



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA
INFLAMATORIA ENDOMETRIAL EN
BURRAS DESPUÉS DE LA INSEMINACIÓN
ARTIFICIAL CON DOS
CRIOPRESERVADORES CON Y SIN SEMEN**

TESIS

Que para obtener el título de
Médico Veterinario Zootecnista

P R E S E N T A

Angeles Ndaniye Rodríguez Vizcarra

DIRECTOR(A) DE TESIS

MVZ Ana Myriam Boeta Acosta

MVZ Elizabeth Morales Salinas



Ciudad Universitaria, Cd. Mx. a 1 Noviembre 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Todo este esfuerzo esta dedicado a mi mamá Yolanda, eres una mujer fuerte y luchadora que ha dado todo para nosotros, nos has llenado de valores y fuerzas para luchar por cada uno de nuestros sueños. Me has apoyado hasta en mis peores locuras, gracias a eso has permitido que llegue hasta aquí y hoy puedo decir que no solo soy feliz sino que además soy una persona de bien que tiene bastante claro lo que quiere en su vida. Te amo y y gracias por ser tan increíble, nunca me alcanzara la vida para agradecer todas y cada una de las cosas que haces y que seguramente continuarás haciendo por mi, este y absolutamente todos mis logros son y serán siempre en tu honor.

A mí pareja Hugo, gracias por ser mi compañero, amigo y cómplice en todo momento, por tu apoyo incondicional e invaluable que me has ofrecido desde que nos conocimos, gracias por ser parte de mi vida, por nunca dudar que lo lograría, por darme ánimos los días en que estuve a punto de rendirme, por estar siempre a mi lado para luchar contra las adversidades que se presentaron en este camino. Te amo por estar aquí a pesar de todo

A mi hermano Luis Mario, quien me demostró que no podría haber tenido un hermano mejor, gracias por estar siempre presente, acompañandome y por el apoyo moral que me has brindado a lo largo de esta etapa de mi vida.

Y a toda mi familia gracias porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mi una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas, gracias por estar siempre al pendiente mío, cuidarme, apoyarme, por siempre impulsarme a ser mejor y lograr con éxito mi carrera

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por ser mi segundo hogar, por brindarme la oportunidad de crecer y formarme, por los maravillosos académicos que me han brindado los conocimientos, las oportunidades y las experiencias que me ha permitido vivir y que me han ayudado en mi formación tanto profesional como personal.

A mi madre, mi hermano, mi abuelita, mis tías, mi familia, por ser siempre el motor que impulsa mis sueños y esperanzas, por estar dispuestos a acompañarme cada larga y agotadora noche de estudio, por siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida, gracias por cada consejo y por cada una de sus palabras que me guiaron durante mi vida.

A mi pareja la ayuda que me has brindado ha sido sumamente importante, estuviste a mi lado en los momentos y situaciones más difíciles, siempre ayudándome y motivándome, muchas gracias

Quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento a la Dra. Myriam Boeta que me dio la oportunidad para hacer este maravilloso proyecto, lo que también me ayudó a investigar mucho y llegué a conocer muchas cosas nuevas y por haberme guiado en la elaboración de esta tesis. Le agradezco especialmente a la Dra. Elizabeth Morales quien por su enorme paciencia durante la realización de la tesis, su conocimiento, enseñanza, colaboración y apoyo brindado en la obtención de los resultados permitió el desarrollo de este trabajo. Al Dr. Luis Zarco por la ayuda con el análisis estadístico de los datos presentados.

Al equipo de reproducción equina: Mari, Moni, Herme, Laura, SS y estancias, que me han apoyado y ayudado para que mi trabajo se realizara con éxito.

Gracias a mis amigos, que están conmigo siempre dándome la fuerza para continuar

Y a todas las personas que no están mencionadas pero que sin su apoyo no hubiera sido posible este trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	4
SITUACIÓN ACTUAL DE LA POBLACIÓN ASNAL.....	4
<i>Sector económico.....</i>	<i>4</i>
<i>Sector social.....</i>	<i>5</i>
ANATOMÍA REPRODUCTIVA DEL BURRO.....	6
<i>Anatomía de la hembra.....</i>	<i>6</i>
Ovarios	6
Ovidutos	7
Cuernos uterinos.....	8
Útero.....	8
Cérvix	10
Vagina	10
Labios vulvares	10
<i>Anatomía del macho</i>	<i>10</i>
Glándulas accesorias	10
Ducto deferente	11
Epidídimo	12
Uretra.....	12

Testículos	12
Pene	12
EL CICLO ESTRAL	14
<i>Época ovulatoria</i>	14
Estro	14
Diestro	15
ÉPOCA ANOVULATORIA	15
COMPORTAMIENTO SEXUAL.....	16
<i>Hembra</i>	16
<i>Macho</i>	16
COLECCIÓN DE SEMEN Y PARÁMETROS SEMINALES EN EL BURRO ..	17
CRIOPRESERVACIÓN.....	17
<i>Antecedentes de la criopreservación del semen de burro</i>	18
<i>Diluyentes</i>	20
Botucurio®.....	21
Diluyente elaborado en el área de reproducción equina del Departamento de Reproducción, FMVZ de la UNAM.....	22
INSEMINACIÓN ARTIFICIAL	24
ENDOMETRITIS.....	26
<i>Causas infecciosas</i>	26
Endometritis bacteriana.....	26
Endometritis fúngica	27
<i>Endometritis post-servicio</i>	27

Interacción espermatozoide-útero	30
Interacción diluyente-útero	33
CITOLOGÍAS ENDOMETRIALES	34
<i>Métodos de tinción</i>	36
<i>Evaluación e interpretación</i>	36
JUSTIFICACIÓN.....	41
HIPÓTESIS	41
OBJETIVO GENERAL	41
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
MATERIAL Y MÉTODOS	42
ANIMALES Y TRATAMIENTOS.....	42
CITOLOGÍAS ENDOMETRIALES	44
ESTADÍSTICO	44
RESULTADOS.....	45
PORCENTAJE DE PMN EN LOS TRATAMIENTOS	45
DURACIÓN DE LA INFLAMACIÓN.....	45
COMPARACIÓN ENTRE TINCIONES	47
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIÓN.....	52
ANEXO 1.....	53
REFERENCIAS	54

CONTENIDO DE CUADROS Y GRÁFICAS

CUADRO 1: Comparación de los valores nutricionales de la leche de burra, de vaca y de mujeres	6
CUADRO 2: Comparación de los parámetros seminales en burros y caballos	17
CUADRO 3: Composición del diluyente Botucurio® y el diluyente elaborado en la FMVZ de la UNAM	20
CUADRO 4: Porcentaje de fertilidad en burras con semen congelado de burro en diferentes estudios.....	25
CUADRO 5: Células que se pueden observar en un frotis con el aumento 400x y su interpretación	38
CUADRO 6: Clasificación de la respuesta inflamatoria endometrial	40
GRÁFICA 1: Gráfica que representa el promedio del %PMN a lo largo de las horas de toma de muestra de cada uno de los tratamientos	45
GRÁFICA 2: Representa la media \pm error estándar del %PMN por hora y por tratamiento.	46
CUADRO 7: Valores promedio del porcentaje de células pmn encontradas en los frotis de las burras que recibieron cada uno de los tratamientos.....	47
GRÁFICA 3: Análisis de regresión entre los valores obtenidos al utilizar las tinciones de diff quick o papanicolau.	47
CUADRO 9: Comparación de los valores obtenidos en todos los tratamientos en las citologías (%PMN) y lo encontrado en el ultrasonido (USG)	53

CONTENIDO DE FIGURAS

FIGURA 1: Vista lateral izquierda del aparato genital de una burra.....	7
FIGURA 2: Oviducto de una burra.....	8
FIGURA 3: Vista dorsal del aparato genital en una burra.....	9
FIGURA 4: Comparación de dos úteros	9
FIGURA 5: Vista lateral derecha del aparato genital en un burro	11
FIGURA 6: Vista lateral del testículo en un burro.....	13
FIGURA 7: Comportamiento sexual en burros	16
FIGURA 8: Línea del tiempo de los criopreservadores usados en el semen de burro.	19
FIGURA 9: Endometritis post-inseminación.....	32
FIGURA 10: Citología endometrial de zahira a las 12hrs post-ia con semen fresco, teñida con papanicolau	40
FIGURA 11: Citología collarina	48
FIGURA 12: Citología domino.....	48

RESUMEN

RODRIGUEZ VIZCARRA ANGELES NDANIYE. Respuesta inflamatoria endometrial en burras después de la inseminación artificial con semen congelado y su efecto en la fertilidad (bajo la dirección de MVZ Ana Myriam Boeta Acosta y MVZ Elizabeth Morales Salinas).

Las tasas de fertilidad obtenidas por inseminación artificial (IA) con semen congelado es de 0 – 60% en las burras (Fanelli et al, 2022; Oliveira et al. 2006; Rota et al. 2012; Vidament et al. 2009). La baja fertilidad con semen criopreservado podría deberse a la respuesta inflamatoria exacerbada en el útero de las burras. (Miro et al. 2013). Se sabe que los diluyentes ocasionan una respuesta inflamatoria considerable en el útero de la yegua, pero al agregar semen al diluyente se observa una disminución en la respuesta inflamatoria, sin embargo, no hay estudios que confirmen si esto ocurre en las burras.

El objetivo general de esta tesis fue evaluar el uso de dos diluyentes de criopreservación con y sin semen de burro sobre la respuesta inflamatoria endometrial post IA. Para el presente estudio se usaron 8 burras criollas adultas con fertilidad probada, todas fueron inseminadas con los seis tratamientos diferentes, estos fueron administrados por inseminación artificial profunda (IAP), el volumen que se uso fue de 2ml, lo equivalente a 4 pajillas, en el caso de los tratamientos que contienen semen cada pajilla contenía 200×10^6 spmz, usando una dosis inseminante total de 800×10^6 spmz, los tratamientos fueron agua desionizada (AD), Botucurio® (B), lipoproteínas de baja densidad (LDL), semen fresco (S), lipoproteínas de baja densidad con semen (LDLS) y Botucurio® con semen (BS) y para evaluar la inflamación endometrial se realizaron citologías con cepillo citológico a las 0hrs antes de la IA, a las 8, 12, 24 y 48 post-IA. En los resultados obtenidos en este estudio se observa que el empleo del diluyente sin semen causó un mayor %PMN (LDL 36%PMN Y B 43%PMN), teniendo una diferencia significativa con el diluyente con semen (LDLS 25.3%PMN Y B 26.9%PMN) por lo que se confirma la hipótesis que dice que el uso de un diluyente con semen va a modular la respuesta inflamatoria en el endometrio de las burras y se observó que la presencia de un líquido en el útero provoca una mayor quimioatracción de PMN. En conclusión los diluyentes en conjunto con el semen modulan la respuesta inflamatoria uterina.

INTRODUCCIÓN

El burro se considera un símbolo de trabajo, fuerza y nobleza; sin embargo, si no se toman medidas para su conservación podría ser una especie que desaparezca en los próximos años. En el mundo, según datos de la FAO en el 2014 indicaban que la población mundial anual era de 43,230,790. En México en los años 70's, había 3.2 millones, para 1991 esa cifra había disminuido a 1.5 y en el último censo del 2007 se registraron tan solo 581 mil animales. No obstante, en algunos países como España, Italia y México, han ido ganando importancia como animal de compañía y de trabajo; sin embargo, los protocolos de criopreservación e inseminación artificial (IA) que se siguen hasta el momento han sido diseñados para la yegua y no para la burra, por tal motivo los resultados son poco consistentes.

En la burra las tasas de fertilidad obtenidas por IA con semen fresco oscilan entre 51 y 73% (Marianelli et al. 2009; Oliveira et al. 2012) con semen refrigerado entre 26 y 45% (Álvarez et al. 2004; Vidament et al. 2009) mientras que con congelado la fertilidad cae drásticamente del 0 - 36% (Oliveira et al. 2006; Rota et al. 2012; Trimeche et al. 1998; Vidament et al. 2009). La baja fertilidad con semen criopreservado podría deberse a la respuesta inflamatoria exacerbada en el útero de las burras, posiblemente por el efecto del diluyente y/o del semen descongelado (Miro et al. 2013), o también podría deberse a las características anatómicas de la burra, ya que tiene un cérvix más largo y tortuoso que protruye hacia la vagina lo que predispone a una acumulación de líquido y al desarrollo de una endometritis post-inseminación (Pugh et al. 2002; Tibary et al. 2006; Viles et al. 2013).

El semen depositado, desencadena la quimiotaxis de los polimorfonucleares (PMN), además de la expresión de citocinas poco después de la inseminación (Troedsson et al., 2001a; Rozeboom et al., 2001; Matthiis et al., 2003; Gorgens et al., 2005; Eisenbach et al., 2003). La endometritis post monta es la respuesta fisiológica del endometrio, que facilita la fagocitosis y eliminación de contaminantes como bacterias, plasma seminal, diluyentes y espermatozoides no viables; dicha respuesta inflamatoria tiene una duración que varía desde las 6 horas hasta las 10 horas (Troedsson et al. 2001a).

Las características del semen congelado, tales como: la ausencia de plasma seminal y la adición de crioprotectores como el glicerol (GLY), aumentan los riesgos de una inflamación endometrial (Kazim et al. 2004; Gorgens et al. 2005). En equinos se ha demostrado que concentraciones mayores al 3.5% de GLY, puede ser tóxico para los espermatozoides y afectar los porcentajes de fertilidad (Samper & Garcia, 2008), también se ha observado que los espermatozoides de los burros tienen una mayor sensibilidad al efecto tóxico de este diluyente (Alvarenga et al. 2005; Vidament et al. 2009). En la última década, algunos autores han demostrado una mayor eficacia de la dimetilformamida (Alvarenga et al. 2000a; Alvarenga et al. 2005; Gomes et al. 2002; Medeiros et al. 2002;) y el dimetilsulfóxido (DMSO) (Chenier et al. 1998), en la criopreservación de semen equino.

Desde hace unos años en el departamento de reproducción animal de la FMVZ-UNAM desarrollamos un diluyente de criopreservación para semen de garañón; el cual está elaborado a base de DMF (sustituyendo al GLY) y lipoproteínas de baja densidad (LDL), teniendo muy buenos resultados en los parámetros espermáticos postdescongelado (Bravo, 2011). Por lo que se pensó en utilizar dicho diluyente en la criopreservación de espermatozoides de burro, lo que podría disminuir la toxicidad y la reacción inflamatoria exacerbada sobre el endometrio de la burra (Hu et al., 2010; Jian-Hong et al., 2011).

MARCO TEÓRICO

SITUACIÓN ACTUAL DE LA POBLACIÓN ASNAL

Los burros han sido útiles para la humanidad a lo largo de 5000 años (Rosel et al., 2008). La frase 'bestias de carga' describe su utilidad y resistencia como animales de carga y (Mrema, 2014) en muchas partes del mundo representan un importante papel económico y social siendo de gran utilidad en el transporte de agua, materiales de construcción y alimentos para ellos y otros animales (Barzev, 2004; Mrema, 2014).

A principios de siglo XX, existían aproximadamente un millón de ejemplares, siendo las décadas de los años 60 y 70 cuando se produce el gran descenso de los asnos, y de los équidos en general, siendo la intensa mecanización del sector agrícola la causa principal. En las últimas 4 décadas en México se ha observado un descenso dramático de la población asnal; en 1970, había 3.2 millones de cabezas en unidades de producción rural (SIC. Dirección General de Estadística, 1975) y según los últimos registros, en 2007 se tuvo tan solo 581 mil cabezas (INEGI, 2007); mientras que los continentes que cuentan con mayor número de cabezas de ganado de asnos, son África y Asia, seguido de América del Sur (CEAM, 2014)

Sector económico

La conservación de razas en peligro de extinción representa una ventaja muy importante para aplicar la biotecnología reproductiva en los burros, ya que, por ejemplo, durante el siglo XX, tan solo en Europa, disminuyó hasta el 80% de su población (Save foundation, 2013), así como en China, que decreció de 9.56 a 5.42 millones de cabezas entre 1998 y 2015 (Wu, 2017). En Europa Central, los burros son vistos principalmente como un animal de uso recreativo y en ocasiones sirven de apoyo en programas de terapia con animales.

También se ha observado un aumento en la demanda de leche de burra y sus subproductos junto con la de los productos cárnicos que se comercializan en los mercados gourmet y como productos dietéticos específicos (Kugler et al. 2008). Según datos de la FAO, las importaciones en América Latina de asnos vivos, lo ocupa México, con el mayor número de importaciones con 7 toneladas, seguido de Colombia con 2 y finalizando con Honduras que reporta 1 tonelada (CEAM, 2014).

Los burros se han utilizado en México desde su introducción en el siglo XV por los conquistadores y son conocidos por su excepcional capacidad de supervivencia, longevidad, bajo costo, resistencia física, docilidad, paciencia y bajos requisitos de manejo (Burden et al., 2009; Kugler et al., 2008; Mattioli, et al., 1994; Musa 1998). Los équidos de trabajo son muy importantes, con una población estimada de 581 mil cabezas (INEGI, 2007) y contribuyen significativamente a la economía rural siendo éste un sector de la población que depende de la tierra para sobrevivir.

Sector social

Durante la última década, la investigación se ha dirigido hacia las propiedades y usos de la leche de burra ya que tiene una composición química distinta y propiedades nutricionales particulares, similares a la leche de la mujer, que difiere principalmente en un menor porcentaje de grasa y, por lo tanto, presenta un valor energético reducido (Dugo et al., 2005; Guo et al. 2007, Valle et al., 2018). En Grecia y Chipre, existen informes etnográficos sobre el uso de la leche de burra para alimentar a los bebés, ya sea como reemplazo de la leche de la mujer o para tratar enfermedades como la tosferina (Tidona et al. 2011).

Al poseer características bioquímicas muy parecidas a la leche de las mujeres se le ha considerado como una fuente de alimentación alternativa en niños con alergia a la proteína de la leche de vaca, que afecta aproximadamente al 3% de los niños menores de 3 años, la leche de burra es hipoalergénica debido principalmente al bajo contenido de caseína (Carroccio et al., 2000; Lara-Villoslada et al., 2005; Monti et al. 2007; Restani et al. 2009; Sampson, 2004). También es considerada como "alimento farmacéutico" porque posee características antibacterianas (Zhang et al. 2008), antivirales (Brumini et al. 2013), antiinflamatorias (Jirillo y Magrone 2014), antiproliferativas y efectos antitumorales (Mao et al. 2009), que la hacen diferente de la leche de otros mamíferos.

Estudios anteriores han demostrado que los efectos inhibidores microbianos de la leche de burra se deben a sus altas concentraciones de agentes antimicrobianos como la lisozima y la lactoferrina (Tidona et al. 2011; Vincenzetti et al. 2008).

La literatura sugiere que la leche de burra contiene menos grasa y proteína pero más lactosa, en comparación con la leche de vaca (Salimei y Fantuz 2012). En el Cuadro 1 se encuentran los valores nutricionales de la leche de burra que se han obtenido en algunas investigaciones, y se comparan con los valores en mujeres y vacas:

Cuadro 1: Comparación de los valores nutricionales de la leche de burra, de vaca y de mujeres

COMPOSICIÓN	VALORES EN BURRAS*	VALORES EN MUJERES**	VALORES EN VACAS**
Sólidos totales	8-10 g / 100 ml	12.57 g / 100 ml	12.8 g / 100 ml
Proteína	1.5-1.8 g / 100 ml	1.2 g / 100 ml	3.3 g / 100 ml
Lactosa	6-7 g / 100 ml	7.0 g / 100 ml	4.8 g / 100 ml
Caseína	0.6 g / 100 ml	0.4 g / 100 ml	2.8 g / 100 ml
Grasa	0.28-1.82 g / 100 ml	3.8 g / 100 ml	3.7 g / 100 ml
Lisozima	0.1 g / 100 ml	0.005 g / 100ml	Trazas

* Guo et al. 2007; Piccione et al. 2008; Salimei et al. 2004; Saric et al. 2012; Tidona et al. 2011

** Bidot, 2017; Guo et al. 2007; Guzmán e Ilabaca, 2007

ANATOMÍA REPRODUCTIVA DEL BURRO

Anatomía de la hembra

Anatómicamente la burra es muy similar a la yegua en muchos aspectos reproductivos. A continuación se especificarán las diferencias anatómicas del aparato reproductivo en la burra empezando de craneal a caudal (Figura 1 y 4)

Ovarios

Los ovarios se encuentran ventralmente al nivel de la cuarta y quinta vértebra lumbar (Figura 1), ligeramente más craneales en comparación con las yeguas, las dimensiones de los ovarios varían entre 33 y 54 mm de longitud y 19 y 41 mm de ancho, tienen forma de frijol, la corteza se encuentra internamente, mientras que la médula se ubica en la parte externa; tienen una fosa de ovulación en su borde libre y están suspendidos por el mesovario (Figura 2) (Nishikawa y Yamasaki 1949; Renner et al. 2009). El tamaño promedio del folículo preovulatorio depende de la raza: de 30 a 33 mm en el Poitou y de 35 a 40 en el Pega y el Mamut (Tibary et al., 2006).

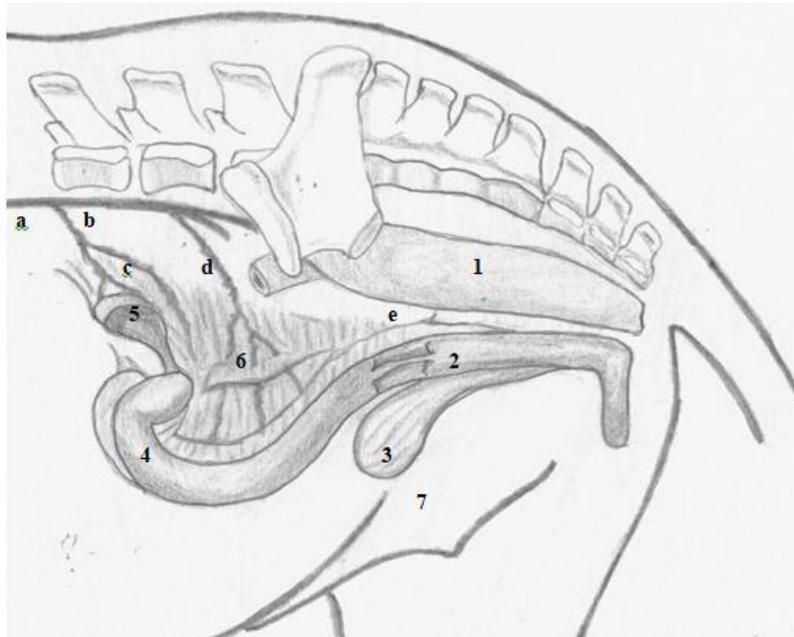


Figura 1: Vista lateral izquierda del aparato genital de una burra 1. Recto, 2. Vagina, 3. Vejiga, 4. Cuerno uterino, 5. Ovario izquierdo, 6. Ligamento uterino, 7. Glándula mamaria; a. Aorta abdominal, b. Arteria ovárica, c. Rama uterina de la arteria ovárica, d. Arteria uterina, e. Rama uterina de la arteria vaginal. Adaptado de Renner et al. 2009.

Ovidutos

Al igual que en las yeguas, los oviductos contienen el infundíbulo, ámpula e istmo. El infundíbulo tiene forma de embudo que conecta al ovario con el oviducto, su superficie está cubierta por fimbrias, las cuales captan al ovocito al momento de la fertilización. El infundíbulo conduce directamente a la porción delgada del oviducto llamada ámpula; en la yegua y la burra la unión de la ámpula con el istmo sirve de punto de control permitiendo solamente el paso de ovocitos fertilizados dentro del istmo. El istmo se conecta con el cuerno uterino mediante la unión útero tubárica, y actúa como reservorio espermático (Rangel, 2018; Renner et al. 2009). El oviducto ingresa al útero a través de la papila útero tubárica, la cual en el caso de las burras es más pequeña que en las yeguas (Figura 2).

En burras, el mesosalpinx es más ancho que en las yeguas, cubriendo el aspecto lateral del ovario como una cortina y formando una gran bolsa o bursa ovárica que es visiblemente más profunda que en las yeguas (Figura 3). Además, el ligamento ancho es tenso y distinto que en las yeguas, y presenta un gran apéndice, su morfología difiere sustancialmente en tres aspectos: debido a la

formación más amplia del mesosalpinx, la bolsa ovárica es más espaciosa en la burra y el apéndice craneal del ligamento ancho parece ser mucho más prominente (Renner et al. 2009).



Figura 2: Oviducto de una burra: 1. Infundíbulo, 2. Ámpula, 3. Istmo, 4. Unión útero-tubárica, 5. Papila útero tubárica. Tomado en CRE-UNAM

Cuernos uterinos

Los cuernos uterinos están situados a nivel de la quinta vértebra lumbar, las longitudes de los cuernos uterinos varían de 65 a 130 mm. Al igual que en las yeguas, el mesometrio está unido al contorno dorsal de los cuernos uterinos y dorso-lateralmente al cuerpo uterino, se origina en las paredes dorsolaterales de la cavidad peritoneal abdominal y pélvica. (Figura 1 y 3).

Útero

A diferencia de la yegua el útero de la burra tiene forma de Y, la luz del cuerpo del útero y los cuernos están colapsados (Figura 3 y 4).

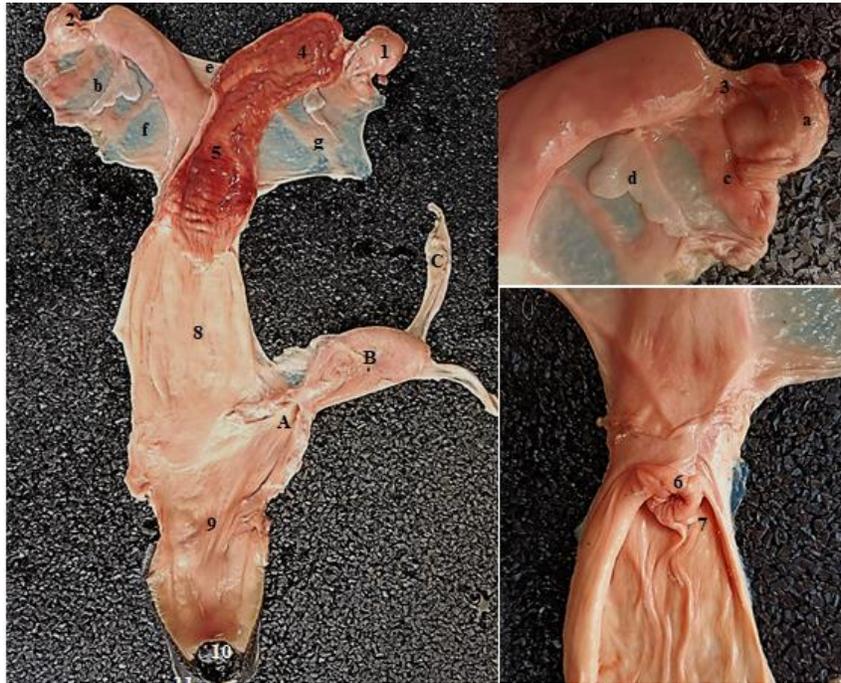


Figura 3: Vista dorsal del aparato genital en una burra: 1. Ovario, 2. Fosa de ovulación, 3. Oviducto, 4. Cuerno uterino, 5. Cuerpo del útero en donde se pueden apreciar los pliegues endometriales, 6. Cérvix, 7. Fórnix, 8. Vagina, 9. Vestíbulo vaginal, 10. Clítoris, 11. Vulva; A. Orificio uretral, B. Vejiga, C. Ureter; a. Mesovario, b. Mesosalpinx, c. Bursa ovárica, d. Apéndice del ligamento ancho e. Ligamento intercornual, f. Mesometrio, g. Arteria uterina. Tomado en CRE-UNAM



Figura 4: Comparación de dos úteros: A. Burra útero forma de Y, B. Yegua útero forma de T. Tomado en CRE-UNAM

Cérvix

El cuello uterino de la burra suele ser más largo que el de la yegua, con un diámetro más pequeño, pliegues longitudinales irregulares, en forma de cono que sobresale hacia la vagina formando un fórnix más profundo (Figura 3), esta protuberancia podría dificultar la IA provocando una mayor incidencia de adherencias cervicales post distocia, (Pugh et al. 2002; Tibary et al. 2006; Renner et al. 2009; Vendramini et al., 1998).

Vagina

La vagina en las burras es más ancha que en las yeguas, la cual está relacionada con la masa corporal, la porción craneal de la vagina conduce hacia el fórnix conectando con el cérvix, en la parte caudal conduce hacia el vestíbulo vaginal (Figura 3) (Renner et al. 2009).

Labios vulvares

Los labios vulvares forman el extremo caudal del tracto reproductivo, los cuales son más pequeños y por lo general muy estrechos y se encuentran por debajo del piso de la pelvis (Renner et al. 2009).

Anatomía del macho

Anatómicamente el burro es muy similar al caballo, con la diferencia que los órganos reproductivos del burro son más grandes, de acuerdo a su tamaño, como es el caso específico del glánde del pene que presenta una dilatación más pronunciada durante la erección y eyaculación (Figura 5) (Marcelo et al., 2018).

Glándulas accesorias

- **Ámpulas:** Las ámpulas son un ensanchamiento provocado por la proliferación glandular en la pared del ducto deferente, cuya función es producir una secreción mucoide y viscosa, rica en carbohidratos, que se adiciona al líquido seminal (Mai, 2014; Sisson et al., 1975)
- **Vesículas seminales:** tienen forma de pera, tienen un cuerpo y un cuello o conducto. Se ubican ventral al recto a unos 14-15cm y lateral al cuello de la vejiga y las ámpulas (Figura 5) (Mai, 2014; Mohamed y Anwar, 2017).

- **Próstata:** está compuesta de un istmo central y dos lóbulos laterales; cada uno es triangular con una superficie dorsal cóncava extendida a lo largo del borde caudo-lateral de las glándulas vesiculares, la secreción prostática es alcalina, y da el olor característico al semen (Figura 5) (Mai, 2014; Mohamed y Anwar, 2017)
- **Bulbouretrales:** son glándulas pares, de forma ovalada (Figura 5) (Mai, 2014), se localiza en la cara dorso-lateral de la uretra pélvica a unos 4 cm del ano y a 3 cm de la glándula prostática, su secreción es rica en mucina y se vierte en la uretra al momento de la eyaculación (Mohamed y Anwar, 2017).

Ducto deferente

Es un tubo que se extiende desde la cola del Epidídimo hasta la porción pelviana de la uretra, a través de él pasan los espermatozoides durante la eyaculación y antes de llegar a la uretra el diámetro del conducto aumenta, formando la ámpula (Figuras 5 y 6) (Mai, 2014)

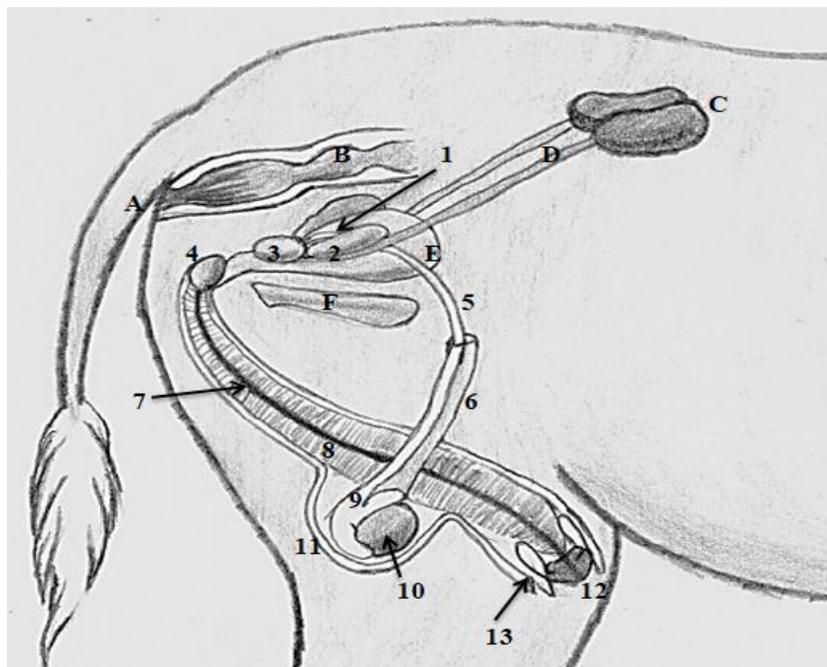


Figura 5: Vista lateral derecha del aparato genital en un burro: A. Ano, B. Recto, C. Riñones, D. Uréteres, E. Vejiga, F. Sínfisis pélvica, 1. Ámpula, 2. Vesículas seminales, 3. Próstata, 4. Glándula bulbouretral, 5. Ducto espermático, 6. Cordón espermático, 7. Uretra, 8. Pene, 9. Epidídimo, 10. Testículo, 11. Escroto, 12. Glante del pene. 13. Prepucio. Adaptado de Mai. 2014

Epidídimo

Es el órgano donde se lleva a cabo la maduración de los espermatozoides, el epidídimo contiene una cabeza, cuerpo y cola. La cabeza se localiza anteriormente al testículo y está adherido a éste por medio por medio de los conductos eferentes, tejido conectivo y la membrana serosa; el cuerpo descansa dorso lateralmente al testículo, al que se une por tejido seroso que forma lateralmente un saco llamado seno del epidídimo y la cola del se localiza en la parte posterior y está unida al testículo por su ligamento propio, esta se continúa con el ducto deferente (Figura 6) (Mai, 2014; Galotta, 2009).

Uretra

La uretra está formada de una porción pelviana seguida de la porción peneana. La porción pelviana comprende a su vez una porción pre prostática, esta sirve sólo como vía urinaria, y una prostática en donde desembocan los conductos deferentes y las glándulas accesorias (Figura 6) (Mai, 2014)

Testículos

Son pares, ovalados, globulares, ubicados en la región inguinal dentro del escroto, los testículos se encuentran envueltos en la túnica albugínea, seguida de una vaginal que se divide en visceral y parietal, y una capa fibroelástica de músculo liso llamada túnica dartos (Dyce et al., 1987) (Figura 5 y 6). El escroto, está conformada por una piel delgada escasamente peluda y con manchas de color gris y oscuro, es asimétrico cubriendo a los testículos; y la túnica dartos que se encuentra adherido a la piel, formado de tejido fibroelástico y fibras musculares estriadas y lisas que ayudan a la regulación de la temperatura de los testículos (Dyce et al., 1987; Mai, 2014). Los testículos y el epidídimo del burro son más pequeños y livianos, pesando aproximadamente la mitad de los de un caballo, además que el testículo izquierdo es más pesado (Dyce et al., 1987; Mai, 2014).

Pene

Está compuesto por una base, un cuerpo y un glande (Figura 5). Es un órgano músculo cavernoso que mide 36.3 ± 1.20 cm de largo y 5.0 ± 0.40 cm de diámetro cuando está relajado. El cuerpo está aplanado lateralmente en su mayor parte, pero se vuelve redondeado y más pequeño cranealmente.

El pene consta de los siguientes músculos: bulbo esponjoso que cubren toda la longitud del pene y se encuentra ventral a la uretra; cuerpo cavernoso; cuerpo esponjoso; y músculo retractor del pene que esta ventral al bulbo esponjoso. La túnica albugínea es un material blanquecino fibroso y grueso que cubre el cuerpo cavernoso. Las trabéculas en el burro atraviesan el interior del cuerpo cavernoso y el cuerpo esponjoso que encierra la uretra (Mai, 2014).

- **Glande:** el glande del burro es convexo de forma craneal y consiste en tejido blando, y el cuerpo esponjoso que está cubierto por una piel elástica. En medio del glande hay una constricción llamada cuello del glande que se extiende para formar la corona del glande. La fosa del glande se encuentra en la parte craneal media del glande, también se encuentra la apertura del orificio uretral externo y el proceso uretral (Figura 5) (Mai, 2014).
- **Prepucio:** es una porción de tejido epitelial y mucosa que rodea la porción craneal del cuerpo y el glande, posee una lámina externa, una interna y un pliegue prepucial para permitir la salida del pene y la orina (Figura 5). La lámina externa se introduce en la cavidad prepucial y continua como la lámina interna, en donde se encuentran las glándulas productoras de esmegma (Konin y Liebich, 2011; Mai, 2014).

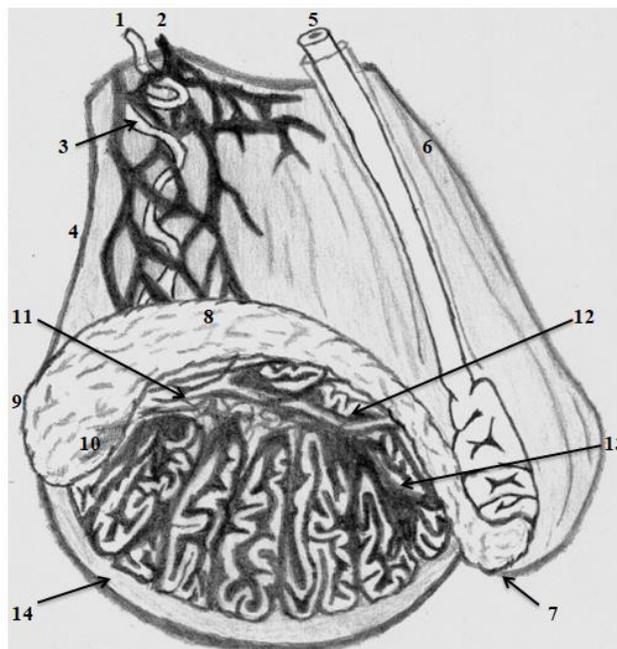


Figura 6: Vista lateral del testículo en un burro: 1 Arteria testicular, 2. Vena testicular, 3. Plexo pampiniforme, 4. Túnica vaginal visceral, 5. Ducto deferente, 6. Túnica vaginal parietal, 7. Cola del epidídimo, 8. Cuerpo del epidídimo, 9. Cabeza del epidídimo, 10. Conducto eferente, 11. Red testicular, 12. Túbulos seminíferos contorneados, 13. Túbulos seminíferos rectos, 14. Túnica albugínea. Adaptado de Mai, 2014.

EL CICLO ESTRAL

Época ovulatoria

En el caso de las burras la pubertad se alcanza generalmente dentro del primer o segundo año de vida y la duración del ciclo estral es ligeramente más larga que la de la yegua entre 23 a 24 días, con una variación de 13 a 31 días. La burra presenta un estro que dura entre 6 a 9 días y un diestro de 16 a 17 días. La burra es poliéstrica estacional aunque muestran menos estacionalidad que las yeguas (Blanchard et al., 1999; Contri et al., 2014; Ferlding 1988; Ginther, 1987; Pugh, 2002; Tibary et al. 2006).

Estro

El estro suele durar entre 6 a 9 días y la ovulación tiene lugar durante las últimas 24 horas de este periodo (Ferlding 1988; Tibary et al. 2006; Vandeplassche et al., 1981). La dominancia folicular se establece cuando se encuentran folículos mayores a 25mm. Vandeplassche et al., (1981) determinó que el diámetro del folículo más grande comienza a aumentar significativamente 7 días antes de la ovulación, con un promedio de crecimiento folicular de 2.7mm por día, también se observa un engrosamiento gradual de la pared folicular y un cambio en la forma folicular de circular a irregular, a medida que la ovulación se acercaba, similar a los cambios que ocurren en los folículos dominantes en yeguas que se aproximan a la ovulación (Dadarwal et al., 2004). Lemma et al (2006) observaron que aproximadamente el 80.5% de los folículos pre-ovulatorios (> 20 mm) cambiaron su forma de esférica a ovalada, irregular o elipsoidal antes de la ovulación, el 19,5% restante continuaba con forma esférica.

El tamaño promedio del folículo preovulatorio puede depender de la raza: de 30 a 33 mm en el Poitou y de 35 a 40 (39,4 mm) en la raza Pega y el Mamut (Lun et al., 1998). En algunos estudios (Arthur, 2001; Derar y Hussein, 2011; Purdy 2005; Taberner et al., 2008) encontraron que la ovulación ocurre en algunas ocasiones con más frecuencia en el ovario izquierdo que en el derecho.

En algunas razas se ha notificado una incidencia de ovulaciones dobles y múltiples. La incidencia de ovulación múltiple generalmente varía dependiendo de la raza, por ejemplo en las razas gigantes como Mamut puede alcanzar hasta un 61%. En las burras, la mayoría de las ovulaciones dobles (75%) son asincrónicas, con un intervalo entre ovulaciones que van de 1 a 4 días en general y hasta 11 días en algunos casos y con una tasa de ovulación de 26.4% en primavera y de 19.5% en verano, otoño e invierno (Li et al., 2020).

Diestro

El período inter ovulatorio o diestro es significativamente más largo en burras que en las yeguas (Ginther et al, 1987; Meira et al., 1995; Vandeplassche et al., 1981). El diestro dura en promedio 18 días con una variación entre 17 a 20 días, en las razas estándar tiene una duración en promedio de 19 a 20 días y en las razas gigantes de 17 a 20 días (Blanchard et al., 1999; Vandeplassche et al., 1981).

ÉPOCA ANOVULATORIA

La época anovulatoria en burras tiene una duración promedio de 137 ± 7 días, la temporada de transición de otoño ocurre del 1° de octubre al 30 de noviembre y la transición de primavera del 1° de marzo al 8 de abril (Atayde y Rocha 2011; Li et al., 2020; Quaresma et al., 2015); sin embargo, las burras pueden ciclar durante todo el invierno (Blanchard y Taylor, 2005). En general, se ha observado que la función reproductiva se ve menos afectada por la época del año en burras que en yeguas (Blanchard et al 1999). En Brasil se ha observado una estacionalidad marcada (54%), en la cual la época ovulatoria dura 199 ± 63 días y la época anovulatoria dura 166 ± 63 días (Tibary et al., 2006).

COMPORTAMIENTO SEXUAL

Hembra

El comportamiento durante el estro en las burras se ha caracterizado por diferentes gestos y posturas como es el caso del “boqueo” el cual consiste en abrir y cerrar la boca, ocasionalmente con el cuello extendido, salivación, espejeo, micción, levantamiento de la cola y orejas hacia atrás (Figura 7b), este comportamiento persiste unas pocas horas después de la ovulación y al igual que en vacas, en burras es común observar la homotipia entre hembras (Figura 7a) (Blanchard y Taylor, 2005; Clayton et al., 1981; Ferlding, 1988; Fielding, 1988; Henry et al., 1987; Tibary y Bakkoury, 1994; Tibary et al., 2006).



Figura 7: Comportamiento sexual en burros: a) Homotipia en la burra que monta y boqueo en la que se deja montar ; b) Intentos de monta del macho sin erección con una burra en estro. Tomado en CRE-UNAM

Macho

El comportamiento sexual en el semental burro es ligeramente diferente al caballo, son más territoriales, sobre todo cuando las hembras están en estro, este comportamiento incluye vocalización, contacto naso-nasal, olfateo de la vulva, signo de flehmen, mordisquean los flancos de la hembra, olfatean la cabeza, el cuello, el cuerpo, flancos, el perineo y la cola de la burra (Tibary et al. 2006). Algunos llegan a mostrar varios intentos de monta antes de lograr una erección y eyaculación (Figura 7b), llegando a tardar entre 5 a 30 minutos en la respuesta copulatoria, lo que es bastante largo en comparación con los 10 minutos que requieren los caballos (Pugh et al, 2002).

COLECCIÓN DE SEMEN Y PARÁMETROS SEMINALES EN EL BURRO

Al igual que en caballos la colección de semen se realiza con la vagina artificial, con la diferencia de que pueden llegar a tardar hasta 30 minutos para lograr una erección, comparado con el caballo que es de 10 minutos, una vez que se logra la erección tardan en eyacular de 6 a 12 segundos. En el cuadro 2, se muestran los valores de los parámetros seminales que se obtienen en el burro y en el caballo (Tibary et al, 2006).

Cuadro 2: Comparación de los parámetros seminales en burros y caballos

PARÁMETROS SEMINALES	BURRO*	CABALLO**
Volumen libre de gel	25 – 70 ml	30 - 300 ml
Ph	7 – 7.8	7.2 - 7.7
Color	Blanco aperlado	Blanco aperlado
Motilidad total	80 – 95 %	93 – 95 %
Motilidad progresiva	90%	75 – 82 %
Viabilidad	80 - 88 %	80 – 85 %
Concentración	200 – 500 x 106 spmz	150 – 300 x 106 spmz

*Dorado et al., 2013; Miro et al., 2009; Matthews & Taylor, 2005; Taberner et al., 2009

** Ball, 2014; Restrepo et al., 2013.

Los burros no se ven afectados por la estacionalidad, observándose poca o ninguna alteración en los parámetros seminales en la época de invierno (Miragaya et al., 2018).

CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación es una técnica mediante la cual los espermatozoides pueden ser mantenidos viables a bajas temperaturas (-196 °C), generando una disminución de su metabolismo celular hasta una etapa de inactividad celular, por tiempo indefinido (Hafez y Hafez 2000; Ramos, 1996; Watson y Morris 1987). Sin embargo, la calidad del semen descongelado es menor que la del semen fresco, debido a que durante este proceso el espermatozoide sufre cambios en la estructura e integridad de su membrana por el choque térmico, estrés osmótico y la formación de cristales de hielo, observándose una notable disminución en la tasa de fertilidad (Peña et al., 2011). Para

disminuir el daño a los espermatozoides durante la criopreservación es necesario agregar diluyentes que van a proteger a los espermatozoides durante dicho proceso (Moore et al., 2006).

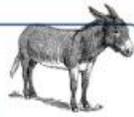
Antecedentes de la criopreservación del semen de burro

En la línea del tiempo (figura 6) se mencionan varios estudios que han usado diferentes diluyentes para criopreservar el semen de burro a lo largo de la historia con el objetivo de mejorar la motilidad post descongelación.

Podemos observar que en el caso de los burros, a diferencia de los caballos, desde 1964 han utilizado GLY en combinación con otros crioprotectores observando buenos resultados en la motilidad post descongelación, pero el uso de la las LDL junto con otros crioprotectores, como el GLY o amidas, se observó un incremento en la motilidad post descongelación; sin embargo, Montoya et al. (2017) observaron que al agregar plasma seminal (PS) post descongelación se obtienen mejores resultados de motilidad total (64.32%). En un estudio reciente (Álvarez et al., 2019) utilizaron el calostro de burra como diluyente de congelación observando una mejoría en la motilidad post descongelación (58.3%).

Las técnicas actuales empleadas para criopreservar el semen de burro se basan en metodologías de congelación y diluyentes que se emplean para criopreservar el semen de los caballos (Canisso *et al.*, 2008; 2010); por lo que, es necesario realizar más estudios sobre los diluyentes o incluso encontrar otras alternativas de diluyentes como lo hicieron Álvarez et al. (2019) con el objetivo de obtener una mejor calidad post descongelación en el semen del burro y un aumento en el porcentaje de fertilidad en las burras.

1967 Krause y Grove



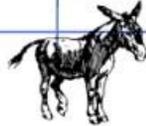
Utilizaron diluyentes a base de glucosa, lactosa y rafinosa con yema de huevo (YH) y glicerol (GLY) siguiendo la metodología de criopreservación de bovino de Nagase y Niwa (1964) obteniendo motilidad total de 50-70%

1996 Trimeche



Se evaluaron 4 burros de la raza Poitou, se utilizó como diluyente de criopreservación L-glutamina+4% GLY + 2% YH de codorniz, observando una mejoría en la motilidad post-descongelación obteniendo mejor porcentaje de motilidad total (40.2%) con glutamina 80mM

1998 Trimeche



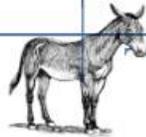
Se evaluaron 4 burras de la raza Poitou adicionó yema de huevo de codorniz en un medio que contenía 4% de GLY, observando una mejora en la motilidad total (53.4%) , sin embargo para poder inseminar a las burras es necesario eliminar el GLY

2011 Canisso et al



Se evaluaron 5 burros de la raza Pega los diluyentes de criopreservación que utilizaron fueron Lactosa EDTA y Lactosa-yema, concluyendo que no había ninguna diferencia significativa en la evaluación de los parámetros seminales de ambos diluyentes con una motilidad total de 37%

2017 Bottrel et al.



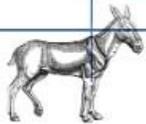
Se congelo el semen de 6 burros Andaluces usando como crioprotector glutamina, prolina y taurina, observaron que la suplementación con glutamina o taurina mejoró el % de motilidad total (51.8 y 49.8% respectivamente), integridad del acrosoma y DNA postdescongelación

2017 Montoya et al.



Se criopreservo el semen de 5 asnos criollos con 3% GLY; 5% dimetilformamida (DMF); 2-5% YHC y 10-20% PS. Concluyeron que el uso de YHC y PS mejoró el % de motilidad total de (64.32%), vitalidad y la integridad de la membrana

2017 Diaz et al.



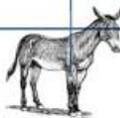
Se evaluaron 5 burros Andaluces, primero se utilizo un diluyente comercial sin diluyentes permeables a base de YH adicionado con 1% de albúmina suero bovino (BSA) + sacarosa; y después se usaron los mismos diluyentes resuspendido con GLY, obteniendo mejores resultados con 0.25M de sacarosa + 1% BSA con un porcentaje de motilidad total de 45.8%

2018 Ferrante et al.



Se criopreservo el semen de 4 asnos criollos con los tratamientos: 1) Kenney + 20%YH; 2) Kenney +20% YH centrifugado; 3) EDTA + Glucosa+ 20% YH; 4) EDTA-Glucosa+20% YH centrifugado, y todos contenían 7% DMF, Concluyeron que el uso de YH centrifugado tuvo efectos adversos sobre la motilidad, en cambio al ser agregado el YH al diluyente se obtuvo una motilidad total de 41% con Kenney y 40% con EDTA

2019 Alvarez et al.



Se evaluó el eyaculado de 5 burros y el calostro de burras y yeguas; se inseminó con: lactosa suplementado con YH; lactosa con calostro burra y lactosa calostro con yegua. Observaron que la calidad del semen mejoró en los grupos que estaban suplementados con calostro, y los mejores resultados se obtuvieron con el calostro de burra con una motilidad total de 58.3%

Figura 8: Línea del tiempo de los criopreservadores usados en el semen de burro.

Diluyentes

Los diluyentes para la criopreservación de semen, contienen sustancias como antibióticos, azúcares y sustancias crioprotectoras que permitan la supervivencia de los espermatozoides, mitigando los efectos negativos al congelar/descongelar, manteniendo la viabilidad, la actividad metabólica, regulación de pH, protección del choque térmico, buena presión osmótica, neutralizar toxinas y estabilizar la membrana celular así como incrementar el volumen de la dosis inseminante (Palacios, 1994; Pérez, 2006; Dietz, et al., 2007). Existen dos clases de crioprotectores:

- 1) Los permeables como el etilenglicol (EG), dimetilsulfoxido (DMSO), GLY y las amidas como la dimetilformamida (DMF), metilformamida (MF), entre las cuales, el GLY es posiblemente el crioprotector más empleado en la congelación del semen de équidos (Hoffmann *et al.*, 2011; Rota *et al.*, 2012). Dichos diluyentes, inhiben la formación de hielo intracelular y disminuyen la concentración de sales (Brum et al., 2008; Schober et al., 2007)
- 2) Los no permeables a la membrana celular, como los azúcares, LDL, leche en polvo descremada, yema de huevo (YH) suero y otras macromoléculas ayudan a estabilizar la membrana plasmática (Schober et al., 2007)

A continuación se mencionan los diluyentes que fueron utilizados en este trabajo y en el cuadro 3 se encuentra la composición de ambos diluyentes:

Cuadro 3: Composición del diluyente Botucurio® y el diluyente elaborado en la FMVZ de la UNAM

Botucurio®*		Diluyente elaborado FMVZ–UNAM	
GLY	1.00%	DMF	2.50%
MF	4.00%	MF	2.50%
YH	50 mg	LDL	3%
Ticarcilina	2%	Leche descremada en polvo	2.40%
Equex	0.5 ml	Penicilina sódica	0.045g
Agua Mili Q	100 ml	Equex	150 µl
		Agua desionizada	50 ml

*Camacho, 2014

Botucio®

Es un diluyente comercial que se ha utilizado para criopreservar el semen equino, combina GLY, YH y MF como crioprotector, además de 20 aminoácidos diferentes en el diluyente base.

- YH: su efecto crioprotector se le ha atribuido principalmente a las LDL y fosfolípidos (lecitina) que protegen a la membrana espermática disminuyendo el choque térmico (Medeiros et al., 2002. 27). La YH se compone de proteínas como: LDL (68%), lipoproteínas de alta densidad (16%), livetinas (10%) y fosvitinas (4%); que se encuentran divididas en dos fracciones los gránulos y el plasma o materia seca (Anton y Gandemer, 1997; Jolivet et al., 2006), esta última se compone principalmente de LDL (85%) y livetinas (15%) (Jolivet et al., 2006). En algunos estudios se ha utilizado la YH entera como crioprotector para semen de burro obteniendo buenos resultados pero la desventaja que tiene es que la fracción de los gránulos interfiere con la evaluación y el metabolismo del semen (Pace y Graham, 1974), se observó que se obtienen mejores resultados al centrifugar la YH para recuperar la fracción del plasma y obtener un extensor más limpio facilitando la evaluación del semen (Jiang et al., 2007; Pace y Graham, 1974; Wall y Foote, 1999).
- MF: las amidas se han considerado como el crioprotector ideal al tener bajo peso molecular, gran solubilidad en agua y baja toxicidad, las amidas que han obtenido mejores resultados son la MF y DMF (Alvarenga et al., 2005). Debido a su menor peso molecular tiene una mayor capacidad de difusión a través de la membrana plasmática de los espermatozoides, resultando en un equilibrio más rápido entre las regiones intra y extracelular y un menor potencial para generar daño espermático mediante el choque osmótico (Alvarenga et al., 2005; Medeiros et al., 2002; Moffet et al., 2003; Squires et al., 2004).
- GLY a pesar de que es el diluyente más utilizado en caballos se ha demostrado que a ciertas concentraciones (>3.5%) el GLY tiene un efecto tóxico sobre los espermatozoides de caballos (Macías et al., 2012), también se ha observado que los espermatozoides de los burros tienen una mayor sensibilidad al efecto tóxico de este diluyente (Alvarenga et al. 2005; Vidament et al. 2009). Su efecto tóxico causa alteraciones a nivel intracitoplasmático

provoca incremento de la viscosidad, alteración en la polimeración de la tubulina y de la asociación de los microtúbulos, desnaturalización de las proteínas, cambio en las interacciones de la actina, y estrés osmótico ya que penetra en menor velocidad comparado con otros crioprotectores (Fahy et al., 1990; Gilmore et al., 1995; Hammerstedt y Graham, 1992). El GLY se ha probado a diferentes concentraciones en combinación con otros diluyentes como la YH, y se observó que las concentraciones más bajas de GLY tienen una mayor eficacia en la supervivencia de los espermatozoides (Cochran et al., 1984; Cristanelli et al., 1985)

Investigadores brasileños han observado que la combinación de amidas con GLY a bajas concentraciones (1%) han obteniendo mejores resultados a la descongelación (Gomes et al., 2002; Medeiros et al., 2002; Melo et al., 2007; Papa et al., 2002; Alvarenga et al., 2005), es por este motivo que se elaboró este diluyente comercial con una composición de 1% de GLY, 4% de MF y 2% de YH (Alvarenga et al., 2005; Gomes et al 2002; Medeiros et al., 2002; Melo et al, 2007; Moffet et al 2003; Morillo et al., 2012; Rossi et al., 2003; Terraciano et al., 2008); el Botucio® también utiliza una sustancia surfactante que es el Equex (lauril sulfato de sodio) , este ayuda a mejorar la tasa de supervivencia post descongelación aumentando la estabilidad de la membrana espermática en los equinos (Wu et al., 2013)

Diluyente elaborado en el área de reproducción equina del Departamento de Reproducción, FMVZ de la UNAM

Desde hace unos años nuestro grupo de trabajo desarrollamos un diluyente para criopreservación de semen de equino; el cual está elaborado a base de DMF y LDL (sustituyendo a la YH), teniendo muy buenos resultados en los parámetros espermáticos post-descongelación (Bravo, 2011). Por lo que se pensó en utilizar dicho diluyente en la criopreservación de espermatozoides de burro, debido a la ausencia de GLY podría prevenir la toxicidad que se sabe que tiene sobre el semen y también sobre la reacción inflamatoria que aparentemente causa sobre el endometrio de la burra (Vidament et al., 2009).

- LDL: se compone de proteínas (12%) y lípidos (87%) (Moussa *et al.*, 2002), las LDL se encuentran en la fracción del plasma de la YH. Su efecto crioprotector, es prevenir la

formación de cristales de hielo al adherirse a la membrana plasmática de los espermatozoides, mediante la fusión con los liposomas de dicha membrana, protegiendo su integridad del choque térmico durante los procesos de congelación y descongelación (Bergerom et al., 2004; Hu *et al.*, 2010; Jian-Hong *et al.*, 2011; Anton y Gandemer, 1997; Foulkes, 1977). Actualmente, varios estudios han demostrado que la sustitución de la YH en diluyentes con LDL mejoraron la motilidad y la integridad de la membrana espermática post-descongelación en comparación con el uso de extensores comerciales que contienen YH entera, sin embargo, si la LDL se usa a concentraciones mayor al 10% pueden ser perjudiciales para los espermatozoides, debido a una mayor presión osmótica (Pace y Graham 1974)

- Leche en polvo descremada: se ha demostrado que actúa como una fuente de energía, siendo su efecto crioprotector permitir la adaptación de los espermatozoides al cambio de temperatura ya que posee fosfolípidos similares a los de la membrana de las células germinales, además el fosfocaseinato, β -lactoglobulina, glucosa, trealosa y rafinosa tienen un efecto antioxidante, aumentando la actividad de la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa y la catalasa, las cuales son enzimas esenciales para el control del mecanismo de la oxidación-reducción y prevenir la muerte de los espermatozoides por los radicales libres de oxígeno (ROS) (Kankofer et al., 2005).
- DMF: es conocida por su efecto crioprotector en semen equino, que se atribuye a una menor toxicidad y su menor peso molecular tiene una mayor capacidad de difusión a través de la membrana plasmática de los espermatozoides (Alvarenga et al., 2005). Se ha visto que en los burros andaluz la DMF tiene un efecto positivo sobre la movilidad y la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, reduciendo el daño ocasionado por el choque osmótico (Acha et al., 2015; Medeiros et al., 2002; Squires et al., 2004).

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Las técnicas de reproducción asistida como la IA permiten transportar semen de individuos de alto valor genético sin necesidad de trasladar a los animales. Además de permitir la distribución del material genético, se reduce también el riesgo de endogamia y se potencia el desarrollo de programas de conservación de razas en vías de extinción (Rota et al., 2008).

En los últimos años, la congelación de semen de caballo ha sido ampliamente estudiada hasta el punto de convertirse en una técnica reproductiva de uso rutinario en la industria equina debido a los buenos índices de fertilidad y los bajos costos (Aurich, 2008). No obstante, aún no se tiene un protocolo de criopreservación de semen específicamente para burros para, tal vez así, obtener mejores resultados en la tasa de fertilidad en las burras. (Cottorello et al., 2002; Miro y col., 2009; Rota y col., 2008; Santos et al., 1995; Serres et al., 2002; Vidament et al., 2009).

Las tasas de fertilidad obtenidas por IA en la burra con semen fresco oscilan entre el 51 y 73% (Marianelli et al. 2009; Oliveira et al. 2012) con semen refrigerado entre el 26% y 45% (Álvarez et al. 2004; Vidament et al. 2009), mientras que con semen congelado disminuyen drásticamente desde el 36 hasta el 0% (Oliveira et al. 2006; Rota et al. 2012; Trimeche et al. 1998; Vidament et al. 2009) incluso cuando los espermatozoides se depositan profundamente en el cuerno uterino (26%) (Oliveira et al. 2012).

El siguiente cuadro muestra las tasas de fertilidad obtenidas con semen congelado de burro en diferentes estudios (Cuadro 2). Algunos autores concluyeron que tal vez las burras desarrollan una respuesta inflamatoria más intensa después de la IA o monta natural en comparación con la yegua (Kotilainen et al. 1994, Miro *et al.*, 2013), incluso se puede observar que las tasas de fertilidad más bajas se obtuvieron cuando utilizaron diluyentes con GLY y no fue eliminado post descongelación, esto respalda la hipótesis de Vidament et al. (2009), de que el GLY tiene un efecto negativo en el útero de las burras. Se necesitan más estudios para mejorar la tasa de fertilidad en las burras

Cuadro 4: porcentaje de fertilidad en burras con semen congelado de burro en diferentes estudios

Autor y año	# Animales	Diluyente centrifugación	Diluyente congelación	% Mot. progresiva	Dosis inseminante	% de gestación
Trimeche et al., 1998	Poitou Machos 4 Hembras 13	-----	L-glutamina a 80 mM y 10% de YH de codorniz en un medio basal que contiene 4% de GLY (medio T2-94)	42 – 56	600x106 spmz	0% / 13 IA
			Medio T2-94 sin GLY post descongelación		600x106 spmz	29-50% / 13 IA
Oliveira et al., 2006	Machos: 1 Hembra: 10	Botu-Semen™	2% DMSO + 2% DMF	36.5 – 43.5	Se inseminaron pre y post ovulación 800x106 spmz	0% / 53 IA
			2% dimetilacetamida(DA)+2% GLY			
			3% GLY + 2% DMF			
			3% DMSO + 2% GLY			
			3% DMF			
			3% DA			
Vidament et al., 2009	Machos: 11 Poitou, 1 Grand Noir y 1 Pyrénéen Hembras: 6 Poitou y 7 raza criolla	INRA 82	2.2% GLY+ Leche	47 – 56	400x106 spmz	0% / 15 IA
			2.2% GLY con leche post descongelación		400x106 spmz	13% / 8 IA
			2.1% GLY		400x106 spmz	0% / 16 IA
			2.25% DMF		400x106 spmz	11% / 28 IA
Rota et al., 2012	Amiata Machos: 2 Hembras: 10	INRA 96	GLY + PS	35 ± 5.2	500x106 spmz	61.5% / 13 IA
			GLY + INRA	51.2 ± 11.3		23.1% / 13 IA
			EG + INRA	53.3 ± 11.3		25% / 13 IA
			GLY	51 ± 7.4		20% / 13 IA

Sabatani 2013	Amiata Machos: 2 Hembras: 13	INRA96	4% de YH + 4,4% GLY con INRA96 post descongelación	24.8 – 51.6	500x106 spmz	20% / 15 IA
			4% YH + 4,4% GLY + PS + INRA96 post descongelación			59% / 15 IA
			4% YH + 2,8% EG con INRA96 post descongelación			20% / 10 IA
			4% YH + 4,4% GLY			20% / 5 IA
Oliveira et al., 2016	Pega Macho: 1 Hembra: 28	Botu-Semen™	BotuCRIO™ (usando dosis de inseminación múltiple, 4 por ciclo)	39.9 – 44.5	1x 106 Cpo útero	0% / 12 IA
					1x 106 Cuerno	28.26% / 46 IA
Fanelli et al., 2022	Amiata Macho: 2 Hembra: 10	INRA96	INRA 96 + 2% YH + 2.2% GLY con PS post descongelación	49.55	500x106 spmz	60% / 10 IA
			INRA 96 + 2% YH + 2.2% GLY con INRA96 post descongelación	55.4		22.22% / 9 IA

ENDOMETRITIS

La endometritis es la inflamación del endometrio y una de las principales causas de infertilidad y subfertilidad en la yegua (Gutjahr et al., 2000), ya que se producen una serie de cambios en el útero que son incompatibles con el establecimiento de la gestación. Generalmente, la endometritis es el resultado de la interacción entre un agente causal, que puede ser de origen infeccioso o no y los mecanismos de defensa uterina (Carnota, 2019), por lo tanto, dicha patología, se divide en causas infecciosas y no infecciosas o endometritis post-servicio.

Causas infecciosas

Endometritis bacteriana

Los mecanismos de patogenicidad de las bacterias se basan en la adhesión de estas a las superficies epiteliales, impidiendo su extracción física y generando toxinas que causan irritación en el endometrio, contribuyendo a la producción de exudado inflamatorio y dando lugar a la

formación de biofilms que proporciona una matriz adhesiva a las bacterias en el endometrio (Olson et al., 2002). Las bacterias pueden transmitirse por contacto sexual (venérea) o ser oportunistas y provocar infecciones crónicas, algunos ejemplos son:

- Transmisión venérea: *T. Equigenitalis* (metritis equina contagiosa), *K. Pneumoniae* y *P. Aeruginosa* (Platt et al., 1976).
- Infecciones crónicas: se deben a microorganismos oportunistas, entre los que destaca *S. Equi subsp. Zooepidemicus* y *E. Coli* (Katila, 2016).

Otras bacterias aerobias aisladas en el tracto reproductivo de la yegua incluye: *Streptococcus* alfa-hemolíticos, *Corynebacterium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Actinobacter spp.*, *Proteus spp.* y *Citrobacter spp.*

Endometritis fúngica

Este tipo de endometritis son poco comunes, aunque se dan con mayor frecuencia como consecuencia del uso indiscriminado de antibióticos (Zafracas, 1975). La colonización del útero por parte de los hongos necesita determinadas condiciones y que los mecanismos de defensa vaginales no respondan de forma normal provocando un proceso de inmunosupresión en el animal. Estas condiciones pueden ocurrir, por ejemplo, cuando el animal presenta una pneumovagina (Zafracas, 1975) o cuando se está administrando antibioterapia intrauterina de larga duración para tratar una endometritis persistente (Dascanio et al., 2001). Los hongos que se han aislado más comúnmente son *Aspergillus spp* y *Candida spp*.

Endometritis post-servicio

La endometritis post-servicio es una respuesta fisiológica del endometrio en casi todas las hembras, que facilita la fagocitosis y eliminación de microorganismos como bacterias, plasma seminal, diluyentes y espermatozoides con el fin de restablecer un ambiente uterino sano y poder llevar a término la gestación (Troedsson et al. 2001b). Esta reacción es específica de especie y varía según las características del semen inseminado (criopreservado, refrigerado o fresco), la calidad del semen, el sitio de deposición (Fiala et al., 2007; Kotilainen et al., 1994; Katila, 2005, 2012), la viabilidad, volumen, número de espermatozoides, la ausencia de plasma seminal, la

adición de crioprotectores, presencia de bacterias u otros contaminantes son factores que modulan la intensidad de la respuesta inflamatoria (Eisenbach, 2003; Fiala et al, 2007; Gorgens et al., 2005; Hunter et al., 2006; Kazim et al., 2004, 2005; Matthijs et al., 2003; Rozeboom et al., 2001; Troedsson 2001b). Sin embargo, en caso de montas o IA frecuentes, se puede desarrollar una respuesta inmune adquirida hacia los espermatozoides provocando un problema de fertilidad debido al retraso de la limpieza uterina, desarrollando una endometritis persistente y un ambiente incompatible para el embrión (Katila, 2012). Se ha visto que las altas dosis de espermatozoides causan una inflamación más intensa pero con una fagocitosis rápida, en cambio, al usar dosis más bajas causaron inflamatoria leve pero prolongada (Cazales et al., 2020; Fiala et al., 2018; Gomes et al., 2018)

Se sabe que los espermatozoides llegan al oviducto de burras y yeguas desde 30 min post servicio y a las dos horas después del servicio post servicio, cuatro horas después hay una gran cantidad de espermatozoides en el oviducto y seis horas más tarde hay una reducción significativa de espermatozoides, por lo que dentro del lumen uterino debe haber poca cantidad de partículas ajenas a éste, gracias a los mecanismo de limpieza uterino, entre otros, puede marcar la diferencia de una endometritis transitoria o persistente (Eisenbach et al. 2003; Gorgens et al. 2005; Matthiis et al. 2003; Rozeboom et al. 2001; Schuberth et al. 2008; Troedsson et al., 1995, 2001a).

Se sabe que en la yegua inseminada, ya sea con semen fresco o congelado, ocurre una marginación de PMN en los vasos sanguíneos y migran al tejido endometrial causando edema y liberación de mediadores inflamatorios (principalmente COX-2) a partir de los 30 min a la exposición del semen, alcanzando su pico máximo después de 4 a 8 horas, para que a las 36 a 48 h se resuelva la inflamación (Kotilainen et al., 1994; Katila et al, 1995, 1996, 2001). En burras se ha observado que el pico máximo de PMN ocurre a las 6 hrs post-IA con semen congelado (Miro et al., 2011; Rota et al., 2012; Viles et al., 2013; Sabatani, 2013), en un estudio realizado por Sabatani (2013) utilizando el método de lavado uterino de bajo volumen post-IA profunda con semen congelado observó que el 50% de las burras a las 24 hrs todavía había presencia de PMN. Lo anterior, se explica debido a que su aparato genital es más grande con respecto a su peso, el cérvix es más largo y tortuoso, el vestíbulo vaginal tiene una mayor inclinación y la vulva se encuentra debajo

del piso de la pelvis, lo que predispone a una mayor respuesta inflamatoria en el endometrio (Renner-Martin et al, 2009; Vendramini et al., 1998; Veronesi et al., 2010).

Los principales mecanismos de resolución de la endometritis en las yeguas son la respuesta inmune innata como los neutrófilos, NK, IFN, TNF, junto con la limpieza mecánica, se considera que los mecanismos de defensa del útero se dividen en:

- **Mecanismos físicos:** los cuales están constituidos por las barreras físicas y por la limpieza mecánica, como las contracciones uterinas que junto con el sistema linfático del útero ayuda en la limpieza, disminuyendo el edema y eliminando las células inflamatorias del endometrio a través de la luz uterina (Troedsson et al., 1991, Troedsson y Liu, 1993; LeBlanc, 1991; LeBlanc et al., 1994). La contractibilidad endometrial está regulada por la liberación de hormonas como la oxitocina y la $PGF2\alpha$ que aumentan las contracciones del miometrio; los estrógenos estimulan los receptores de oxitocina regulando las contracciones de los músculos uterinos, además de favorecer la síntesis de prostaglandinas por parte de las células del endometrio, y además el endometrio está cubierto por una capa mucosa, la cual tiene una función protectora y con la ayuda de las contracciones uterinas puede prevenir la adhesión bacteriana al endometrio eliminando las bacterias muertas y células inflamatorias al exterior a través del cérvix con ayuda de los cilios que se encuentran dentro del útero (Causey et al., 2000; LeBlanc & Causey, 2009). La endometritis crónica provoca una pérdida de la capa mucosa y del epitelio, alterando la arquitectura luminal lo que favorece que los microorganismos se adhieran a la pared uterina ocasionando que la endometritis persista (Carnota, 2019; Causey, 2006; Kenney, 1978; Le Blanc, 2009). En las yeguas de edad avanzada ocurre una falla en el sistema de drenaje linfático y mecánico, promoviendo la acumulación de líquido y el edema, favoreciendo la endometritis (LeBlanc & Causey, 2009).
- **Mecanismo humoral y celular:** es la respuesta inmunológica local donde intervienen los PMN, linfocitos, inmunoglobulinas y mediadores de la inflamación, ésta a su vez se dividida en dos, la respuesta inmune adaptativa que está mediada por linfocitos T y responde selectiva y gradualmente a la detección de antígenos; y la respuesta inmune innata que es inespecífica, rápida y transitoria, está mediada por los receptores tipo Toll

(TLR), inmunoglobulinas y el complemento, esta es la que actúa cuando ocurre la reproducción, lo que se explicará más adelante (Canisso et al., 2014; Fiala et al., 2004).

Se sabe que en yeguas susceptibles a endometritis hay un aumento de la IL8 y una disminución de la IL10 a las 6hrs post-servicio y a las 24hrs ocurre un incremento de la IL1, IL6 y factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), las hembras con una inflamación persistente más allá de las 24hrs acumulan óxido nítrico el cual dificulta la contractilidad uterina lo que impide una limpieza uterina. (Alghamdi y Troedsson, 2002). En burras es escasa la información que hay sobre los la reacción uterina post-servicio y los mecanismos de limpieza uterino.

Interacción espermatozoide-útero

El semen es considerado el principal responsable de la respuesta inflamatoria uterina ya que activa la respuesta inmune innata, mediante la activación de la cascada del complemento por las células del endometrio (Troedsson et al., 2005), el complemento es importante para la posterior activación de la opsonización en las secreciones uterinas y la quimiotaxis de leucocitos (Hakansson et al., 1993).

En la vía clásica del complemento, la subunidad C4 se une a C1q, iniciando las divisiones enzimáticas de C4 en C4a y C4b y C2 en C2a y C2b (Grossman et al., 2016). La agrupación de C4b con C2b activa la convertasa C3, dividiendo la C3 en C3a, y C3b, la primera está relacionada al reclutamiento de leucocitos y a una mayor activación del complemento. La convertasa C5 divide C5 en C5a y C5b, y esto resulta en la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) (Walport, 2001). La interacción de los espermatozoides con el útero activa al complemento aumentando la secreción de C3b, C5a, leucotrienos y prostaglandinas, los cuales provocan la quimiotaxis de PMN en el útero (Pycock y Allen, 1990; Watson et al., 1987).

También se ha observado en yeguas que cuando las células endometriales entran en contacto con el semen, plasma seminal o diluyente, se producen citocinas proinflamatorias como las prostaglandinas principalmente, a través de la acción de la enzima COX-2 en la cascada de síntesis del ácido araquidónico (Figura 7), las principales citocinas que aparecen son interleucina 1 (IL1), IL6 y $TNF\alpha$, tanto las prostaglandinas como las citocinas provocan la activación de las células del

endotelio vascular, esto causa una constricción de las arteriolas y dilatación de las vénulas aumentando así la permeabilidad vascular y presencia de líquido uterino (Contran et al., 1999).

Los PMN constituyen una barrera esencial en la defensa uterina frente a infecciones, y su principal actividad es la fagocitosis favoreciendo así una rápida resolución de la inflamación (Katila et al., 2007). Su primer mecanismo de acción de los PMN es fijar y capturar el espermatozoide mediante la opsonización la cual aumenta la fagocitosis de los PMN, las principales opsoninas del líquido uterino son el complemento y la IgG (Carnota, 2019).

Por otro lado, los PMN pueden provocar muerte celular por medio de trampas extracelulares (NETs). Este es un mecanismo de muerte celular diferente a la necrosis y apoptosis, donde los neutrófilos son capaces de formar redes compuestas por proteínas intracelulares, liberando su ADN y la cromatina nuclear al medio extracelular, atrapando e inactivando a los agentes exógenos en el sitio de infección del útero (Lögters et al., 2009). Este tipo de respuesta inflamatoria solo ha sido estudiado en yeguas por Rebordão et al. (2014) demostrando que las NETs pueden ser un sistema de defensa contra la endometritis, sin embargo, las NETs también liberan moléculas, como la mieloperoxidasa, lactoferrina, elastasa y cathepsina G, que son proteínas con propiedades antimicrobianas, que podrían causar una fibrosis endometrial secundaria (Lögters et al., 2009). Las NETs son moléculas que contienen propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras (Lögters et al., 2009) que son inducidas por los ROS (especies reactivas de oxígeno), lipopolisacáridos, entre otros, su actividad microbiana se llama netosis que ocurre cuando se liberan los gránulos que vienen de la ruptura de los PMN permitiendo que entre en contacto con antígenos y otras células inmunes (Brinkmann, 2011).

Los neutrófilos también producen señales quimiotácticas para atraer monocitos que posteriormente se van a diferenciar a macrófagos (van Gisbergen et al., 2005) y después estos leucocitos liberan prostaglandinas para estimular la contractilidad miometrial y ayudar en la limpieza uterina junto con las citosinas como la IL10, IL4, IL3 y la IL1RN (antagonista de la IL1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), estos desempeñan un papel importante en la resolución de la inflamación (Arend et al., 2000; Christoffersen et al., 2012; Couper et al., 2008; Troedsson et al., 1995).

La intensidad de esta respuesta inflamatoria depende de la cantidad de espermatozoides que ingresan al útero, a mayor concentración mayor es la respuesta inflamatoria (Kotilainen et al., 1994; Fiala et al., 2007; Cazales et al., 2018) y cuanto mayor tiempo permanecen los espermatozoides en el útero mayor será la respuesta inflamatoria (Samper et al 2016). Estudios previos han demostrado que solo un porcentaje reducido de espermatozoides son fagocitados por PMN, ya que la mayoría permanecen adheridos a su superficie o se encuentran dentro de un halo circundante (Miro et al., 2020a).

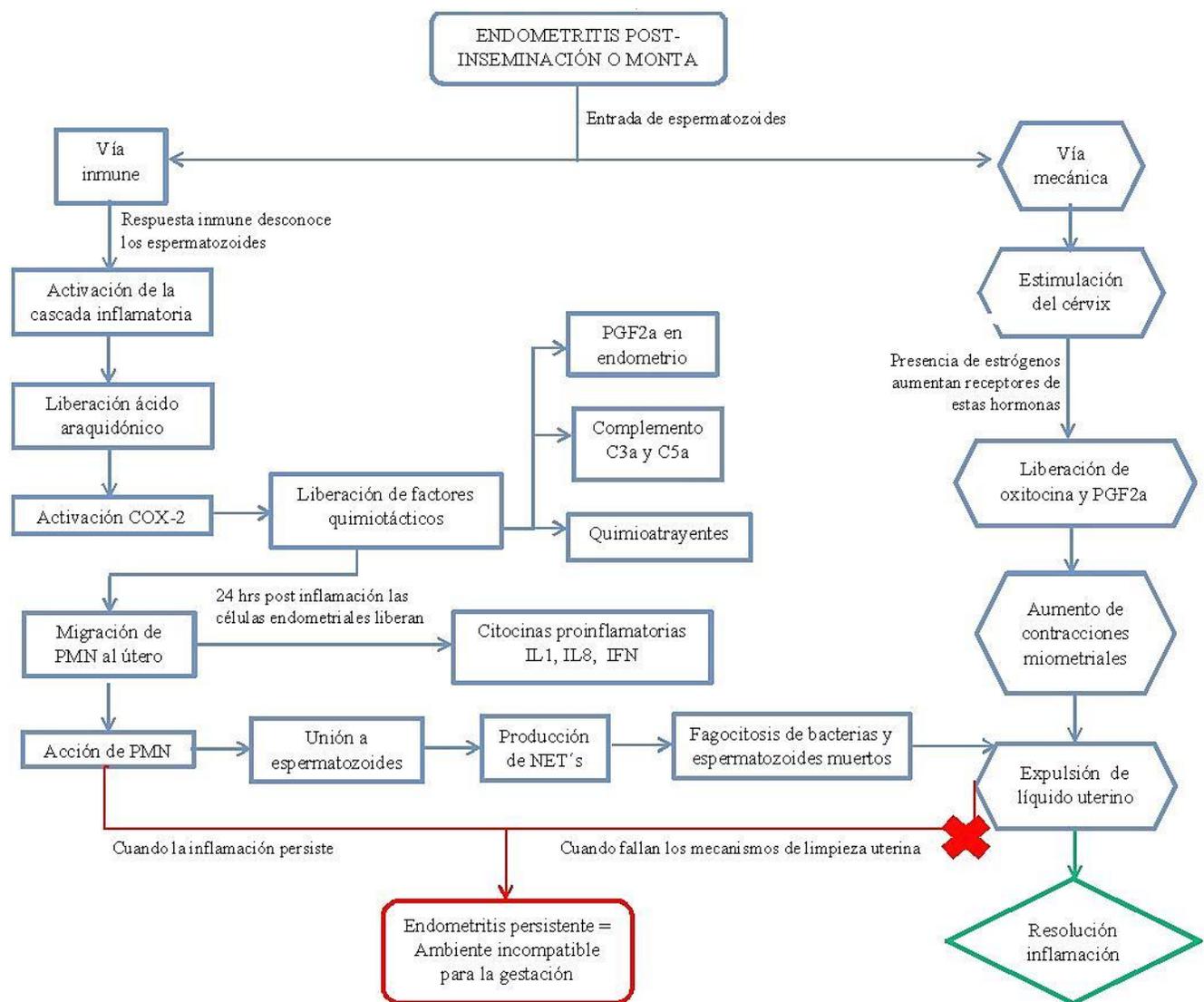


Figura 9: Endometritis post-inseminación: Color azul fisiología de la endometritis post-monta o IA; Color verde inflamación resuelta; Color rojo inflamación crónica Adaptado de Ley et al., 2002 y Lee 2020.

Interacción diluyente-útero

Al utilizar semen congelado se produce una mayor reacción inflamatoria comparada con semen fresco o refrigerado, usando la misma dosis inseminante (Kotilainen et al., 1994), pero esta respuesta no es del todo clara si se debe a la ausencia del plasma seminal; mayor concentración espermática o la presencia del diluyente (Katila, 2001; Troedsson et al. 1995) no observaron ninguna diferencia en la quimiotaxis entre semen fresco y semen congelado, o entre espermatozoides vivos y muertos in vitro (Troedsson, 1995; Danvila 2020).

Se ha demostrado diferencias en la cantidad de PMN presentes en el útero dependiendo del tipo de diluyente que se use. Con respecto, en la inseminación con semen congelado utilizando diluyentes con YH hay una menor respuesta inflamatoria que la provocada utilizando diluyentes con leche descremada (Bergman y de Kruif 1997; Kotilainen et al., 1994; Parlevliet et al. 1997; Fiala et al., 2007). Debido a la variedad de los diluyentes de semen, no se puede generalizar la intensidad de la respuesta inflamatoria que se provoca con dichos diluyentes.

Por los resultados en diferentes trabajos, se ha pensado que los espermatozoides son los responsables de la presencia de PMN en el útero, sin embargo, en un estudio realizado por Palm et al (2008) analizaron los efectos de diferentes diluyentes de semen y plasma seminal, pero sin la presencia de espermatozoides, sobre la respuesta inflamatoria del endometrio. En este trabajo, se observó que todos los grupos experimentales tenían una marcada reacción inflamatoria del endometrio y hubo un aumento en la expresión de IL-1b, IL-6 y TNF-a en biopsias endometriales de yeguas a las 12 h post-IA, sin embargo, en el grupo en dónde se utilizó yema de huevo, se observó menor inflamación con respecto al diluyente con leche, PBS y el plasma seminal, esto pudo haber ocurrido porque la yema de huevo tiene un alto contenido de progesterona, y los autores sugirieron que la progesterona podría ejercer un efecto antiinflamatorio. Por otro lado, Woelders y Matthijs (2001) se sugiriere que no es el componente de los diluyentes lo que provoca el reclutamiento de PMN en la luz uterina, sino la presencia de líquido en el útero ya que las células endometriales que entran en contacto con este diluyente se activan para sintetizar y liberar citocinas y otros mediadores. (Robertson 2007).

CITOLOGÍAS ENDOMETRIALES

La citología endometrial es un método diagnóstico invasivo que permite evaluar, de manera directa procesos fisiológicos o patológicos del endometrio, mediante el estudio de las características citológicas cuantitativas y cualitativas (Vásquez et al. 2000). La citología endometrial ayuda a detectar una respuesta inflamatoria activa en el útero, principalmente a través de la detección de neutrófilos, también podemos observar presencia de células epiteliales, detritus, moco, hifas de hongos, levaduras y bacterias (Bowen et al., 1980; Card, 2005; LeBlanc, 2011; Ley, 1981). Los frotis citológicos uterinos se usa comúnmente como una herramienta de campo al ser una técnica rápida y barata, pueden proporcionar un diagnóstico rápido de endometritis en las hembras y puede servir como guía para saber el tipo de terapia a implementar (Katila, 2016; Miro et al, 2018). La presencia de células inflamatorias en el interior del útero, en cantidad superior a la normal, indicará un proceso inflamatorio (Katila, 2016); y si el problema persiste, existirá un recambio celular; por lo que, aparecerán linfocitos y células mononucleares, permitiéndonos diferenciar la inflamación aguda de la crónica en función de los tipos celulares predominantes (McCue, 2014). Los métodos de recolección de la muestra para el examen citológico del endometrio abarcan desde hisopos de algodón, cepillos endometriales o lavado uterino de bajo volumen:

- a) Cepillos endometriales (Cytobrush): tanto en los seres humanos como en los équidos, se ha determinado que la técnica del cytobrush o cepillo citológico es superior a otros métodos para la recolección de células cervicales y endometriales (Bourke et al., 1997; Glenthøj et al., 1986; Trimbos et al., 1986). Esto es porque la estructura del cepillo al tener fibras de nailon aumenta la superficie de contacto con el endometrio y penetran con mayor profundidad a las glándulas, recolectando células inflamatorias que se infiltran en el endometrio (Martin-Hirsch et al., 2000). Cocchia et al. (2012), y se afirma que las células obtenidas con “cytobrush” sufren menos alteraciones que las obtenidas por lavado. Sin embargo, una de las desventajas del “cytobrush” es que sus fibras rígidas pueden ser traumáticas, ocasionando la fragmentación celular (Martin – Hirsch et al., 2000). Para la toma de muestras se pasa el “cytobrush” protegido con un protector, para evitar contaminar el cepillo con la vagina y al momento de llegar al cérvix se pone en contacto con éste, arribando hacia el útero con la ayuda del brazo, previamente lubricado y con un guante de

exploración rectal. Una vez dentro de la zona a muestrear, que puede ser el cuerno, el cuerpo uterino o la base de los cuernos, el cytobrush se rota contra la pared uterina en el sentido de las agujas del reloj. Después se extrae el “cytobrush” del cérvix protegiéndolo con su protector y se hace rodar el cepillo sobre un portaobjetos para el examen citológico.

- b) Hisopos de algodón: debido a que el hisopo solo entra en contacto con un área de endometrio de 1-2 cm² aproximadamente es más propenso a no diagnosticar de manera significativa la endometritis (LeBlanc, 2010). El procedimiento para introducir el hisopo en el útero es similar al utilizado con el “cytobrush” o la biopsia. Cuando el hisopo llega al cuerpo uterino se desliza sobre la superficie del endometrio durante unos 15 segundos, para que absorba las secreciones. Pasado este tiempo se retira con cuidado del interior del cérvix y se hace rodar sobre un portaobjetos de vidrio estéril para la interpretación de la muestra (De Amorin et al., 2012).
- c) Lavado uterino: se recolectan células en un área de superficie más grande y proporciona una muestra más representativa que los otros dos métodos antes mencionados (Kasimanickam et al., 2005; Roszel y Freeman, 1988). Sin embargo, según Ferris et al. (2015), existe un mayor riesgo de contaminación celular al tomar la muestra por medio de lavado con bajo volumen, ya que se han encontrado células vaginales y/o contaminación con la flora vaginal, por lo que esta se debe de interpretar con precaución (Cocchia et al. 2012; LeBlanc et al., 2007). Para obtener este líquido se realiza un lavado uterino de bajo volumen usando una solución salina fisiológica o Ringer Lactato, aproximadamente de 200 a 250 ml. Se coloca una sonda de tres vías, un lado estará conectado a la solución, otro a una sonda Foley y el último se coloca un recipiente para recuperar el líquido, con la mano enguantada se introduce la sonda Foley en el cérvix, una vez dentro se pasa la solución al útero y se deja por 30 segundos, al mismo tiempo se debe masajear el útero por palpación transrectal. Una vez pasado el tiempo se recolecta el líquido introducido en el recipiente, se deja sedimentar por 30 minutos, posteriormente se recogen 15 ml de ese sedimento obteniendo una muestra representativa para ser centrifugada a 400 G durante 10 minutos, para obtener el pellet y hacer un frotis sobre un portaobjeto (LeBlanc et al., 2007).

Métodos de tinción

Las tinciones más comúnmente utilizadas para realizar las citologías endometriales son: la tipo Romanowsky (Wright, Giemsa, Azul de Metileno, Diff-Quick) y las tinciones tricrómicas (Papanicolaou). En esta tesis se utilizaron la Diff-Quick y Papanicolaou (Dascanio et al., 1997; Jörundsson et al., 1999; Ley et al. 2002; Vásquez et al. 2000):

- Diff-Quick: está compuesta por un fijador (metanol), un colorante aniónico ácido (eosina) que tiñe el citoplasma de las células de color rojo, y por una tiazina (azul de metileno o sus derivados) que tiñe el núcleo de azul, proporcionando detalles celulares en exámenes citológicos endometriales de rutina. El secado al aire permite conservar el material celular, aunque con poco detalle citológico. Esta tinción es de elección para su uso rutinario del diagnóstico citológico, debido a que es barata, fácil de preparar, utilizar y en menos de un minuto las muestras están listas para ser evaluadas.
- Papanicolaou: es un método de tinción policromático que consta de una tinción nuclear y un contraste citoplasmático, por lo tanto esta tinción utiliza tres colorantes: la hematoxilina que tiñe selectivamente los núcleos, el orange G, la eosina y el alcohol 50 que tiñen los citoplasmas, también usa la fijación en húmedo (etanol al 95%), para evitar la deshidratación celular y da una citomorfología detallada. Aunque se usa poco en veterinaria debido a la gran cantidad de pasos a seguir y a sus limitaciones por su alto costo, tiene como ventaja una buena definición del detalle nuclear, evidenciando el patrón de cromatina; un aspecto transparente del citoplasma, que permite apreciar los grados de diferenciación celular y actividad metabólica. Sus ventajas diagnósticas son superiores cuando se evalúan procesos inflamatorios mediante la observación de las características citoplasmáticas, ya que se evidencian los cambios degenerativos y tóxicos de las células.

Evaluación e interpretación

Para evaluar las citologías al microscopio, primero se emplea el aumento de 100x, una vez que se encuentra el campo deseado se cambia al aumento 400x para poder identificar correctamente las células, se deben considerar los siguientes puntos para confirmar la calidad del frotis de acuerdo a Ley et al. (2002):

- La muestra recolectada debe contener un número suficiente de células endometriales para permitir un examen citológico confiable
- Las células deben estar lo suficientemente separadas para realizar un correcto conteo
- Las células deben estar teñidas correctamente y conservan una citomorfología adecuada que permita identificarlas
- Que no haya presencia de artefactos como cristales de orina, hebras de moco, eritrocitos, células rotas, grupos de células, polvo, residuos fecales; para que no interfieran con la interpretación de la muestra

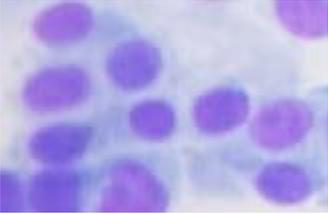
Es importante que la toma de muestra no dañe el endometrio, ni introduzca patógenos en el ambiente uterino (Ley 1981). Si en la muestra hay un gran número de células epiteliales uterinas alteradas o degeneradas es posible que se hayan dado fallos en la preparación, manipulación o almacenamiento de la muestra antes de la tinción, aunque también se puede asociar a una infección uterina crónica (Ferris et al., 2015). Una vez que se ha confirmado que la calidad del frotis es adecuada para una correcta lectura, se debe aumentar el aumento a 400x y continuar el examen. En el Cuadro 5 y Figura 8, se muestra el tipo de células que se pueden observar en un frotis citológico endometrial (Bowen et al., 1987; Cour y Sprinkle, 1985; Hurtgen y Cummings, 1982; Katila, 1995; Ley et al., 2002; Rickett y Alonso, 1911; Vásquez et al., 2000).

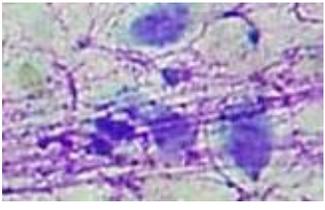
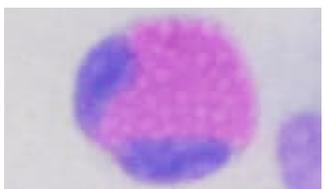
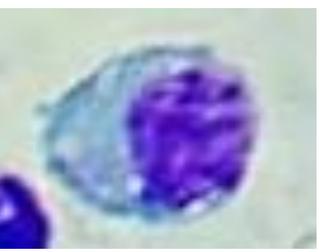
En yeguas un predominio de eosinófilos, linfocitos y macrófagos indica una respuesta inflamatoria endometrial resuelta o crónica (Bowen et al. 1987), en cambio en las burras la presencia de células endometriales con PMN especialmente eosinófilos durante el estro y post-IA, se consideran hallazgos de un endometrio sano y forman parte de la reacción inflamatoria uterina post servicio (Canisso et al., 2019; Miro et al, 2018; Viles et al. 2013), sin embargo, el aumento significativo de PMN indica endometritis aguda (Hurtgen y Cummings, 1982).

Un estudio reciente (Papas et al., 2017) mostró que, en contraste con las yeguas, un gran número de PMN está presente en las biopsias de burras con endometriosis grave (19-26%). Estos valores son significativamente más altos que en burras sanas en estro (1.53%), pero más bajos que en burras con endometritis aguda post-IA (87,74%). Además los valores de eosinófilos aumentan

significativamente con la endometritis, pero se mantienen en las etapas iniciales de endometriosis. Se requieren más estudios para establecer el papel de los eosinófilos en la endometritis y la endometriosis en las burras. En otro estudio, se observó infiltración moderada y difusa de eosinófilos en el estrato compacto endometrial de burras en estro después de la inseminación y la presencia de estas células se consideró normal (Miro et al., 2020b).

Cuadro 5: Células que se pueden observar en un frotis con el aumento 400x y su interpretación

Citologías con Diff-Quick	Células	Interpretación
	Células epiteliales endometriales	Son células epiteliales columnares, los núcleos son ovales de localización basal, con cromatina finamente granular, estas se observan de forma normal en la época ovulatoria de la yegua, se pueden observar agrupadas o individuales.
	Células epiteliales vaginales	Parece como de tipo escamoso sin núcleos e indica que la muestra se contaminó o se recolectó incorrectamente, ya que el área a muestrear debe ser el útero, no la vagina.
	Células epiteliales cervicales	Son escamosas o cuboidales epiteliales, con núcleos más pequeños, localizados hacia la parte basal e indican que la muestra se recolectó incorrectamente.
	Eritrocitos	Es una célula de forma redondeada, bicóncava, pequeña, de color eosinófila-naranja y ausencia de núcleo, su presencia está relacionada con el posparto y procesos inflamatorios agudos del endometrio.

	Hebras de moco	Pueden ser transparentes, entremezcladas con células o grupos de células, y deberían ser más prominentes en las muestras recolectadas durante el estro.
	Neutrófilos	Son pequeños con núcleo multilobulado (2 – 5 lóbulos) de color azul, son los primeros que responden ante un estímulo antigénico.
	Linfocitos	Son indicadores de un proceso inflamatorio crónico cuando aparece un porcentaje significativo (>30%) respecto a los neutrófilos visualizados. Aparecen como células pequeñas, relativamente oscuras con escaso citoplasma
	Eosinófilos	Son típicamente más grandes que los neutrófilos y tienen una tinción ligeramente rosada, tienen gránulos intracitoplasmáticos grandes y redondos y un núcleo lobulado
	Macrófagos	Son típicamente grandes, con citoplasma, de color gris pálido a azul claro, y pueden tener vacuolas en el citoplasma. Se pueden observar macrófagos, especialmente en la fase de resolución de la endometritis o durante la transición de primavera u otoño.

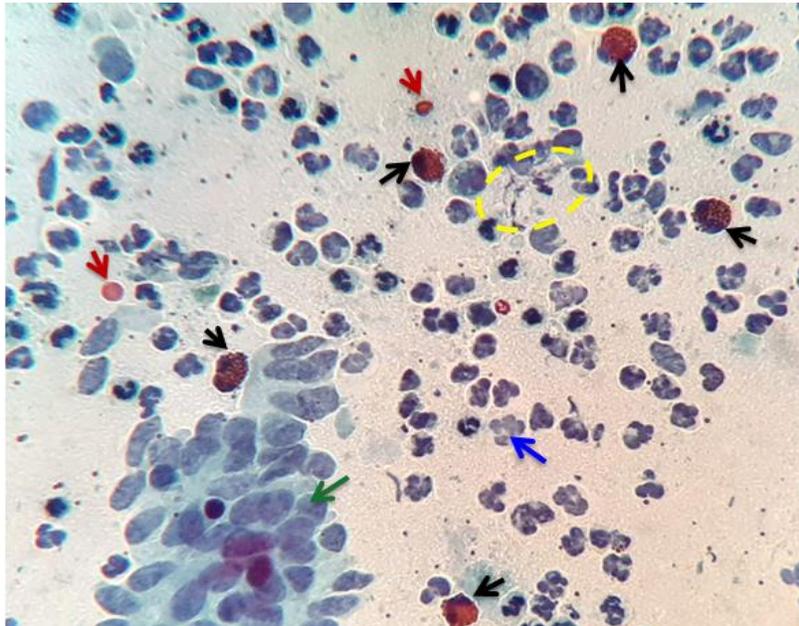


Figura 10: Citología endometrial de Zahira a las 12hrs post-IA con semen fresco, teñida con Papanicolau. Flecha negra: eosinófilos; Flecha roja: eritrocitos; Flecha verde: células epiteliales endometriales; Flecha azul: neutrófilos; Línea punteada amarilla: hebras de moco

Existen varios métodos para clasificar e interpretar una citología endometrial, sin embargo, los más utilizados son:

- Número de PMN por campo (400x): la presencia de dos o más PMN en un campo indica una respuesta inflamatoria activa, aunque se ha demostrado que esta metodología no es tan confiable (Bowen et al., 1987; Dascanio et al., 1997; Knudson, 1964; Ley, 1981).
- Porcentaje de PMN en relación con las células visualizadas: se hace un conteo de 5 campos (400x) en la laminilla, clasificando el tipo de inflamación de acuerdo al % de PMN encontrados como se muestra en el Cuadro 6 (Card, 2005; Cocchia et al., 2012)

Cuadro 6: Clasificación de la respuesta inflamatoria endometrial

Clasificación de la inflamación	%PMN
No inflamatorio	< 5 %
Inflamación aguda leve	5 – 15 %
Inflamación moderada	15- 30 %
Inflamación severa	>30 %

JUSTIFICACIÓN

Se sabe que los diluyentes solos ocasionan una respuesta inflamatoria considerable en el útero de la yegua pero al agregar semen al diluyente se observa una disminución en la respuesta inflamatoria, sin embargo, no hay estudios que confirmen si esto ocurre en las burras

HIPÓTESIS

El uso de diluyentes con semen modula la respuesta inflamatoria en el endometrio de las burras

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el uso de dos diluyentes de criopreservación con y sin semen de burro sobre la respuesta inflamatoria endometrial post IA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar la cantidad de PMN en el endometrio post-IA utilizando dos diluyentes sin semen: uno comercial (BotuCRIO®) y uno a base de LDL elaborado en el departamento de reproducción de la FMVZ-UNAM.
2. Comparar la cantidad de PMN en el endometrio post-IA, utilizando los dos diluyentes antes mencionados con semen de burro
3. Determinar el tiempo de la respuesta inflamatoria endometrial post-IA , a las 0 hrs., 8 hrs., 12 hrs., 24 hrs. y 48 hrs. con los dos tipos de diluyentes mencionados con y sin semen
4. Comparar los resultados de las citologías endometriales utilizando dos tinciones una de tipo Romanowsky (Diff-Quick) y otra tipo tricrómica (Papanicolaou) para determinar la sensibilidad de cada una
5. Monitorear ultrasonográficamente la cantidad de fluido uterino acumulado a las 0hrs, 8hrs, 12hrs, 24 y 48hrs

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la “Clínica de Reproducción de Équidos” de la FMVZ UNAM ubicada en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA), en el Municipio de Tequisquiapan, Estado de Querétaro de Arteaga, México.

Animales y tratamientos

Se usaron 8 burras criollas adultas con fertilidad probada, con una edad de entre 5 - 24 años, las cuales se encontraban clínicamente sanas y con una condición corporal promedio de 3.5 en escala del 1 al 5 (Svendsen, 2008). Las burras se mantuvieron en condiciones de confinamiento, recibiendo una dieta balanceada con forraje de avena, así como agua *ad libitum*. En cada una de las 8 burras se evaluaron seis tratamientos diferentes administrados en ciclos estrales sucesivos, para evaluar la respuesta inflamatoria provocada por cada uno de ellos. El orden de los tratamientos fue diferente para cada burra, por lo que el experimento siguió un diseño de bloques al azar, en el que la burra actuó como bloque. Todos los tratamientos fueron administrados por inseminación artificial profunda, el volumen que se usó fue de 2ml, lo equivalente a 4 pajillas, en el caso de los tratamientos que contienen semen cada pajilla contenía 200×10^6 spmz, usando una dosis inseminante total de 800×10^6 spmz, los tratamientos fueron los siguientes:

- AD: agua desionizada estéril.
- B: diluyente comercial de criopreservación que contiene GLY (BotuCrio®, Botupharma, Botucatú, Brasil)
- LDL: diluyente de criopreservación que contiene lipoproteínas en lugar de GLY (un diluyente a base de LDL elaborado en el departamento de reproducción de la FMVZ-UNAM).
- SF: Semen fresco: primero se realizó la evaluación del semen y obtuvo un 92.3% motilidad total (MT) y 80.6% motilidad progresiva (MP), el semen fue diluido en diluyente de centrifugación INRA96 (IMV Technologies, Francia), se centrifugó de 500-600 gravedades por 10 minutos para eliminar el plasma seminal, el sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió con el mismo diluyente de centrifugación y se realizó el

empaquetado en pajillas de 0.5ml a una concentración por pajilla de 200×10^6 espermatozoides/ml

- BS: semen criopreservado con el diluyente comercial BotuCrio® (Botupharma, Botucatu, Brasil). La congelación de las pajillas se realizó de acuerdo a lo informado por Alvarenga et al. (2016), y fueron almacenadas en un tanque con nitrógeno líquido a una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser descongeladas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto en baño maría (Alvarenga et al. 2016) inmediatamente antes de la inseminación con un 54.8% MT y 41.3% MP a la descongelación.
- LDLS: semen criopreservado con un diluyente a base de LDL elaborado en el departamento de reproducción de la FMVZ-UNAM. La congelación de las pajillas se realizó de acuerdo a lo informado por Alvarenga et al. (2016), y fueron almacenadas en un tanque con nitrógeno líquido a una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser descongeladas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto en baño maría (Alvarenga et al. 2016) inmediatamente antes de la inseminación. Con un 60.5% MT 43.8% MP a la descongelación.

Antes de aplicar cada uno de los tratamientos en cada burra, se realizó la detección diaria de estros, y a partir del inicio del estro se evaluó ultrasonográficamente el edema uterino y el crecimiento del folículo dominante. A partir de la detección ultrasonográfica de un folículo igual o mayor a 30 mm de diámetro (Pugh et al. 2002; Tibary et al. 2006) se realizó la programación de la ovulación mediante la administración de 1.7mg de acetato de deslorelina por vía IM (Chávez et al., 2018; Yang et al., 2020). A las 24 hrs post-aplicación de la hormona se realizó el seguimiento de las hembras cada 4 h hasta detectar la ovulación (Jaramillo y Pérez, 2013; Oliveira 2012), momento en el cual se realizó la IA profunda de los tratamientos (Canisso et al. 2011). Después de cada tratamiento las burras se monitorearon ultrasonográficamente a las 0, 8, 12, 24 y 48 horas para determinar la cantidad de fluido uterino acumulado en cada periodo.

Al llegar al día 5 post-ovulación las burras fueron tratadas con 5 mg de $\text{PGF}_2\alpha$ (Lutalyse) por vía IM para ocasionar el retorno al estro (Sabatani, 2013) e iniciar la programación del siguiente tratamiento. A partir de la administración de la prostaglandina se reinició la detección de estros

con el objetivo de repetir todo el proceso descrito anteriormente (desde la detección de estros hasta la obtención de las muestras de citología) con el siguiente tratamiento asignado a cada burra, y así sucesivamente hasta que cada burra recibiera cada uno de los 6 tratamientos y se obtuvieran las muestras de citología con cada uno de ellos.

Citologías endometriales

De cada burra se obtuvieron muestras de citología endometrial utilizando el cepillo citológico de Minitube® (Mexitube Alemania, S.A. de C.V.) a las 0 horas (antes de la inseminación), 8, 12, 24 y 48 h post-tratamiento. Las citologías se realizaron utilizando el protocolo de Cocchia et al. (2012). Primero se lavó la región perineal y posteriormente se realizó la obtención de la muestra endometrial, protegiendo al cepillo antes de sacarlo del tracto reproductivo (Vásquez et al. 2000). Inmediatamente después se realizaron frotis en 2 portaobjetos de cristal (Núñez et al. 2007); uno de ellos se fijó al aire para ser teñido con Diff-Quik (D-Q) (Sabatani 2013; Vásquez et al. 2000; Viles et al. 2013; Card 2005) y el otro se fijó en alcohol etílico durante 10 minutos, para ser teñido con Papanicolaou (PAP) (Jörundsson et al. 1999). La lectura se realizó por dos evaluadores, se observó 1 laminilla de cada tinción, en cada una se eligió un total de 5 campos al azar y se observaron al microscopio con el aumento 400X., en los que se contó el número total de células polimorfonucleares (PMN), así como el número total de células de cualquier tipo en los 5 campos. Para la interpretación de las citologías se obtuvo el porcentaje de PMN (%PMN) usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ PMN} = \frac{\# \text{ PMN} \times 100\%}{\# \text{ Células totales}}$$

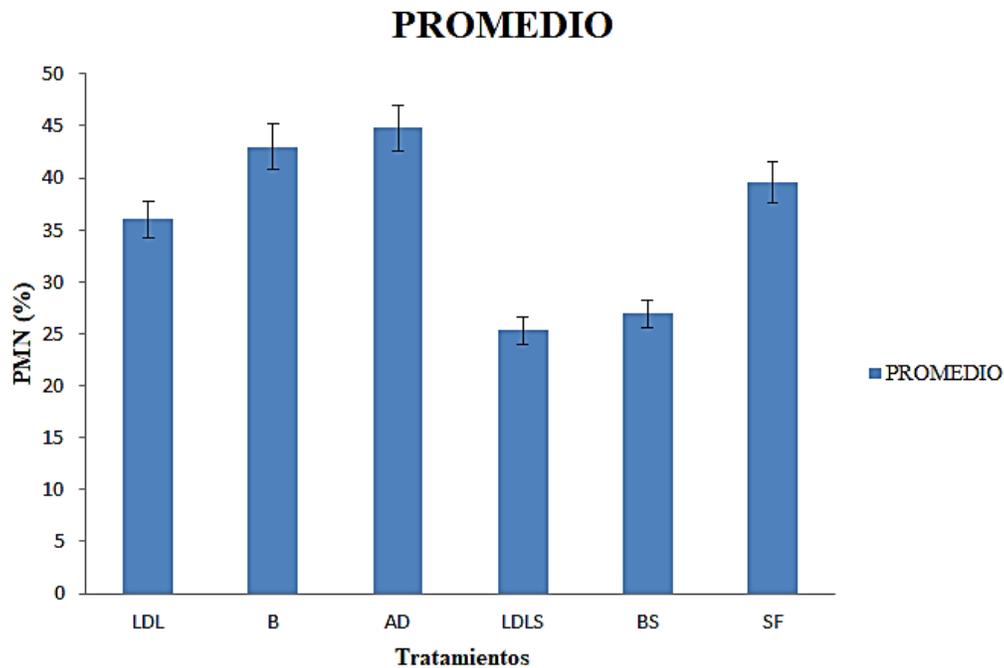
Estadístico

Los porcentajes de PMN obtenidos en las citologías fueron analizados mediante el procedimiento “modelos lineales generalizados” del programa SPSS, utilizando estimadores de máxima verosimilitud. Los factores de predicción fueron el tratamiento, el tiempo post-tratamiento, la interacción tratamiento x tiempo, la tinción y la burra (bloque). Para las comparaciones múltiples se utilizó el método de Bonferroni.

RESULTADOS

Porcentaje de PMN en los tratamientos

Al promediar el %PMN a lo largo de las horas de la toma de muestra (Gráfica 1) se observa que la respuesta inflamatoria en los tratamientos con diluyente sin semen, B (43%) y LDL (36%), obtuvieron un mayor %PMN que los tratamientos que usaron diluyente con semen, LDLS (25.3%) y BS (26.9%), siendo estos dos últimos los que tuvieron un %PMN significativamente menor ($p < 0.05$) a todos los tratamientos, y aquellos en los que se observó una mayor reacción inflamatoria fueron los tratamientos AD (44.8% PMN), B (43%) y S (39.6%). Se observa que con respecto al tratamiento con SF se obtuvo un mayor %PMN (S 39.6%) en comparación con los tratamientos en los que se utilizó el semen congelado (LDLS 25.3% y BS 26.9%)

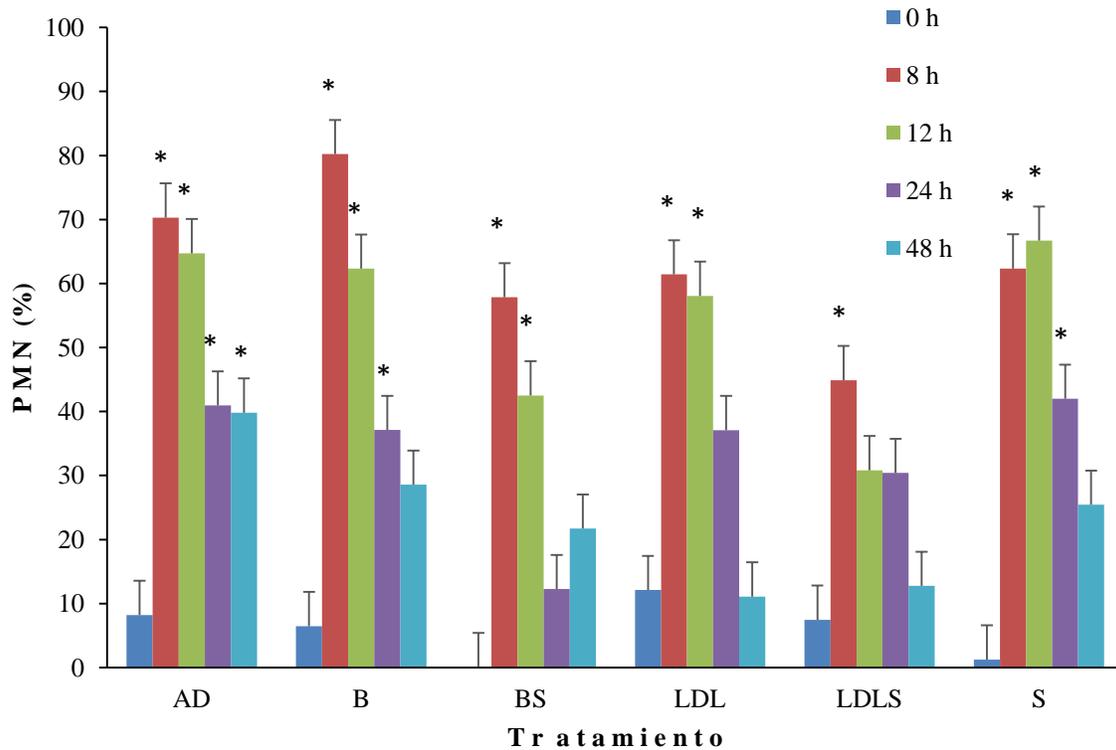


Gráfica 1: Gráfica que representa el promedio del %PMN a lo largo de las horas de toma de muestra de cada uno de los tratamientos

Duración de la inflamación

En la Gráfica 2 se muestra la duración de la inflamación donde en todos los tratamientos el pico máximo ocurrió a las 8hrs, a excepción del tratamiento con SF que fue a las 12hrs, mientras que con LDLS duro menos observándose una notable disminución desde las 8 h, los tratamientos LDL

y BS su inflamación se mantuvo alta a las 12hrs y empezó a disminuir a las 24h, los tratamientos B y SF se observó una disminución de la inflamación hasta las 48hrs hrs y el AD es el tratamiento que mantuvo un alto %PMN hasta las 48h.



Gráfica 2: Representa la media \pm error estándar del porcentaje de PMN por hora y por tratamiento. Los asteriscos indican los momentos en los que el % de PMN es significativamente mayor.

En el Cuadro 8 se encuentran todos los valores promedios del %PMN encontrados en los frotis de cada uno de los tratamientos (AD, B, LDL, SF, BS y LDLS) antes (0 h) y después de la IA (8, 12, 24 y 48 h), observándose una diferencia significativa a las 8 h en el tratamiento con LDLS donde hubo menor %PMN (44.9%) que el tratamiento con B (80.2%); de igual manera a las 12 h con LDLS hubo menor %PMN (30.8%) en comparación con los tratamientos con SF, AD y B que obtuvieron un mayor % PMN con 66.7%, 64.7% y 62.3% respectivamente. Mientras que el resto de las horas (0, 24 y 48) no se observaron diferencias significativas. En la figura 11 y 12 se muestra la comparación entre los campos de las citologías de los diluyentes B y BS y los de LDL y LDLS a diferentes horas,

Cuadro 7: Valores promedio del porcentaje de células PMN encontradas en los frotis de las burras que recibieron cada uno de los tratamientos, las letras indican diferencias significativas entre tratamientos

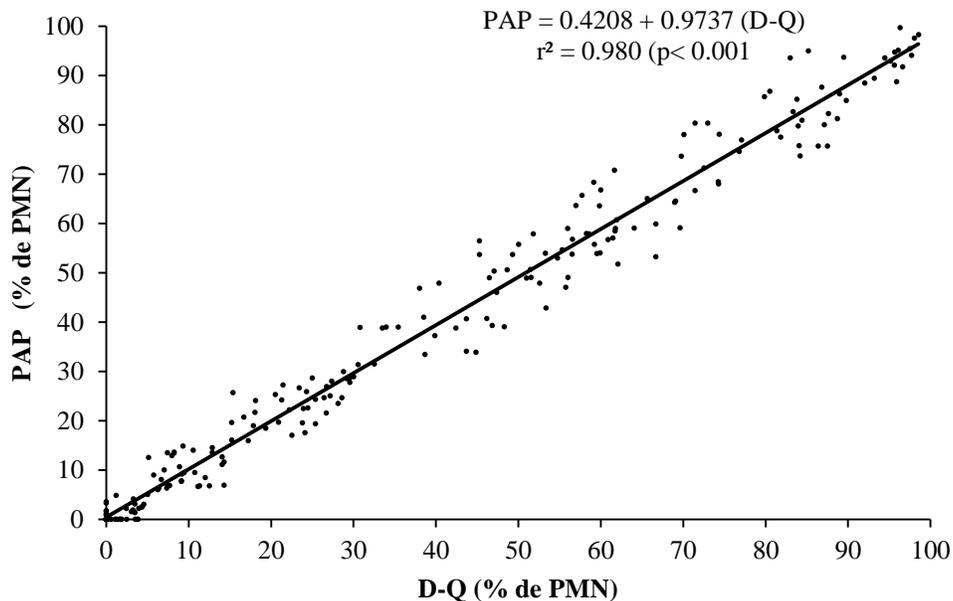
Hora	AD ¹	B ²	LDL ³	SF ⁴	BS ⁵	LDLS ⁶
0 h	8.2 ± 5.3	6.5 ± 5.3	12.1 ± 5.3	1.3 ± 5.7	0.1 ± 5.3	7.5 ± 5.3
8 h	70.3 ± 5.3ab	80.2 ± 5.3b	61.4 ± 5.3ab	62.3 ± 5.7ab	57.9 ± 5.3ab	44.9 ± 5.3a
12 h	64.7 ± 5.3b	62.3 ± 5.3b	58.1 ± 5.3ab	66.7 ± 5.7b	42.5 ± 5.3ab	30.8 ± 5.3a
24 h	40.9 ± 5.3	37.1 ± 5.3	37.1 ± 5.3	42.0 ± 5.7	12.3 ± 5.3	30.4 ± 5.3
48 h	39.8 ± 5.3	28.6 ± 5.3	11.1 ± 5.3	25.4 ± 5.7	21.7 ± 5.3	12.8 ± 5.3
Promedio	44.8 ± 2.4c	43.0 ± 2.4c	36.0 ± 2.4bc	39.6 ± 2.6c	26.9 ± 2.4ab	25.3 ± 2.4a

1 AD Agua desionizada; 2 B BotuCRIO; 3 LDL Lipoproteína de baja densidad; 4 SF Semen fresco ; 5 BS Botucurio con semen; 6 LDLS Lipoproteína de baja densidad con semen.

Los valores que no comparten por lo menos una literal son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$)

Comparación entre tinciones

Se realizó un análisis de regresión entre ambos métodos de tinción que se muestra en la gráfica 3, y se observó que el coeficiente de correlación entre ambos métodos es altamente significativo ($p < 0.001$), el coeficiente de determinación indica que existe un 98 % de coincidencia entre ambas tinciones.



Gráfica 3: Análisis de regresión entre los valores obtenidos al utilizar las tinciones de Diff Quick o Papanicolau. El coeficiente de correlación (0.980) es altamente significativo ($p < 0.001$).

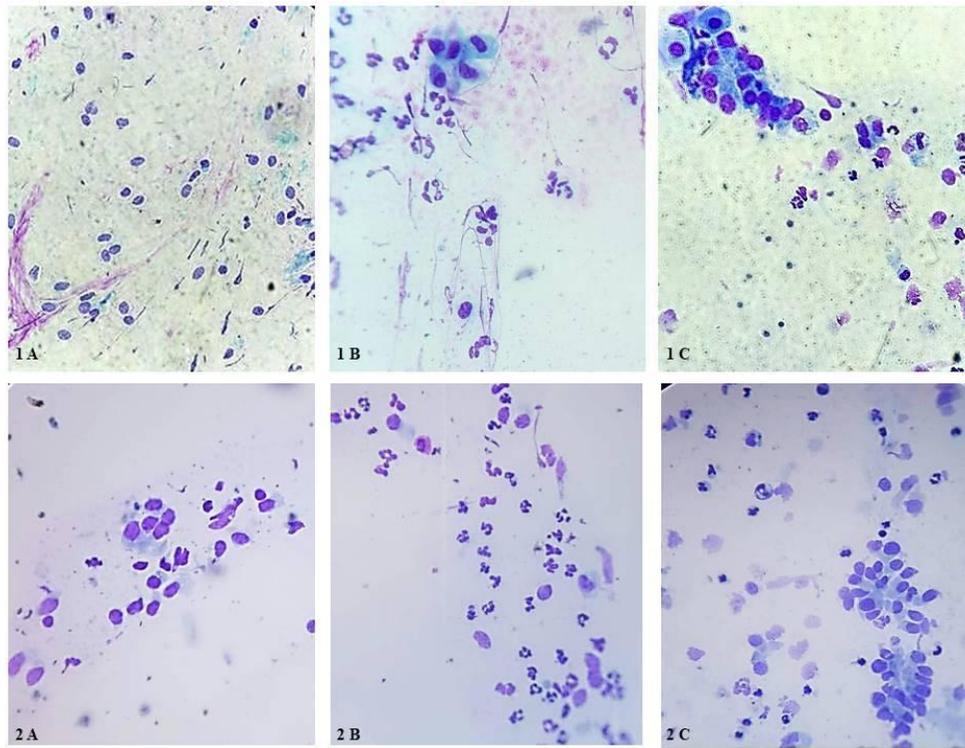


Figura 11: Citología Collarina 1A 0hrs B; 1B 8hrs B; 1C 48hrs B; 2A 0hrs BS; 2B 8hrs BS; 2C 48hrs BS

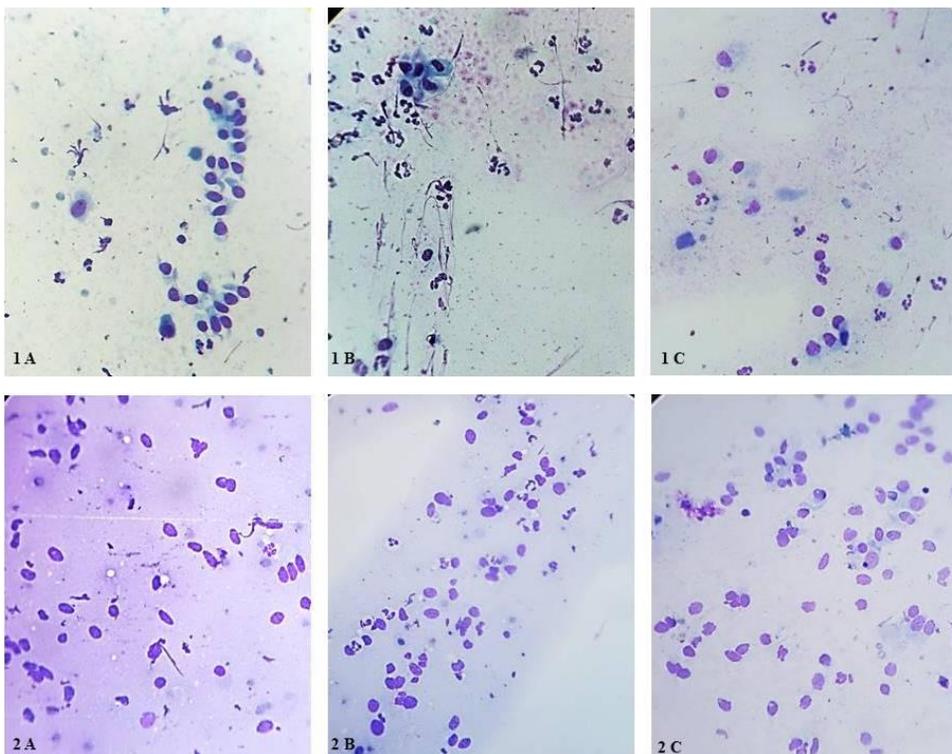


Figura 12: Citología Domino 1A 0hrs LDL; 1B 8hrs LDL; 1C 48hrs LDL; 2A 0hrs LDLS; 2B 8hrs LDLS; 2C 48hrs LDLS

DISCUSIÓN

En relación a los resultados obtenidos en éste estudio se confirma que la combinación del diluyente con semen (LDLS 25.3% y BS 26.9%) actúa en conjunto para inducir y modular una respuesta inflamatoria leve (Gorgens et al., 2005 y Kotilainen et al, 1994) y que el diluyente sin semen (LDL 36% y B 43%) provoca una mayor respuesta inflamatoria, porque al igual que con los espermatozoides, las células endometriales que entran en contacto con este líquido inseminado se activan para sintetizar y liberar citocinas y otros mediadores, lo que causa la quimiotaxis de PMN (Robertson 2007), provocando así una reacción inflamatoria exacerbada parecida a los resultados que se obtendrían si se inocula un agente bacteriano (Jasko et al., 1992 y Williamson et al., 1987), estos datos concuerdan con la investigación hecha por Taylor et al 2009 quienes realizaron estudios en cerdas y perras observando que había mayor cantidad de PMN solo con los diluyentes, que en los diluyentes con semen.

El agua desionizada (AD) es aquella que pasa por un proceso de cambio iónico para quedar libre de sales y minerales, con lo que se logra una mayor pureza (Valdivia et al., 2010), y en este estudio se utilizó para evaluar la respuesta inflamatoria por si sola, ya que es un ingrediente que se utiliza en el diluyente de LDL, sin embargo encontramos que el uso de este ingrediente por si solo produce un mayor %PMN (AD 64.7%), puesto que al ser considerada una solución hipotónica, al entrar en contacto con el tejido endometrial provocó un incremento en la permeabilidad de la membrana celular causando que el agua penetre en la célula hasta provocar una ruptura de la misma (Smeltzer y Bare, 2005) y una mayor migración de PMN al sitio, sin embargo, se necesitan más investigaciones sobre el efecto del AD en el endometrio debido a que es el primer trabajo en donde se emplea éste tipo de solución; en otros estudios se ha utilizado solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se ha reportado que causa una menor respuesta inflamatoria (95%), aunque no hay diferencias significativas si se compara con otros diluyentes como el de yema de huevo (84%) y leche descremada (97%) (Nikolakopoulos y Watson, 1997; Palm et al., 2008; Williamson et al., 1987)

En el presente trabajo se observó a las 8hrs que el semen fresco (SF 62.3%) causó una mayor respuesta inflamatoria que los tratamientos con semen congelado (LDLS 44.9% y BS 57.9%), en las yeguas se ha observado que a las 6hrs tiene una mayor respuesta inflamatoria con semen

congelado con el diluyente BotuCRIO (65%) que con semen fresco (38.3%)(Kotilainen et al., 1994; Recalde, 2014); este incremento del %PMN en semen fresco en nuestro estudio puede deberse a la presencia del INRA 96 debido a que contiene componentes de la leche, ya que se ha reportado que los diluyentes que contienen leche descremada provocan una mayor inflamación endometrial que los diluyentes con YH, por las proteínas que contiene la leche (Kotilainen et al., 1994; Palm et al., 2008).

En éste estudio la duración de la inflamación varía entre tratamientos: En el tratamiento con AD a las 8hrs ocurrió el pico máximo con 70.3%PMN, disminuyendo paulatinamente a las 12hrs con 64.7%PMN, a las 24hrs con 40.9%PMN y a las 48hrs con 39.8%PMN, en comparación con los demás tratamientos fue en el que se observó una mayor respuesta inflamatoria a ésta hora. Al ser el primer estudio en el que se evalúa la reacción inflamatoria con AD no hay datos que confirmen lo encontrado. En el tratamiento con B a las 8hrs ocurrió el pico máximo con 80.2%PMN siendo éste tratamiento el que mayor respuesta inflamatoria tuvo a ésta hora; empezando a disminuir a las 12hrs con 62.3%PMN, a las 24hrs se observó una marcada disminución con 37.1%PMN y a las 48hrs con 28.6%PMN, sin embargo, aún no hay estudios que evalúen la respuesta inflamatoria del diluyente GLY sin semen. En el tratamiento con LDL a las 8hrs ocurrió el pico máximo con 61.4%PMN, comenzó a disminuir a las 12hrs con 58.2%PMN, a las 24hrs con 37.1%PMN y a las 48hrs con 11.1%PMN; de los 6 tratamientos fue el que tuvo una menor inflamación a esta hora. Palm et al (2008) en su estudio también observo que el diluyente que contenía YH tuvo un menor %PMN a las 8hrs (84%) en comparación con el diluyente hecho a base de leche descremada (97%). En el tratamiento con SF a las 8hrs se observa un 62%PMN, a diferencia de los otros tratamientos, su pico máximo ocurrió a las 12hrs con 66.7%PMN, empezando a disminuir a las 24hrs con 42%PMN y alcanzando un 25.4%PMN a las 48hrs; Kotilainen et al. (1994) observaron que en las yeguas el pico máximo de inflamación ocurrió a las 6hrs con SF teniendo 38.3%PMN. En el tratamiento con BS a las 8hrs ocurrió el pico máximo con 57.9%PMN, disminuyendo a las 12hrs con 42.5%PMN, notándose una marcada disminución a las 24hrs con 12.3%PMN, sin embargo, a las 48hrs esta inflamación vuelve a incrementar a 21.7%PMN. Sabatani (2013) encontró que al evaluar la respuesta inflamatoria con GLY a las 8hrs tiene un 63.2%PMN, a las 10hrs llegó a su pico máximo con 68.6%PMN y a las 24hrs se observó una disminución con 53.5%PMN. En el tratamiento con LDLS a las 8hrs ocurrió el pico máximo con 44.9%PMN,

disminuyendo a las 12hrs con 30.8%PMN, siendo este tratamiento el que menor respuesta inflamatoria tuvo a estas horas, sin embargo, se nota una ligera disminución a las 24hrs con 30.4%PMN y a las 48hrs esta inflamación disminuyó hasta 12.8%PMN, siendo el primer estudio en el que se evalúa la reacción inflamatoria con LDL no hay datos que corroboren lo encontrado

A diferencia de las yeguas en las que se ha demostrado que la inflamación se resuelve de las 32-48 hrs post-IA, en el caso de las burras aún no se sabe a las cuántas horas se puede considerar que ésa inflamación se ha resuelto o si ya se trata de una endometritis persistente, ya que al ser el primer estudio que evalúa la duración de la inflamación en burras desde las 0 hrs hasta las 48 hrs encontramos que ésta continúa en todos los tratamientos.

En ésta investigación, al comparar los resultados de las citologías endometriales, utilizando una tinción de tipo Romanowsky (Diff-Quick) y otra tipo tricrómica (Papanicolaou) se observó que hay un 98% de coincidencia entre los resultados de ambas tinciones, esto quiere decir que las dos técnicas son igual de eficaces y no afecta en la calidad de los resultados como lo menciona Jörundsson et al., (1999), por lo que en el futuro se sugiere utilizar la técnica que resulte más accesible y práctica,

En este estudio no se encontró ninguna relación en la cantidad de líquido uterino acumulado post-servicio y lo encontrado con el %PMN (Anexo 1), éstos resultados concuerdan con lo investigado por Sabatani (2013) en donde se observó que no hay relación con la cantidad de PMN y la presencia o ausencia de líquido uterino.

CONCLUSIÓN

En el presente estudio se demostró que los diluyentes en conjunto con el semen modulan la respuesta inflamatoria en las burras y que no sólo los espermatozoides son los responsables de la quimioatracción de PMN, sino que también ingredientes como los diluyentes o el agua desionizada.

También se demostró que ambas técnicas de tinción (D-Q y PAP) para realizar las citologías endometriales son igualmente eficaces para determinar la inflamación.

Éstos resultados abren las puertas a futuras investigaciones para determinar en qué momento se resuelve la inflamación en las burras.

ANEXO 1

Cuadro 9: Comparación de los valores obtenidos en todos los tratamientos en las citologías (%PMN) y lo encontrado en el ultrasonido (USG)

Hora	AD ¹		B ²		BS ³		LDL ⁴		LDLS ⁵		S ⁶	
	PMN	USG*	PMN	USG*	PMN	USG*	PMN	USG*	PMN	USG*	PMN	USG*
0 h	8.2	1	6.5	1	0.1	1	12.1	1	7.5	1	1.3	1
8 h	70.3	1	80.2	1	57.9	2	61.4	2	44.9	2	62.3	2
12 h	64.7	2	62.5	2	42.5	1	58.9	1	30.8	1	66.7	1
24 h	40.9	1	37.1	1	12.3	1	37.1	1	30.4	1	42	1
48 h	39.8	1	28.6	1	21.7	1	11.1	1	12.8	1	25.4	1
\bar{X}	44.8	1	43	1	26.9	1	36	1	25.3	1	39.6	1

1 AD Agua desionizada; 2 B BotuCRIO; 3 BS Botucrío con semen; 4 LDL Lipoproteína de baja densidad; 5 LDLS Lipoproteína de baja densidad con semen; 6 S Semen fresco.

*USG: 1 Sin alteraciones; 2 Líquido 4mm cuerpo útero

REFERENCIAS

Acha, D.; Hidalgo, M.; Ortiz, I., Galvez, M.; Carrasco, J.; Gomez-Arrones, V. and Dorado, J. 2015. 'Freeze ability of Andalusian donkey (*Equus asinus*) spermatozoa: effect of extenders and permeating cryoprotectants.' *Reprod Fert Develop*, 28: 1990-1998.

Alghamdi A.S. y Troedsson M.H.T., 2002, 'Concentration of nitric oxide in uterine secretion from mares susceptible and resistant to chronic post-breeding endometritis'. *Theriogenology*, 58(2-4): 445-448.

Alvarenga, M.; Papa, F.; Landim-Alvarenga, F. and Medeiros, A. 2005. 'Amides of cryoprotectants for freezing stallion semen: a review'. *Anim Reprod Sci*, 89: 105-113.

Álvarez AL, Serres C, Crespo F, Santiago I, Mateos E, Gomez-Cuetara C, 2004, 'Natural service and artificial insemination with cooled semen of Zamorano-Leones donkey'. *In: Proceedings of the 15th International Congress Animal Reproduction*, Vol. 2, p. 393.

Álvarez Cristina, González Noelia, Luño Victoria, Martínez Felisa, 2019, 'Alternatives in Donkey semen cryopreservation: Mare vs. Jenny Colostrum', *Reprod Dom Anim.*;54 (Suppl. 4):94–97.

Anton M y Gandemer G. Composition, solubility and emulsifying properties of granules and plasma of egg yolk. *J Food Sci*, v.62, p.484-487, (1997).

Arthur GH, Noakes DE, Pearson H, 1989, *Veterinary reproduction and obstetrics: Theriogenology*. 6ta edición, Great Britain

Aurich C., 2008, 'Recent advances in cooled;semen technology.' *Anim. Reprod. Sci.* 107, 268–275

Ball, B., 2004. 'Técnicas de inseminación histeroscópica y con dosis baja en el equino, *International Veterinary Information Service*

Barzev, G., 2004, 'Donkey utilisation in Bulgaria'. Eds: D. Fielding and P. Starkey, *In: Donkeys, People and Development*, ATNESA, Wageningen , the Netherlands. p235.

Bidot Fernández Adela, 2017, 'Composition, Attributes and Benefits of Goat Milk: Literature Review', *Rev. prod. anim.* 29 (2)

Blanchard T. L., Taylor T. S., Love C. L., 1999 'Estrous cycle characteristics and response to estrus synchronization in mammoth asses (*Equus assinus americanus*).' *Theriogenology*;52: 827–834

Blanchard T. L. and Taylor T. S., 2005, 'Estrous Cycle Characteristics of Donkeys with Emphasis on Standard and Mammoth Donkeys', *IVIS*, New York, USA.

Bollwein H, Sowade C, Stolla R., 2003, 'The effect of semen extender, seminal plasma and raw semen on uterine and ovarian blood flow in mares', *Theriogenology*, 60(4):607-16.

Borba, E.V., 2010, 'Relação entre o fluido uterino e citologia endometrial na égua como indicativo de saúde reprodutiva', Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, Brasil

Bourke M, Mills JN, Barnes AL., 1997, 'Collection of endometrial cells in the mare', *Aust Vet J*; 75: 755–8

Bowen et al, 1987, 'Dynamic changes which accompany acute and chronic uterine infections in the mare.' *J Reprod Fertil Suppl* 35:675-677

Bravo F.L., 2011, 'Efecto de las lipoproteínas de baja densidad liofilizadas sobre la integridad del acrosoma y la membrana espermática equina durante la congelación, tesis de licenciatura, México, D.F.

Brum A.M., Sabeur K., Ball B.A., 2008, 'Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation, *Theriogenology*; 69: 1041-1055

Brumini D, Furlund C B, Comi I, Devold T G, Marletta D, Vegarud G E and Jonassen C M., 2013, 'Antiviral activity of donkey milk protein fractions on echovirus type 5', *International Dairy Journal* 28 109– 111.

Burden Faith A., Du Toit Nicole, Hernandez Gil Mariano, Prado Ortiz Omar y Trawford Andrew F. , 2009, 'Selected health and management issues facing working donkeys presented for veterinary treatment in rural Mexico: some possible risk factors and potential intervention strategies' *Trop Anim Health Prod*

Camacho Rozo César Augusto, 2014, 'Evaluación de los diluyentes INRA 82 y BotuCRIO para la criopreservación espermática de caballos criollos colombianos', Universidad de la Salle Facultad de Ciencias Agropecuarias, Maestría en Ciencias Veterinarias, Bogotá, Colombia

Canisso, I.; Souza, F.; Escobar, J.; Ribeiro, G.; Davies-Morel, M.; Capistrano da Silva, E., Guimarães J. and Linhares-Lima, A. 2008. 'Congelamiento de semen de burro (*Equus asinus*).' *Rev Investig Vet Perú*, 19: 113-125.

Canisso, I.; Carvalho, G.; Davies-Morel, M.; Guimarães, J. and McDonnell, S, 2010. 'Sexual behavior and ejaculate characteristics in Pêga donkeys (*Equus asinus*) mounting estrous horse mares (*Equus caballus*).' *Theriogenology*, 73: 56-63.

Canisso IF, Carvalho GR, Morel MD, Ker PG, Rodrigues AL, Silva EC y Silva MAC, 2011, 'Seminal parameters and field fertility of cryopreserved donkey jack semen after insemination of horse mares'. *Equine Veterinary Journal* 43, 179-183.

Canisso, I.F.; Ball, B.A.; Cray, C.; Williams, N.M.; Scoggin, K.E.; Davolli, G.M.; Squires, E.L.; Troedsson, M.H., 2014, 'Serum amyloid A and haptoglobin concentrations are increased in plasma of mares with ascending placentitis in the absence of changes in peripheral leukocyte counts or fibrinogen concentration'. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 72, 376–385.

Canisso I.F., 2019, 'Key aspects of Donkey and Mule Reproduction' *The Veterinary clinics of North America, Equine practice*, 35 (3): 607-642

Card C., 2005, 'Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares' *Theriogenology*; 64:580–8

Carnota Martínez Sara, 2019, 'Endometritis en la yegua: diagnóstico y tratamiento', Universidad de Santiago de Compostela, Trabajo de Fin de Grado en Veterinaria, Chile

Carroccio A, Cavataio F, Montalto G, D'Amico D, Alabrese L, Iacono G., 2000., 'Intolerance to hydrolysed cow's milk proteins in infants: clinical characteristics and dietary treatment.' *Clin Exp Allergy* 30:1597–603.

Causey, R. C., Ginn, P. S., Katz, B. P., Hall, B. J., Anderson, K. J., & LeBlanc, M. M., 2000, 'Mucus production by endometrium of reproductively healthy mares and mares with delayed uterine clearance', *Journal of reproduction and fertility*, 56, 333-339.

Causey RC., 2006, 'Making sense of equine uterine infections: the many faces of physical clearance.' *Vet J*;172:405–21.

Cazales, N., Fiala-Rechsteiner, S.M., Cavestany, D., & Mattos, R.C, 2018, 'Insemination Dose and Site With Frozen Semen Affects the Sperm Transport and Inflammatory Response in Mares?', *Journal of Equine Veterinary Science*, 66, 109–110.

Clayton R. M., Lindsay F. E. F., Forbes AC ,et al., 1981, 'Some studies of comparative aspects of sexual behavior in ponies and donkeys.' *Appl Anim Ethol*;7:169–174.

Cocchia N, Paciello O, Auletta L, Uccello V, Silvestro L, Mallardo K, et al., 2012, 'Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares.' *Theriogenology*, 77:89–98.

Cochran JD, Amann RP, Froman DP, Pickett BW. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 58C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology* 1984; 22:25–38.

Consejo Equino Anal y Mular (CEAM), 2014. *Acuerdo de competitividad de la Cadena Equina, Asnal y Mular*. Bogotá, D.C.

Contri A., Robbe D, Gloria A., De Amicis I., Veronesi M.C., Carluccio A., 2014, 'Effect of the season on some aspects of the estrous cycle in Martina Franca donkey', *Theriogenology*, 81: 657-661

Cottorello, A.C.P., Amancio, R.C., Henry, M., Borge, I., 2002., 'Effect of storage temperature and extenders on "in vitro" activity of donkey spermatozoa.' *Theriogenology* 58, 325–328.

Cour A. y Sprinkle T., 1985, ' Relationship of endometrial cytology and fertility in the broodmare' *Equine Practice*, 7 (10): 27-36

Cristanelli MJ, Amann RP, Squires EL, Pickett BW. Effects of egg yolk and glycerol levels in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology* 1985;24:681–686.

Dadarwal D, Tandon SN, Purohit GN & Pareek PK, 2004, 'Ultrasonographic evaluation of uterine involution and postpartum follicular dynamics of French Jennies (*Equus asinus*)'. *Theriogenology* 62: 257-264

Dascanio et al., 1997, 'How to perform and interpret uterine cytology.' *Proc Am Assoc (Equine Pract)* 43:182-186

Dascanio, J. J., Schweizer, C., and Ley, W. B., 2001, 'Equine fungal endometritis', *Equine Veterinary Education*, 13(6), 324-329.

Derar RI y Hussein HA., 2011, 'Ovarian Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in jennies in Upper Egypt.' *Veterinary Medicine International*, 6 (4)

Dietz, J. P., Sertich, P. L., Boston, R. C., y Benson, C. E., 2007, 'Comparison of ticarcillin and piperacillin in Kenney's semen extender.' *Theriogenology*, 68(6), 848-852.

Dugo, Kumm, LoPresti, Chiofalo, Salimei, Fazio, Cotroneo, Mondello., 2005, 'Determination of triacylglycerols in donkey milk by using high performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry,' *J.Sep.Sci*, 28, 1023–1030

Dyce KM, Sack WO, Wnsing CJG, 1987, *Text book of veterinary anatomy*, W.B. Saunders Company, Philadelphia

Eisenbach M., 2003, 'Why are sperm cells phagocytosed by leukocytes in the female genital tract?' *Med Hypotheses*; 60: 590-2

Fahy GM; Lilley TH; Linsdell H; Douglas MS; Meryman HT, 1990. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology* 27, 247;268

Ferlding D., 1988, 'Reproductive characteristics of the jenny donkey—*Equus assinus*: a review,' *Trop Anim Health Prod*, 20:161–166.

Fiala SM., Pimentel CA., Mattos AI. George RM., Mattos RC., 2007, 'Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare.' *Theriogenology* 67:556-62

Foulkes JA. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.49, p.277-284, (1977).

Gilmore, J., MCGann, L., Liu, J., Gao, D., Peter, A., Kleinhans, F. & Critser, J., 1995, 'Effects of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa', *Biology of reproduction* , 53 (5): 985-995.

Ginther O. J., Scrabam S. T. & Bergfelt D. R., 1987, 'Reproductive seasonality of the jenny,' *Theriogenology* 27: 587-592

Glenthøj A, Bostofte E, Rank F., 1986, 'Brush cytology from the uterine endocervix.' *Acta Obstet Gynecol Scand*, 65: 689–91.

Gomes, G. M., Jacob, J. C. F., Medeiros, A. S. I., Papa, F. O., and Alvarenga, M. A., 2002, 'Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed', *Theriogenology* 58(2-4), 277-279.

Gorgens A., Leibold W., Klug E., Schuberth HJ, Martinsson G., Zerbe H., 2005, 'Inseminate components are modulating the chemotactic activity of uterine polymorphonuclear granulocytes (PMN) of mares.' *Anim Reprod Sci*, 89: 308-10

Guo H. Y., Pang K., Zhang X. Y., Zhao L., Chen S. W., Dong M. L. and Ren F. Z., 2007, 'Composition, physiochemical properties, nitrogen fraction distribution, and amino acid profile of donkey milk,' *Journal of Dairy Science*, 90: 1635-1643.

Gutjahr, S., Paccamonti, D. L., Pycocock, J. F., Taverne, M. A. M., Dieleman, S. J., & Van der Weijden, G. C., 2000, 'Effect of dose and day of treatment on uterine response to oxytocin in mares', *Theriogenology*, 54(3), 447-456.

Guzmán Wemyss Vicente e Ilabaca Díaz Carolia, 2007, *Utilización de leche de vaca, cabra y oveja en la pequeña empresa*, Fundación para la Innovación Agraria (FIA), Santiago de Chile

Hafez E & Hafez B, 2002. *Caballos En: Reproducción e inseminación artificial en animales*, 7ª edición. Mcgrawhill, Interamericana, México pp. 199;223

Hammerstedt, R., & Graham, J. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29 (1): 26-38.

Henry M., Figueiredo A. E. F., Palhares M. S. & Coryn M., 1987, 'Clinical and endocrine aspects of the oestrous cycle in donkeys (*Equus asinus*)'. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl*, 35: 297-303.

Hoffmann, N.; Ondelhof, H.; Morandini, C.; Rohn, K. and Sieme, H, 2011, 'Optimal concentration of cryoprotectant agent for freezing stallion that are classified "good" or "poor" for freezing', *Anim Reprod Sci*, 125: 112-118

Hu, J.; Li, Q.; Zan, L.; Jiang, Z.; An, J.; Wang, L. and Jia, Y. 2010. 'The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing–thawing.' *Anim Reprod Sci*, 117: 11-17.

Hunter B, Raz T, Grey A, Chirino-Trejo M, Card C, 2006, 'Uterine inflammatory response to simultaneous treatment with frozen semen and bacteria in resistant mares', *In: Proceedings of the 52th convention of the AAEP*, Reproduction, San Antonio, Texas, USA, 52:389-392.

Hurtgen and Cummings, 1982, 'Diagnosis and treatment of fungal endometritis in mares', *Proc Soc Theriogenol*, 18-22

INEGI (1994). México. Resultados definitivos. VII Censo Agrícola-Ganadero 1991.

INEGI (2007). 'Existencias de animales de otras especies por entidad y municipio.' *Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007*. En Línea. Fecha de consulta 25 marzo 2014.<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/tabuladosbasicos/default.aspx?c=17177&s=est>

Jasko DJ, Little TV, Lein DH, Foote RH., 1992, 'Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988)', *J Am Vet Med Assoc*;200:979–85.

Jian-Hong, H.; Zhong-Liang, J.; Rui-Kai, L.; Qing-Wang, L.; Shu-Shan, Z.; Lin-Sen, Z.; Yao-Kun, L. and Xin, L, 2011, 'The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen.' *Cryobiology*, 62: 83-87.

Jiang ZL, Li QW, Hu JH, Li WY, Zhao HW, Zhang SS. Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. *Cryobiology* 2007;54:301e4.

Jirillo F y Magrone T, 2014, 'Anti-inflammatory and anti-allergic properties of donkey's and goat's milk', *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders: Drug Targets*, 14: 27–37.

Jolivet P, Boulard C, Beaumal V, Chardot T, Anton M. Protein components of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *J Agric Food Chem*, v.54, p.4424-4429, (2006).

Jörundsson E, Lumsden JH, Jacobs RM., 1999, 'Rapid staining techniques in cytopathology: A review and comparison of modified protocols for Hematoxylin and Eosin, Papanicolaou and Romanowsky stains.' *Vet Clin Pathol*, 28 (3): 100-108.

Kankofer, M., Kolm, G., Aurich, J.E., Aurich. C., 2005, 'Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C'. *Theriogenology*, 63, 1354-1365.

Katila T, 1995, 'Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen,' *Biol Reprod Monogr*, 1:515–517.

Katila T., 1996, 'Uterine defence mechanisms in the mare'. *Anim Reprod Sci*; 42: 197-204

Katila, T., 2001, 'Sperm–uterine interactions. A review,' *Anim. Reprod. Sci.* 68, 267–272.

Katila, T., 2005, 'Effect of the inseminate and the site of insemination on the uterus and pregnancy rates of mares,' *Anim. Reprod. Sci*, 89, 31–38.

Katila T., 2012, 'Post-,mating inflammatory responses of the uterus'. *Reprod Domest Anim*; 47: 31-41

Katila, T., 2016, 'Evaluation of diagnostic methods in equine endometritis', *Reproductive Biology* 16 (3), 189 – 196.

Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH, 2005, 'A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows,' *Can Vet J*, 46: 255–9.

Kazim G, Reilas T, Katila T, 2004, 'Effect of frozen semen on the uterus of mares with pathological uterine changes,' *Reprod Nutr Dev*, 44: 243–50.

Kazim G, Reilas T, Katila T., 2005, 'Effect of insemination and site on uterine inflammatory response of mares,' *Theriogenology*, 63: 2504-2512.

Kenney RM., 1978, 'Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death,' *J Am Vet Med Assoc*, 172: 241–62.

Kotilainen, T., Huhtinen, M., Katila, T., 1994, 'Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus,' *Theriogenology*, 41, 629–636.

Kugler W, Grunenfelder HP, Broxham E, 2008, *Donkey breeds in Europe*, Monitoring Institute for Rare Breeds and Seeds in Europe, Europa.

Lara-Villoslada F, Olivares M, Xaus J, 2005, 'The balance between caseins and whey proteins in cow's milk determines its allergenicity,' *J Dairy Sci* 88: 1654–60

LeBlanc MM, 1991, 'Diseases of the reproductive system: the mare', In: Colahan PT, Mayhew IG, Merritt AM, Moore JN, editors, *Equine medicine and surgery* 4th ed, American Veterinary Publications, Goleta, pp. 956–63.

LeBlanc, M. M., Neuwirth, L., Asbury, A. C., Mauragis, D., Tran, T., & Klapstein, E., 1994, 'Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis', *Equine VetJ*, 26 (2) ,109 - 113

LeBlanc MM, Magsig J, Stromberg AJ., 2007, 'Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares', *Theriogenology*, 68: 403–12.

LeBlanc MM, Causey RC., 2009, 'Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility'. *Reprod Domest Anim*; 44:10–22.

LeBlanc MM., 2010, 'Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare'. *Reprod Domest Anim*; 2:21–7.

LeBlanc, M. M., 2011, 'Uterine cytology. Equine Reproduction'. 2nd ed. Ames, IA: WileyBlackwell, 1922-1928.

Lemma A, Schwartz HJ, Bekana M. Application of ultrasonography in the study of the reproductive system of tropical Jennies (species *Equus asinus*). *Trop. Anim. Health and Prod.* 2006; 38, 267–274.

Ley, 1981, Endometrial cytology in the mare. MS thesis, Large Animal Medicine & Surgery, Texas A&M University, College Station.

Ley William B., Digraffie Wynne A., Reed G. Holyoak and Slusher Steven H., 2002, 'Chapter 12 Endometrium', Rick L Cowell, & Ronald D. Tyler, *Diagnostic Cytology and Hematology of the Horse*, 2nd edition, Mosby, USA

Lögters, T., Margraf, S., Altrichter, J., Cinatl, J., Mitzner, S., Windolf, J., & Scholz, M. (2009). The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Medical microbiology and immunology*, 198(4), 211

Lun S., He C., Zhang Y., Chen Z., Hu W., Jia W., Zhang Q., 1998, 'Preliminary study on development of follicles and formation of corpus luteum of the jenny and mare by ultrasonography', *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 29 (5): 419-425

Macías García, B., Ortega Ferrusola, C., Aparicio, I. M., Miro´ -Mora´n, A., Morillo Rodriguez, A., Gallardo Bolan˜os, J. M., Gonza´lez Ferna´ndez, L., Balao da Silva, C. M., Rodri´guez Marti´nez, H., Tapia, J. A., and Pe˜na, F. J., 2012,. 'Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential.' *Theriogenology* 77(7), 1280–1289.

Mai H.M., 2014, 'Gross Anatomical Study of the Urogenital System of the Indigenous Nigerian Male Donkey (*Equus africanus africanus*) in Comparison with the Stallion', *Anat Physiol*, 4 (3)

Mao X., Gu J., Sun Y., Xu S., Zhang X., Yang H. and Ren F., 2009, 'Antiproliferative and anti-tumour effect of active components in donkey milk on A549 human lung cancer cells', *International Dairy Journal*, 19: 703–708.

Marcelo H. Miragaya, Deborah M. Neild, Ana E. Alonso, 2018, 'A Review of Reproductive Biology and Biotechnologies in Donkeys', *Journal of Equine Veterinary Science*, 65: 55-61

Marianelli S, Crisci A, Rota A, Panzani D, Camillo F, 2009, 'Valutazione ecográfica dell'involuzione uterina e fertilità nel post-partum in asine amiatine' (*Ultrasonographic evaluation of uterine involution and fertility in the post-partum of Amiata jennies*). In: Proceedings VII SIRA conference.

Martin-Hirsch P, Jarvis G, Kitchener H, Lilford R., 2000, 'Collection devices for obtaining cervical cytology samples', *Cochrane Database Syst Rev*

Mattioli RC, Zinsstag J, Pfister K, 1994, 'Frequency of trypanosomosis and gastrointestinal parasites in draught donkeys in The Gambia in relation to animal husbandry', *Trop Anim Health Prod*, 26: 102-108.

Matthews N. S. & Taylor T. S., 2005, 'Inseminación artificial en asnos miniaturas', *Revista Veterinaria Argentina*

Matthijs A., Engel B., Woelders H., 2003, 'Neutrophil recruitment and phagocytosis of boar spermatozoa after artificial insemination of sows, and the effects of inseminate volumen, sperm dose and specific additives in the extender' *Reproduction*; 125: 357-67

Medeiros A, Gomes G, Carmo, Papa F, Alvarenga M. 2002. 'Cryopreservation of stallion sperm using different amides'. *Theriogenology* 58: 273-276.

Meira C., Ferreira J. C. P., Papa F. O. & Henry M., 1995, 'Study of the estrous cycle in donkeys (*Equus asinus*) using ultrasonography and plasma progesterone concentrations', *Biol Reprod Monograph* 1: 403-410

Melo. C., Zahn, F, & Martin. 2007. 'Influence of semen storage and cryoprotectant o post-thwa viability and fertility of stallion spermatozoa.' *Journal of Equine Veterinary Science*, v.27, n.4, p.171-175.

Miró, J., Taberner, E., Rivera, M., Pena, ~ A., Medrano, A., Rigau, T., Penalba, ~ 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: 1017–1022.

Miró J, Vilés K, Fernández M, Fábregas N, Soares J, García W., 2011, 'Induced acute endometritis by frozen semen insemination in donkey', *Anim Reprod Sci*, 46: 130.

Miró, J.; Vilés, K.; García, W.; Jordana, J. and Yeste, M., 2013, 'Effect of donkey seminal on sperm-polymorphonuclear neutrophils attachment in vitro', *Anim Reprod Sci*, 140: 164-178.

Miro J. y Papas Marion, 2018, 'Post-Artificial Insemination Endometrial Inflammation and its Control in Donkeys' *Journal of Equine Veterinary*, 65: 38-43

Miró J, Marín H, Catalán J, Papas M, Gacem S, Yeste M., 2020a, 'Seminal plasma, sperm concentration, and sperm-PMN interaction in the donkey: an in vitro model to study endometrial inflammation at post-insemination'. *Int J Mol Sci.*; 21(10): 3478

Miró J, Gutiérrez-Reinoso M, da Silva JA, Fernandes C, Rebordão MR, Alexandre-Pires G, 2020b, 'Collagen and eosinophils in Jenny's endometrium: do they differ with endometrial classification?' *Front Vet Sci*; 7:631.

Moffet PD; Bruemmer JE; Card C; Squires EL, 2003. Comparison of dimethyl formamide and glicerol for cryopreservation of equine spermatozoa. Proceedings Society for Theriogenology Annual Conference, p. 42

Mohamed M.M. Kandiel y Anwar A., 2017, 'Ultrasonographic Appearance and Echo-pattern Characterization of Donkeys' *Journal of Advanced Veterinary Research* 7 (2): 39-46

Monti G, Bertino E, Muratore M C, Coscia A, Cresi F, Silvestro L, Fabris C, Fortunato D, Giuffrida M G and Conti A, 2007, 'Efficacy of donkey's milk in treating highly problematic cow's milk allergic children: an in vivo and in vitro study', *Pediatric Allergy and Immunology*, 18: 258–264.

Montoya J.D., Rojano B., Restrepo G., 2017, 'Efecto de la suplementación del diluyente sobre la calidad del semen de asno a la descongelación', *Archivos de zootecnia* vol. 66, núm. 255, p. 334

Moore A.I., Squires E.L., Bruemmer J.E., Graham J.K., 2006, 'Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa', *Journal of Equine Veterinary Science* 5: 215 – 218

Morillo Rodriguez A; Balao da Silva C; Macías; García B; Gallardo Bolaños JM; Tapia JA; Aparicio IM; Ortega; Ferrusola C; Peña FJ, 2012. Dimethylformamide improves the in vitro characteristics of thawed stallion spermatozoa reducing sublethal damage. *Reprod. Domes. Anim.* 47(6), 995;1002.

Möstl, E., Spendier, H., Kotrschal, H., 2001, 'Concentration of immunoreactive progesterone and androgens in the yolk " of hen's eggs (*Gallus domesticus*)', *Wien. Tierarztl. Mschr.* 88, 62–65

Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M., 2002, 'Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen.' *Theriogenology*, 57

Mrema, M., 2004, 'An economic analysis of the utilisation of donkeys in Botswana: the past and the future.' Eds: D. Fielding and P. Starkey, Animal Traction Network for Eastern and Southern Africa (ATNESA), Wageningen, the Netherlands. p164.

Musa HL, 1998, 'Animal power utilization for agricultural production in Nigeria', *National Conference on Pastoralism in Nigeria*, National Animal Production Research Institute, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria

Nikolakopoulos, E., Watson, E.D., 1997. 'Does artificial insemination with chilled, extended semen reduce the antigenic challenge to the mare's uterus compared with natural service?' *Theriogenology* 47, 583–590.

Nishikawa, Y., and Y. Yamasaki, 1949, 'Studies on the reproduction in asses II. Growth of follicles in ovaries and the ovulation during oestrus' *Jpn J Zootechn. Sci*, 20, 28–32.

Oliveira JV, Alvarenga MA, Melo CM, Macedo LM, Dell'Aqua JA Jr, Papa FO, 2006 'Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. In: Evans MJ', *Anim Reprod Sci* 94: 82–84.

Oliveira JV, Papa FO, Melo-Ona C, Monteiro GA, Puoli-Filho JNP, Alvarenga AM, 2012, 'New procedures to freeze donkey semen and its influence on mares and jennies fertility' *In: Proceedings XI International Symposium on Stallion Reproduction, Journal of Equine Veterinary Science*, 32: 475-518.

Oliveira, J; Oliveira, P; Melo, C; Guasti, P; Monteiro, G; Sancler da Silva, Y; Papa, P; Alvarenga, M; Dell'Aqua, J. and Papa F, 2016, 'Strategies to improve the fertility of fresh and frozen donkey semen', *Theriogenology*, 85: 1267-1273.

Olson, M. E, Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., & Read, R. R, 2002, 'Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics', *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66 (2), 86-92.

Pace MM y Graham EF. Components in egg yolk, which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci*, v.39, p.1144-1149, (1974).

Palacios, A., 1994, 'Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen.' *Vet Méx*, 25(3): 207.

Palm F, Walter I, Budik S, Kolodziejek J, Nowotny N, Aurich C., 2008, 'Influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and on expression of IL-1 β , IL6, TNF- α and COX-2 mRNA in the equine endometrium', *Theriogenology*;70:843- 851.

Peña F.J., Macías-García B., Samper J.C., Aparicio L.M., Tapia J.A. y Ortega-Ferrusola C., 2011, 'Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols'. *Theriogenology*, 76: 1117 - 1186

Pérez, O. J., 2006, 'Efeito da adição fracionada de Dimetil formamida e das curvas de congelamento na viabilidade in vitro pós-descongelamento do espermatozoide equino'. Trabajo de Grado para optar por el titulo de Magister. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Federal de Minas Gerais.

Papa FO; Zahn FS; Dell'Aqua Jr JA; Alavarenga MA, 2002. Utilização Do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen equino. Rev. Bras. Reprod. Anim. 26(3), 184;187.

Papas M, Noto F., Bonilla S., Marín H., Miró J., 2017, 'Histological findings from endometrium biopsies in jennies' *Reprod Domestic Anim*; 52:121

Pasch, L., Schmidt, A., & King, W., 2021, 'Clinical Observations After Prebreeding Intrauterine Plasma Infusion in 18 Mares Inseminated With Thawed Frozen Semen', *Journal of equine veterinary science*, 99.

Piccione G, Fazio F, Caola G and Refinetti R, 2008, 'Daily rhythmicity in nutrient content of asinine milk', *Livestock Science*, 116: 323– 327.

Platt, H., Atherton, J. G., & Oskov, I., 1976, 'Klebsiella and Enterobacter organisms isolated from horses', *Epidemiology Y Infection*, 77(3), 401-408.

Pugh D.G., 2002, 'Donkey Reproduction', *AAEP PROCEEDINGS*, 48: 113-114.

Purdy SR, 2005, 'Artificial Insemination for Miniature Donkeys', *In: Veterinary Care of Donkeys*, Matthews NS and Taylor TS. (Eds.) International Veterinary Information Service, Ithaca NY

Pycock JF, Allen WE, 1990, 'Inflammatory components in uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis', *Equine Vet J*, 22: 422–5.

Ramos S., 1996, *Anotaciones sobre inseminación artificial*, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de la Salle, Santa Fé de Bogotá

Rebordão, M. R., Carneiro, C., Alexandre-Pires, G., Brito, P., Pereira, C., Nunes, T., & Ferreira-Dias, G. (2014). Neutrophil extracellular traps formation by bacteria causing endometritis in the mare. *Journal of reproductive immunology*, 106, 41-49

Recalde, E. C. S. (2014). Influência da qualidade do sêmen criopreservado equino sobre a taxa de prenhez, hemodinâmica uterina e endometrite pós-cobertura. Master's Dissertation, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, University of São Paulo, São Paulo

Renner Martin T.F.P., Forstenpointner G., Weissengruber G. E. & Eberhardt L., 2009, 'Gross Anatomy of the Female Genital Organs of the Domestic Donkey (*Equus asinus* Linne', 1758)', *Anat. Histol. Embryol.* 38, 133–138

Restani P, Ballabio C, Di Lorenzo C, Tripodi S and Fiocchi A, 2009, 'Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395: 47–56.

Robertson, S.A., 2007, 'Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs', *J. Anim. Sci.*, 85

Rossi, T., Papa, F., Santos, T., Macedo, L., Alvarenga, M. & Melo, C. (2003). Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelamento de sêmen equino com meio MP50. *Rev Bras Reprod Anim*, 27 (2003), pp. 350–352

Roszel JF, Freeman KP., 1988, 'Equine endometrial cytology', *Vet Clin North Am Equine Pract*, 4: 247–62.

Rota Alessandra, Magelli Corinna, Panzani Duccio & Camillo Francesco, 2008, 'Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiata donkey spermatozoa' *Theriogenology*, 69; 176–185

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 in donkey jennies.' *Theriogenology* 78, 1846–1854.

Rozeboom KJ, Rocha-Chavez G., Troedson MH., 2001, 'Inhibition of neutrophil chemotaxis by pig seminal plasma in vitro: a potential method for modulating post-breeding inflammation in sows.' *Reproduction*; 121: 567-72

Sabatini Chiara, 2013, 'Effects of seminal plasma on cryopreserved semen and artificial insemination in the Amiata donkey (*Equus Asinus*)', Università di Pisa Scuola di Dottorato in Scienze Agrarie e Veterinarie Programma di Medicina Veterinaria, Pisa. Italia.

Salimei E, Fantuz F, Coppola R, Chiofalo B, Polidori P and Varisco G, 2004, 'Composition and characteristics of ass's milk', *Animal Research*, 53 67–78.

Salimei E y Fantuz F, 2012, 'Equid milk for human consumption', *International Dairy Journal*, 24: 1–13

Samper, J. & Garcia, A., 2008, 'Post-thaw characteristics and fertility of stallion semen frozen in extenders with different cryoprotectants', *Veterinary Reproductive Services*.

Samper Juan C., Stanford Mike S., French Hillary M. y Chapwanya Aspinas, 2016, 'Post-breeding inflammation in mares after insemination with large and low doses of fresh or frozen semen', *Pferdeheilkunde*, 32

Santos, G.F., Henry, M., Sampaio, I.B.M., Gastal, E.L., 1995, 'Effect of cooling system and rate of cooling on sperm quality of donkey semen preserved at 5°C', *Equine Reproduction VI. Biol. Reprod. Mono*, 1: 761–767.

Saric L C, Saric B M, Mandic A I, Torbica A M, Tomic J M, Cvetkovic D D and Okanovic Đ G, 2012, 'Antibacterial properties of Domestic Balkan donkeys' milk', *International Dairy Journal*, 25: 142–146.

SAVE foundation, 2013, Added value of donkey breeds in Europe: project report January 2013: http://www.agrobiodiversity.net/topic_network/donkey/Donkey/Donkey-reportEN.pdf

Schober D., Aurich C., Nohl., Gille L., 2007, 'Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa', *Theriogenology*; 68: 745-754

Schuberth HJ., Taylor U., Zerbe H., Waberski D., Hunter R., Rath D., 2008, 'Immunological responses to semen in the female genital tract' *Theriogenology*; 70: 1174-81

Secretaria de Industria y Comercio (SIC), 1975, 'Dirección General de Estadística. V Censo Agrícola, Ganadero y Ejidal. México'.

Serres, C., Rodriguez, A., Alvarez, A.L., Santiago, I., Gabriel, J., Gomez-Cuétara, C., Mateos, E., 2002, 'Effect of centrifugation and temperature on the motility and plasma membrane integrity of Zamorano-Leon'es donkey semen', *Theriogenology* 58: 329–332.

Sisson S, Grossman JD, Getty R, 1975, *The anatomy of the domestic animals*, 4ta edición, W.B. Saunders Company, Toronto, Ontario.

Smeltzer S.C. y Bare B.G., 2005 'Líquidos y electrolitos: equilibrio y distribución'. Enfermería Medicoquirúrgica de Brummer y Suddarth. Vol I y II. México: McGraw-Hill Interamericana 10^a ed 2005, 282-332

Squires E, Keith S, Graham J. 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62: 1056-1065. doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.12.024

Taberner E, Medrano A, Peña A, Rigau T, Miró J., 2008, 'Oestrus cycle characteristics and prediction of ovulation in Catalanian jennies', *Theriogenology*, 70(9): 1489-97.

Taylor, U., Zerbe, H., Seyfert, H.M., Rath, D., Baulain, U., Langner, K.F., Schuberth, H.J., 2009, 'Porcine spermatozoa inhibit post-breeding cytokine induction in uterine epithelial cells in vivo', *Anim. Reprod. Sci.* 115, 279–289.

Terraciano, P.B.; Bustamante Filho, I.C.; Miquelito, L.V. et al. 2008. Equine spermatozoa cryopreservation comparing two freezing curves with commercial diluters: a laboratory analysis. *Ciência Rural*, v.38, n.7, p.1972-1977.

Tibary A. & Bakkoury M., 1994, Particularités de la reproduction chez les autres espèces équine. In: Tibary, A & Bakko u ry, M. (eds), *Reproduction équine, Tome I: La jument.*, Actes Editions, pp 385-400.

Tibary A., Sghiri A., Bakkoury M, Fite C., 2006 'Reproductive patterns in donkeys' *Proceedings of the 9th International Congress of World Equine Veterinary Association Washington State University College of Veterinary Medicine, Pullman, WA, USA, Marrakech, Morocco.*

Tidona F, Sekse C, Criscione A, Jacobsen M, Bordonaro S, Marletta D and Vegarud G , 2011, 'Antimicrobial effect of donkey's milk digested in vitro with human gastrointestinal enzymes', *International Dairy Journal*, 21: 158–165.

Trimbos JB, Arentz NPW, 1986, 'The efficiency of cytobrush versus the cotton swab in the collection of endocervical cells in cervical smears', *Acta Cytol*, 30:261–3

Trimeche A, Renard P, Tainturier D, 1998 'A procedure for poitou jackass sperm cryopreservation.' *Theriogenology* 50, 793–806

Troedsson, M. H., & Liu, I. K. (1991). Uterine clearance of non-antigenic markers (^{51}Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 44, 283-288

Troedsson, M. H., & Liu, I. K., 1993. Correlations between histologic endometrial lesions in mares and clinical response to intrauterine exposure with *Streptococcus zooepidemicus*. *American journal of veterinary research*, 54(4), 570-572

Troedsson, M. H., Scott, M. A., & Liu, I. K., 1995 'Comparative treatment of mares susceptible to chronic uterine infection', *Am J Vet Res* 56(4): 468–472.

Troedsson MHT, Ababneh MM, Ohlgren AF, Madill S, Vetscher N, Gregas M., 2001a, 'Effect of periovulatory prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ on pregnancy rates and luteal function in the mare', *Theriogenolgy*, 55: 1891-1899.

Troedsson MH., Loset K., Alghamdi AM., Dahms B., Crabo BG., 2001b 'Interaction between equine semen and endometrium: the inflammatory response to semen' *Anim Reprod Sci*; 68: 273-8

Troedsson MH., Desvousges A., Alghamdi AS., Dahms B., Dow CA., Hayna J., Valesco R., Collahan PT., Macpherson ML., Pozor M., Buhi WC., 2005, 'Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination' *Anim Reprod Sci*; 89: 171-86

Valdivia-Medina, Rodes Yanet, Pedro-Valdés, Sandra, Laurel-Gómez, Maylin, 2010, "AGUA PARA USO EN LABORATORIOS". *Boletín Científico Técnico INIMET*, núm.1, pp.3-10

Valle E, Raspa F, Giribaldi M ,Barbero R , Bergagna S, Antoniazzi Setal., 2017, 'A functional approach to the body condition assessment of lactating donkeys as a tool for welfare evaluation', *PeerJ*

Van Gisbergen KP, Sanchez-Hernandez M, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y., 2005, 'Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN.' *J Exp Med* 2005;201:1281–92.

Vandeplassche GM, Wesson JA, Ginther OJ., 1981, 'Behavior, follicular and gonadotropin changes during the estrous cycle in donkeys', *Theriogenology*, 16: 239–249.

Vásquez-López Margarita, Maffrand Carmen, Losinno Luis & Maldonado Juan G., 2000 'Manual de citología endometrial en yeguas'. *Rev. Col. Cienc. Pec.* Vol 13.

Vendramini OM, Guintard C, Moreau J, et al., 1998, 'Cervix conformation a first anatomical approach in Baudet du Poitou Jenny asses', *Anim Reprod Sci*, 66: 741–744

Veronesi MC, Villani M, Wilsher S, Contri A, Carluccio A, 2010, 'A comparative stereological study of the term placenta in the donkey, pony and thoroughbred', *Theriogenology*, 74: 627–31.

Vincenzetti S, Polidori P, Mariani P, Cammertoni N, Fantuz F and Vita A, 2008, 'Donkey's milk protein fractions characterization', *Food Chemistry*, 106: 640–649.

Vidament M, Vincent P, Martin FX, Magistrini M, Blesbois E, 2009, 'Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not.' *Anim Reprod Sci* 112, 22–35.

Viles K., Rabanal R., Rodríguez-Prado M., Miró J., 2013, 'Effect of ketoprofen treatment on the uterine inflammatory response after AI of jennies with frozen semen' *Theriogenology*; 79: 1019-1026

Wall RJ, Foote RH. Fertility of Bull sperm frozen and stored in clarified egg yolk-Tris-glycerol extender. *J Dairy Sci* 1999;82:817e21.

Watson, P. F. and G. J. Morris., 1987, 'Cold shock injury in animal cells', K. Bowler and B. J. Fuller (eds), *In Temperature and Animal Cells*, Society for Experimental Biology, Cambridge, pp. 311–340.

Williamson P, Munyua S, Martin R, Penhale WJ, 1987, 'Dynamics of the acute uterine response to infection, endotoxin infusion and physical manipulation of the reproductive tract in the mare', *J Reprod Fertil Suppl*, 35:317–25.

Wu, T.W., Cheng, F.P., Chen, I.H., Yang, C.H., Tsai, M.Y., Chang, M.H., Wang, J.H., Wu, J.T., 2013. The combinatorial effect of different Equex STM paste concentrations, cryoprotectants and the straw-freezing methods on the post-thaw boar semen quality. *Reprod. Domest. Anim.* 48, 53–58

Wu C., 2017, 'Status of Chinese donkey industry', *Proceedings of 1st International Symposium on Donkey Science*, Dong'E, Shandong, P.R. China. August 14th-17th.

Zafracas, A.M., 1975, 'Candida infection of the genital tract in Thoroughbred Mares', *J. Reprod. Fert., Suppl.* 23, 349-351.

Zhang X Y, Zhao L, Jiang L, Dong M L and Ren F Z, 2008, 'The antimicrobial activity of donkey milk and its microflora changes during storage', *Food Control*, 19: 1191–1195