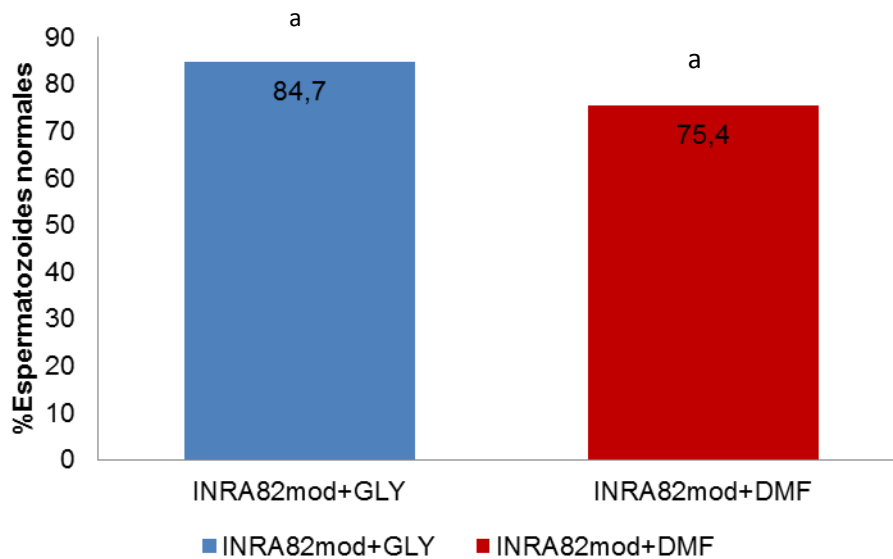
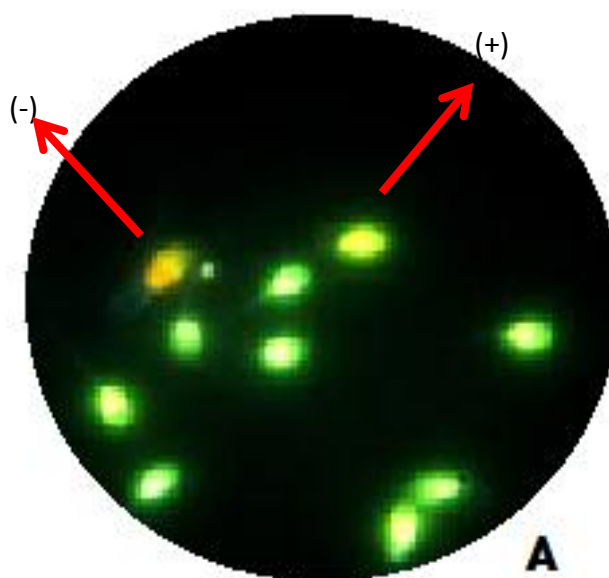


Figura 9. Proporción (%) de células normales por tratamiento (tinción verde de malaquita). Letras minúsculas iguales ( $P > 0,05$ ); Prueba de Bonferroni.

Para la variable epifluorescencia de naranja de acridina se encontró una fragmentación de cromatina del espermatozoide asnal que no presento diferencias significativamente estadística entre tratamientos, como se observa en la figura 10.





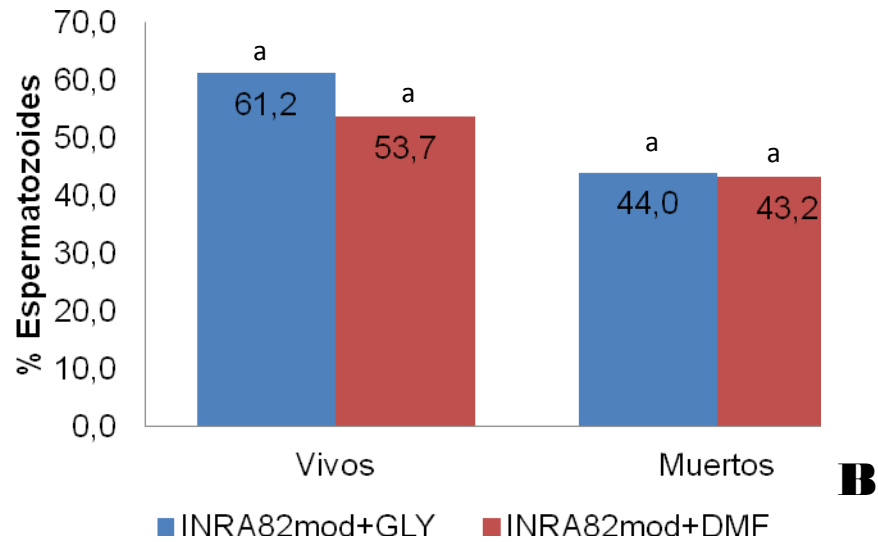


Figura 10. En la Figura 10A se observa el resultado de la coloración por naranja de acridina por epifluorescencia y en la Figura 10B se muestra el porcentaje de espermatozoides ADN intactos y ADN fragmentado con la prueba de fluorescencia (NA) de semen descongelado. Letras minúsculas iguales ( $P > 0,05$ ); prueba de Bonferroni

## 5. DISCUSIÓN

El interés en la producción de asnos ha aumentado en los últimos años, en particular por su uso en la producción de leche hipoalérgica, en la terapia con animales y en la producción de mulares para el trabajo, por otra parte varias razas de asnos son consideradas por la FAO en peligro de extinción debido a su reducido tamaño poblacional (Contri *et al.*, 2010).

Para la caracterización de los parámetros espermáticos de los sementales asnales utilizamos cinco eyaculados de cinco asnos criollos colombianos. A pesar de que no es posible caracterizar el semen de asno criollo colombiano con sólo 5 ejemplares, la información obtenida del semen fresco permitió hacer una evaluación inicial del material espermática colectado en función a de color, concentración, motilidad, viabilidad y morfología que servirá de base para futuras investigaciones, debido al escaso material bibliográfico entorno a la evaluación de los reproductores asnales. En este trabajo se hizo un sólo muestreo por individuo para evaluar las características seminales en fresco y para la criopreservación con GLY y DMF.

La asociación que registra a los equinos en Colombia, no hace pruebas reproductivas; por lo que no hay datos para comparar los resultados del presente

trabajo, el cual constituye el primer reporte de evaluación computarizada del semen de asnos criollos en el país, lo que llevó a realizar las comparaciones con datos reportados de otras razas (Mesa, 2010). Por lo que se pudo evidenciar que las características seminales se encuentran dentro del rango normal establecido.

No existe un protocolo unificado para la congelación de semen de asnales los métodos varían mucho entre los autores. En este trabajo se aplican procesos de colecta, congelación y descongelación de manera artesanal que se pueden llevar a cabo en cualquier explotación.

El volumen del eyaculado sin gel fue en promedio de  $60,0 \pm 6,3$  que es superior al encontrado por Canisso *et al.*, (2010), e inferior al reportado por Gloria *et al.*, (2011) y Rota *et al.*, (2012) que indican una gran variabilidad entre razas asnales. La motilidad total, progresiva y el vigor del semen en fresco presentaron en promedio;  $71,0 \pm 9,6$ ,  $66,0 \pm 9,6$  y  $3,0 \pm 0,0$  respectivamente que están dentro de los parámetros reportados por Miró (2005), Gama (2009) y Gloria *et al.*, (2010).

Los valores de motilidad total y motilidad progresiva se vieron disminuidos después de la dilución con el crioprotector, esto es asociado al efecto tóxico que tienen los crioprotectores y al intercambio de líquidos del espacio extracelular a intracelular. Aunque un tratamiento se realizó con DMF como crioprotector que la literatura reporta con una menor injuria por su bajo peso molecular y entrada rápida al espermatozoide frente al glicerol, no se evidenció una diferencia significativamente estadística entre los tratamientos, Canisso (2008) y Mesa (2011).

En la comparación de los tratamientos posdescongelación con las variables en fresco, es evidente que el material espermático presentó una baja de la

viabilidad debido a la manipulación, la centrifugación y los descensos de temperatura que llevaron a un estrés osmótico a la célula espermática, repercutiendo en una injuria a nivel de la membrana citoplasmática y mitocondria.

Sumado a esto está el efecto de la descongelación del material espermático y la formación de cristales de hielo injurian la cromatina, la mitocondria y el acrosoma. Además del aumento del metabolismo de óxido reducción debido a los espermatozoides muertos e injuriados que lleva a una mayor producción de radicales libres e influencia negativamente la totalidad de la muestra espermática (Canisso, 2008; Mesa, 2010).

La VCL Son iguales para el crioprotector DMF como para el GLY pero la VSL y la VAP son diferentes, siendo superior para la DMF, por que los parámetros mejoran al utilizar DMF como crioprotector por su bajo peso molecular y su baja toxicidad frente al GLY que posee mayor peso molecular y es más toxico para los espermatozoides Mesa (2010).

Los hallazgos de la VCL, VSL y VAP son superiores a los encontrados por Trimeche *et al.*, (1996 y 1997) utilizando INRA 82 y glicerol para la criopreservación de células espermáticas asnales y son superiores a los encontrados por Flores *et al.*, (2008) que utilizaron como diluyente leche descremada y 5% de glicerol y Taberner *et al.*, (2010) la superioridad de estas variables con el INRA 82 modificado posiblemente se debe a la presencia de cuatro azucares en el diluyente, pero son inferiores a los reportes de Contri *et al.*, (2012).

En la viabilidad espermática no se encontró aumento de células vivas cuando se utilizó DMF frente al GLY es próxima a lo encontrado por Flores *et al.*,

(2008) y Jepsen *et al.*, (2010) quienes utilizaron 5% y 2% de GLY respectivamente, inferior a la encontrada por Miró *et al.*, (2005) y por Contri *et al.*, (2012) quienes encontraron que el INRA 96 con leche, yema de huevo y 2% de GLY mejoran los parámetros seminales de los reproductores por sus componentes y por los fosfolípidos de la yema de huevo que protege la membrana espermática manteniendo la viabilidad espermática.

En la reacción positiva de los espermatozoides a la prueba hipoosmótica no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos INRA 82 modificado DMF 30,8 y INRA 82 modificado GLY 24,4 es próxima a valores de Miró *et al.*, (2005) e inferior a lo reportado por Cortés *et al.*, (2008) que utilizó INRA 96, 2% GLY.

En la tinción fluorescente con NA se evaluó la fragmentación o no de la cromatina, no hay diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ) mostrando una mayor integridad del ADN con el tratamiento INRA 82 modificado GLY 61,2 frente a 53,7 del tratamiento INRA 82 modificado DMF y se encontró fragmentación de la cromatina de los espermatozoides criopreservados de asnos superiores a los reportados por Cortés *et al.*, (2008) quien también utilizó NA y crio preservó semen de asno con INRA 96 y 2% GLY es probable que debido a la formulación del INRA 96 y a la baja concentración de GLY haya una mayor protección de los espermatozoides evitando la fragmentación de la cromatina además concluyó que el aumento de temperatura afecta el ADN, encontrando mayor cantidad de espermatozoides con cromatina fragmentada a una temperatura de 37°C que a temperaturas de 25°C y 4°C, siendo mejor 4°C para mantener la integridad de la cromatina.

La longevidad de los espermatozoides en la prueba de termoresistencia se ve reducida progresivamente afectando la motilidad y el vigor, según Gama (2009) estos parámetros se ven afectados por cambios en el transporte activo y la permeabilidad de la membrana plasmática de la región de la cola de los espermatozoides así como por cambios en la energía disponible y daños en el axonema solo los valores de vigor a los 90 minutos de la PTR, teniendo en cuenta la disminución progresiva de la motilidad se puede inferir que el metabolismo energético no fue preservado a largo plazo Gama (2009).

La proporción de espermatozoides de asnos morfológicamente normales son iguales para los dos tratamientos, se observó un leve aumento de las células espermáticas normales con el INRA 82 modificado GLY, sin mostrar una diferencia estadística significativa. Los valores de la morfología espermática de los asnos criollos son cercana a la proporción encontrada por Miró *et al.*, (2005), Canisso (2008) y Cortés *et al.*, (2008). Según Canisso el aumento de las anomalías espermáticas están asociadas con la declinación de la fertilidad de los reproductores asnales.

## 6. CONCLUSIONES

El espermiograma en los asnos criollos colombianos tiene un comportamiento similar a los parámetros seminales reportados en otras razas de asnos.

El acceso a biotecnologías de la reproducción nos permite evaluar el material seminal in vitro de forma objetiva, eliminando la subjetividad en la investigación.

El desarrollo de los sistemas de análisis de semen asistido por computador, permiten que la evaluación espermática sea más objetiva y precisa, además evalúa nuevas variables con valor diagnóstico y la utilización de compuestos conjugados a sondas fluorescentes y el desarrollo de diferentes tecnologías para visualizar y cuantificar la fluorescencia de la célula, permitiendo un análisis más completo de los espermatozoides.

El diluyente INRA 82 modificado de acuerdo a los resultados obtenidos demostró ser eficiente en la criopreservación de células espermáticas de asno criollo colombiano independientemente que se use DMF o GLY como crioprotector.

Se establece que los espermatozoides de esta especie son tolerantes con ambos agentes crioprotectores y al diluyente, presentando similares porcentajes en las variables evaluadas posdescongelación.

La motilidad espermática y la integridad de la cromatina son equivalentes posdescongelación lo que permite obtener un semen viable después del proceso de congelación.

Las investigaciones sobre la criopreservación de semen de asnos son muy limitadas, motivo por el cual es necesario continuar investigando en tasas de preñez con semen congelado en hembras equinas, en pro de preservar las características deseables de los reproductores mediante bancos de germoplasma,

|



## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agarwal, A., Allamaneni, S.S.R. (2005). Alteraciones de la cromatina espermática en la etiopatogenia de la fertilidad masculina. *Revista Internacional de andrología*, 3, 31-37
- Álvarez, A.L., Serres. C., Torres. P., Crespo. F., Mateos. E., Gómez-Cuétarra. C. (2006). Effect of Cholesterol-leaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 9; 89-91
- Brito, L.Fc. (2007). Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 6; 249-264
- Brito, L.Fc., Greene, Lauren. M., Kelleman, Audrey., Knobbe, Mare., Turner, Regina. (2011). Effect of method an clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology*, 76; 745-750.
- Boeta, M., Zarco, L. (2000) Utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas, disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2000/um001j.pdf>, recuperado: 7 de julio de 2011.
- Caiza de la Cueva, F.I., Rigau, T., Bonet, S., Miró, J., Briz, M., Rodriguez-Gil, J.E. (1997). Subjeting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: Effects of ovabain. *Theriogenology*, 47; 765-784.
- Canisso, I. F., Carvalho, G. R., Morel, D., Guimarães, J. D., McDonnell. (2010). Sexual Behavior and ejaculate characteristics in Pêga donkeys (*Equus asinus*) mounting estrous horse mares (*Equus caballus*), *Theriogenology*, 73; 56-63.
- Canisso, I.F. (2008), Conportamiento sexual, parametros seminais e fertilidade do semen congelado de jumentos (*Equus asinus*) da raça pega [trabajo de grado], Minas Gerais, Universidad Federal de Vicosa, Programa de pós-graduacao en Zootecnia.
- Canisso, I,F., Souza, F., Ortigoza, J.M. et. Al. (2008). Congelamiento de semen de burro (*equus asinus*). *Revista de Investigación veterinaria del Perú*, 19; 113-125
- Chenoweth, P. J. (2005). Genetic sperm defects, *Theriogenology*, 64; 457-468.
- Contri, A., De Amicis, I., Veronesi, M.A., Faustini, M., Robbe, D., Carlucio, A. (2010). Efficiency of diferent extenders on cooled sêmen during long and short day length seasons in Martina Franca donkey. *Animal Reproduction Science*, 120; 136-141
- Contri, A., Gloria, A., Robbe, D., De Amicis, I., Carluccio, A. (2012). Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis. *Theriogenology*, 77; 166-173

- Cortés, E., Crespo, F., Gosálvez, M., Dávila, C., López, G., Gósalvez, J. (2008). DNA fragmentation in frozen sperm of equus asinus: Zamorano-Leonés, a breed at risk of extinction. *Theriogenology*, 69; 1022-1032
- Eshleman, K.L., Pinto, C.R.(2010). Simplifying the determination of sperm membrane integrity in stallions with the hypoosmotic swelling test. *Animal Reproduction Science*, 1215; 203-204
- Flores, E., Taberner, E., Rivera, M., Peña, A., Rigau, T., Miró, J., Rodríguez, J. (2008). Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. *Theriogenology*, 70; 936-945
- Foster, M.L., Love, C.C., Varner, D.D., Brinsko, S.P., Hinrichs, K., Teague, S. *et al.* (2011). Comparison of methods for assessing integrity of equine sperm membranes, 76; 334-341
- Gloria, A., contri A., De Amicis I., Robbe, D., Carbolucio, A. (2011). Differences between epididymal and ejaculated sperm characteristics in donkey. *Animal reproduction Science*, 128; 117- 122
- Gama, P.(2009). Fertilidade do semen congelado de jumento (*Equus asinus*) da raça pega emeguas inseminadas pre e pós-ovulacao [trabajo de grado], Minas Gerais, Universidad Federal de Vicosa, Programa de pós-graduacao en Zootecnia
- Graham J., & Mocé E. (2005). Fertility evaluation of frozen/ thawed semen. *Theriogenology*. 64: 492-504
- Henry, M, Lodi, L.D, Gastel, M.M.F.O. (1998). Sexual behaviour of domesticated donkeys (*Equus Asinus*) breeding under controlled or free range management systems. *Applied Animal Behaviour Science*, 60; 263-276.
- Jepsen, R., Evans, E., Young, R. (2010). Use of direct thaw insemination to establish pregnancies with-frozen thawe semen from a standard jack, *Journal of Equine Veterinary Science*, 30; 651-656
- Katayose, H., Yanagida, K., Hashimoto, S., Yamada, H., Sato, A. (2003). Use of diamide-acridine orange fluorescence staining to detect aberrant protamination of human-eyaculated sperm nuclei. *Fertility and Sterility*, 79; 670-676
- Lewin, L., Golán, R., Freidlin, P., Shochat, L. (1999). A comparative study of spermatozoal chromatin using acridine orange staining and flow cytometry. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 124; 133-137
- Loomis, P.R. (2011). The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction science*, 68; 191-200
- Loomis, P.R., Graham, J.K. (2008). Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal reproduction science*, 105; 119-128.
- McDonnell, S. M. (1998). Reproductive behavior of donkey (*Equus asinus*) applied *Animal Behavior Science*, 60; 277-282
- Melo, S. L., Henry, M., Souza, M. C., Oliviera, S. M. P. (2000). Effect of split ejaculation and seminal extenders on longevity of donkey semen preserve al 5%. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 52; 373-378
- Mesa, A. (2010), Efecto del colesterol y la dimetil formamida sobre la criosupervivencia de espermatozoides de caballos criollos colombianos

- [trabajo de grado], Medellín, Universidad Nacional de Colombia, Maestría en Ciencias-Biotecnología.
- Miller, D.C. (2008). Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. *Theriogenology*, 70(3); 463 – 468
- Miró, J., Lobo, V., Quintero, A., Medrano, A., Peña, A., Rigau, T. (2005). Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. *Theriogenology*, 63; 1706-1716
- Miró, J., Taberner, E., Rivera, M., Peña, A., Medrano, A., Rigau, T. *et al.* (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; 1017-1022
- Morrell, J. M., Wallgren, M. (2011). Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. *Journal of Animal Reproduction Science*, 123; 64-69
- Nie, G., Wenzol, J. (2001). Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoa plasma membranes. *Theriogenology*, 55; 1005-1008
- Neild, D., Chaves, G., Flores, M., Mora, N., Beconi, M., Agüero, A. (1999). Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 51; 721-727
- Oldenhof, A., Friedel, K., Sieme, H., Glasmacher, B., Wolkers, W. (2010). Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology*, 61; 115-122
- Oliveira, J.V., Alvarenga, M.A., Melo, C.M., Marcelo, L.M., Dell' Aqua Jr, J.A., Papa, F. O. (2006). Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. *Animal Reproduction Science*, 94; 82-84
- Oliveira, J. V. (2005). Estudo de metodologias para a Criopreservação de sêmen de jumento (*Equus asinus*) por meio de testes laboratoriais e fertilidade [ tesis de Maestría], São Paulo, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de medicina Veterinária e zootecnia.
- Palma, Gustavo. A. (2008). Biotecnología de la reproducción. Alta Córdoba: Repro biotec.
- Pasch, S., Bostedt, H., Failling Klaus., Bergmann, M. (2006). Advanced fertility diagnosis in stallion semen using transmission electron microscopy. *Animal Reproduction Science*, 91; 285-298
- Pinto, C.R.F., Kazink, D.M. (2008). Simplified hypoosmotic swelling testing (Host) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 104; 450- 455
- Rota, A., Magelli, C., Panzani, D., Camillo, F. (2008). Effect of seminal plasma on cooled-preserved Amrita donkey spermatozoo. *Theriogenology*, 69; 179-185
- Rota, A., Panzani, D., Sabatini, C., Camillo, F. (2012). Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility donkey jennies. *Theriogenology*, 20; 1-9
- Spizziri, B. E., Fox, M. H., Bruemmer, J. E., Squires, E. L, y Graham, J. K. (2010). Cholesterol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallions. *Journal of Animal Reproduction Science*, 118; 255- 264

- Quartuccio, D., Marino, G., Zangui, A., Garufi, G. y Cristarella, S. (2011). The testicular volume and sperm production in the daily donkeys Ragusano. *Equine Veterinary Journal*, 31; 143-146
- Taberner, E., Medrano, A., Peña, A., y Miró, J. (2008). Characteristics of o estrus and ovulation prediction in Catalan jennies. *Theriogenology*. 10; 1489-1497
- Taberner, E. (2010). *Tecnologías reproductivas aplicadas a la conservación del burro Catalan [Tesis doctoral]*, Barcelona, Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Medicina y Cirugía Animal
- Taberner, E., Morató, R., Mogas, T., Miró, J. (2010). Ability of catalonian donkey sperm to penetrate zona pellucide- free bovine oocytes matured in vitro. *Animal Reproduction Science*, 118; 354-361
- Trimeche, A., Renard., Le Lannou, D., Barriere, P., Tainturier, D. (1996). Improvement of motility of post-thaw Poitou jackass sperm usin glutamine. *Theriogenology*, 45; 1015-1027
- Trimeche, A., Anton, M., Renard, P., Gandemer, G., Tainturier, D. (1997). Quail egg yolk: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryopreservation*, 34, 385-393.
- Trimeche, A., Renard., Tainturier, D. (1998). A procedure for Poitou Jackass sperm cryopreservation. *Theriogenology*, 55: 783-806.
- Varner, D.D. (2008). Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*, 70, 448-462.
- Vidament, M., Vincent, Pierrick, V., Martin, F., Magistrini, M., Blesbois, E. (2009). Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Journal Animal Reproduction Science*, 112; 22-35