

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**REACCIÓN INFLAMATORIA UTERINA LUEGO DE LA INSEMINACIÓN
ARTIFICIAL CON ESPERMATOZOIDES VIVOS Y MUERTOS EN YEGUAS**

“por”

Milagros CLERC DANVILA

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2020**

PÁGINA DE APROBACIÓN

La siguiente a la portada es la página de aprobación. Esta página debe contener los nombres completos y las firmas de las personas que han sido designadas por la Facultad para evaluar el trabajo así como la fecha de aprobación y el o los autores del trabajo

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia, especialmente a mi madre, por su apoyo incondicional, por ayudarme a superar desafíos que fueron apareciendo a lo largo de la carrera y disfrutar juntos los logros obtenidos.

Al Dr. Nicolás Cazales por ofrecerme ser parte de este trabajo, pero además por su vocación como docente, estando siempre dispuesto ante dudas e inquietudes con respecto a esta temática.

A los funcionarios de biblioteca que siempre me sacaron alguna duda y colaboraron en la recopilación de material bibliográfico.

A todos mis amigos que me ayudaron en la tesis, tanto en la parte práctica como la teórica, Mateo, Sabrina, Joaquín, Sol, Irene, Sebastián, Santiago, Manuel.

Finalmente, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los que considero mis mentores: María Eugenia Cadario, Sofia Kovacsy, María Fernanda Duarte y Ariel Silva. Fueron clave en mi camino a la reproducción equina, motivándome en todo momento. Cada uno de ellos dejó su impronta de conocimiento y experiencia en mí.

TABLA DE CONTENIDOS

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDOS	4
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	7
SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. Endometritis pos-cobertura (interacción espermatozoide-útero).....	11
2.1.1. Yeguas susceptibles a la endometritis persistente pos-cobertura.....	12
2.2 Técnicas de evaluación de la respuesta inflamatoria uterina	14
2.3. Reacción inflamatoria.....	15
2.4 Papel de los espermatozoides en la reacción inflamatoria uterina.....	18
2.5 Papel del plasma seminal en la reacción inflamatoria uterina pos-cobertura.....	19
2.6 El uso de semen congelado y su influencia sobre la reacción inflamatoria uterina pos-cobertura	21
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVOS	23
4.1 General	23
4.2 Particular	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1 Lugar y momento	24
5.2 Animales	24
5.2.1 Padrillo	24
5.2.1.1 Colecta, congelamiento y procesamiento del semen	24
5.2.1.2 Tratamiento del semen.....	25
5.2.2 Yeguas	25

5.2.2.1 Examen ginecológico y citológico.....	25
5.3 Diseño experimental.....	26
5.4 Colecta y procesamiento de muestras	26
5.5 Análisis estadístico.....	27
6. RESULTADOS	27
7. DISCUSIÓN.....	28
8. CONCLUSIONES.....	30
9. BIBLIOGRAFÍA.....	31

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Media (\pm EE) de motilidad espermática total y progresiva del semen descongelado evaluado por CASA..... 27

Figura 1. Número de PMNs/mL (\pm EE) recuperados en el lavado uterino 4 h después de la inseminación con espermatozoides vivos y muertos y grupo control.. 28

RESUMEN

Luego de que el semen es depositado en el útero, ocurre un proceso inflamatorio que es considerado fisiológico, transitorio y necesario. La inflamación es caracterizada por un rápido influjo de polimorfonucleares (PMNs) al útero; la cual tiene como principal función eliminar, mediante la fagocitosis restos celulares, bacterias, espermatozoides en exceso y otros contaminantes, favoreciendo un ambiente propicio para la llegada del embrión entre el día 5 a 6 pos-ovulación. En los equinos, inseminar con semen congelado desarrolla una respuesta inflamatoria uterina más exacerbada que haciéndolo con semen fresco o refrigerado, ocasionando tasas de preñez inferiores. El objetivo de este trabajo fue investigar la influencia de los espermatozoides muertos en la dosis de semen congelado sobre la respuesta inflamatoria uterina en yeguas. 36 yeguas reproductivamente sanas, destinadas a faena fueron aleatoriamente asignadas en 3 grupos experimentales: SM (n = 10) - inseminadas con semen congelado con la totalidad de espermatozoides muertos; SV (n = 10) - inseminadas con semen congelado comercial con > 35 % de espermatozoides con motilidad progresiva y grupo control (n = 16) - yeguas que no fueron inseminadas. El número de PMNs recuperados de los lavados uterinos fue menor ($P < 0,05$) cuando se inseminó con el semen muerto ($45 \times 10^6 \pm 9,8 \times 10^6$ PMNs/mL) comparado con semen vivo ($82,7 \times 10^6 \pm 15,7 \times 10^6$ PMNs/mL). En conclusión, los espermatozoides muertos generaron una reacción inflamatoria endometrial menor que los espermatozoides vivos a las 4 h pos-inseminación en yeguas reproductivamente sanas. Los espermatozoides muertos parecerían no ser los responsables de la gran reacción inflamatoria generada tras inseminar con semen congelado.

SUMMARY

When breeding the mare, semen is deposited in the uterus. An inflammatory process occurs, but is physiologic, transitory and necessary to prepare the uterus for the arrival of the embryo 5 to 6 days after ovulation. The inflammation is characterized by an influx of polymorphonuclear (PMNs) to the uterus, whose main function is to eliminate through phagocytosis debris, bacteria, excess sperm and other contaminants. Comparing with fresh and refrigerated semen, the use of frozen/thawed semen results in a more marked and prolonged uterine inflammatory response. Consequently pregnancy rates after frozen semen inseminations are still disappointingly low. The objective of this work was to investigate the influence of dead spermatozoa of frozen semen dosis on the uterine inflammatory response in mares. 36 reproductively healthy mares, destined for slaughter, were randomly assigned in 3 experimental groups: SM (n = 10) – inseminated with frozen semen with the totally dead spermatozoa; SV (n = 10) – inseminated with frozen semen with > 35 % of progressively motile spermatozoa and untreated group (n = 16) – mares that were not inseminated. The total number of PMNs recovered from uterine lavages was lower (P <0.05) in group SM ($45 \times 10^6 \pm 9,8 \times 10^6$ PMNs/mL) compared with SV group ($82,7 \times 10^6 \pm 15,7 \times 10^6$ PMNs/mL). In conclusion, dead spermatozoa produced a lower endometrial inflammatory reaction than live sperm 4 h pos-insemination reproductively healthy mares. Dead spermatozoa seems not to be the responsible of the great inflammatory reaction generated after inseminating mares with frozen semen.

1. INTRODUCCIÓN

En Uruguay, los deportes ecuestres han ganado gran interés tras importantes reconocimientos nacionales e internacionales, esto lleva a aumentar el nivel de inversión por parte de los criadores y a intensificar el manejo reproductivo. En los últimos 25 años ha incrementado el uso de la inseminación artificial con semen congelado, aunque todavía no se alcanzan los porcentajes que se observan en los bovinos (Alonso et al., 2016). Las principales ventajas que ofrece el semen congelado son: acelerar la mejora genética con mayor difusión de sementales de alto valor, uso de semen de padrillos ya muertos o castrados; elimina la necesidad de desplazar las yeguas, evita enfermedades de transmisión venérea, evita la sobreutilización del padrillo, previniendo así el desgaste y permite la utilización de genética ubicada en otros países o continentes (Alonso et al., 2016).

La principal causa de pérdida económica en la industria equina es la endometritis (Vega, 2011). Definimos endometritis como la inflamación de la mucosa que recubre el interior del útero (Crum et al., 2011). Troedsson (1999) la subdivide en cuatro categorías, basado en la etiología y fisiopatología: (1) endometrosis (endometritis degenerativa crónica), (2) endometritis de transmisión sexual, (3) endometritis persistente pos-cobertura y (4) endometritis crónica infecciosa. Durante este texto, nos vamos a enfocar principalmente en la endometritis pos-cobertura. El tema es muy amplio y de gran interés en el campo de la reproducción, ya que es reconocida como la principal causa de fracaso en concebir la preñez en yeguas (Gutjahr et al., 2000).

Independientemente de la técnica de servicio empleada, monta natural o inseminación artificial (IA), a diferencia de otras especies, en equinos el semen es depositado directamente en el interior del útero (Vega, 2011). Solo un pequeño número de espermatozoides son transportados a las trompas uterinas, lugar donde ocurre la fertilización. El resto de los espermatozoides eyaculados, acompañado de fluido seminal, extensores de semen, bacterias, y otros contaminantes, permanecen en el útero, provocando una reacción inflamatoria aguda, llamada endometritis inducida por el apareamiento (LeBlanc, 2003). Esta inflamación es un evento fisiológico, transitorio y en la mayoría de los casos breve (Katila, 1995). Antiguamente, se creía que dicha inflamación era causada por la contaminación bacteriana en el útero, al momento del servicio. Ahora, es sabido que los espermatozoides por sí solos son los principales causantes de dicha endometritis (Katila, 2001). La respuesta inflamatoria se basa principalmente en la migración de neutrófilos, inmunoglobulinas y sistema de

complemento dentro del lumen uterino en respuesta a los espermatozoides (LeBlanc, 2003).

Las yeguas reproductivamente sanas o fértiles resuelven la inflamación dentro de las 24 a 36 h seguidas de la IA, y son consideradas resistentes a la endometritis pos-servicio (LeBlanc, 2003; Troedsson y Woodward, 2016). En cambio, las yeguas que no logran eliminar la inflamación pasadas las 48 h del servicio, son consideradas susceptibles a la endometritis pos-servicio (Maischberger et al., 2008). Éstas, tienen mayor dificultad para evacuar el residuo generado por la inflamación, suelen acumular fluido y exceso de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) en el interior del útero por más de 48 h, siendo perjudicial para el endometrio y por ende nocivo para el embrión, poniendo en peligro el desarrollo de la preñez (LeBlanc, 2003).

En equinos, la IA se puede realizar usando semen fresco, refrigerado o congelado. Aunque ha incrementado el uso de semen congelado en el mercado equino, una limitante de su uso son las menores tasas de preñez obtenidas cuando se las compara con semen fresco o refrigerado (Sanchez et al., 2008). Yeguas fértiles inseminadas con semen refrigerado se espera un rango de 50-70% de preñez por ciclo, mientras que se reportan tasas de 40-50% con la utilización de semen congelado (Squires, 2009). Estudios previos han demostrado que el semen concentrado (ejemplo: semen congelado) induce una reacción inflamatoria mayor que el semen diluido (Kotilainen et al., 1994; Katila, 2012). Kotilainen et al. (1994) sugirieron que una de las principales causas de esta fuerte reacción inflamatoria además de la alta concentración espermática, es la alta proporción de espermatozoides muertos (alrededor de un 70%), sumado a la baja proporción de plasma seminal presente en el semen congelado equino (Katila, 2005). Por lo tanto, la selección espermática a través de técnicas de centrifugación por gradientes de Percoll que permite la separación de espermatozoides viables de los dañados o muertos, podría contribuir a reducir la reacción inflamatoria endometrial luego de la IA (Gomes et al., 2019).

Es importante estudiar los aspectos que afectan la inflamación endometrial en la yegua luego de la IA con semen congelado. Al jugar los espermatozoides un rol preponderante en el establecimiento de la reacción inflamatoria endometrial, se requiere de un óptimo manejo reproductivo, sobre todo para aquellas yeguas susceptibles a la endometritis pos-servicio para poder lograr buenos índices de preñez (Maischberger et al., 2008). El objetivo de este estudio fue determinar el efecto que tienen los espermatozoides

muerdos sobre la reacción inflamatoria endometrial en la yegua luego de la IA con semen congelado.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Endometritis pos-cobertura (interacción espermatozoide-útero)

Al momento del servicio, ingresan además de espermatozoides, cuerpos extraños, bacterias y detritos directamente dentro del útero, causando una reacción inflamatoria llamada endometritis pos-cobertura (Troedsson et al., 2001). Es un evento fisiológico y predecible; inclusive se cree que esta reacción inflamatoria es necesaria para eliminar contaminantes introducidos en el útero (Christoffersen y Troedsson, 2017). Para promover una rápida eliminación de los agentes causales de la inflamación, el útero dispone de métodos de defensa: físicos, celulares y humorales (Brito y Barth, 2003). Los mecanismos físicos, son constituidos por barreras físicas y por la limpieza mecánica; como son las contracciones uterinas las cuales se encargan de evacuar el excedente a través del cérvix (LeBlanc, 2003), al mismo tiempo que son importantes para el transporte espermático (Katila, 2011). Mientras tanto, los mecanismos celulares y humorales se refieren a la respuesta inmunológica local, donde intervienen PMNs, linfocitos mononucleares, inmunoglobulinas y mediadores de la inflamación (Fiala, 2004).

La endometritis se caracteriza por el influjo de PMNs hacia la luz del útero donde se opositoriza el blanco para luego fagocitarlo (Katila, 1996; Troedsson et al., 2001). Comúnmente inicia entre 0,5 a 1 h pos-servicio y ocurre el pico inflamatorio entre las 6 y 12 h. En yeguas sanas, a las 48 h se encuentra resuelta la inflamación (Katila, 1996). La persistencia de la inflamación pasadas las 48 h pos-servicio, se considera una amenaza para la viabilidad del embrión (Maischberger et al., 2008; Vega, 2011). Por lo tanto, la duración y la severidad de dicha inflamación, caracterizada por un incremento en el grado de edema uterino y/o la presencia de fluido intrauterino acumulado es un factor crítico para determinar la habilidad de esa madre en concebir y mantener la preñez (Samper, 2009).

Generalmente 10-15% de la población de las yeguas cubiertas desarrollan una inflamación endometrial persistente causado por el semen con efectos negativos en la fertilidad (Troedsson et al., 2006). Esta condición la lleva a ser la tercera patología más común de las hembras adultas luego de los trastornos digestivos y respiratorios (Traub-

Dargatz et al., 1991) y una de las principales causas de subfertilidad en yeguas (Traub-Dargatz et al., 1991; Zent et al., 1998).

2.1.1. Yeguas susceptibles a la endometritis persistente pos-cobertura

La yegua susceptible a la endometritis pos-servicio es aquella incapaz de limpiar el fluido uterino, detritos celulares y bacterias en las 48 h posterior al servicio, prolongando la inflamación, y generando un ambiente embriotóxico (Troedsson, 1999; Troedsson et al., 2001). La presencia de bacterias y/o productos inflamatorios en el útero son incompatibles con la sobrevivencia del embrión (Bucca et al., 2008).

Lo más común, es que las yeguas que padecen endometritis persistente pos-apareamiento, sean añosas vírgenes o multíparas (LeBlanc et al., 1998; Cadario et al., 1999), con una historia repetida de acumular fluido intrauterino pos-cobertura (Pycocck, 2006). En consecuencia, sufren cambios degenerativos continuos en el aparato reproductor, proporcionando bajas tasas de preñez. Troedsson (1999) sugirió que las yeguas con dificultad para evacuar la inflamación del útero, padecen de alguna alteración en el mecanismo de defensa uterina. La respuesta inmune innata se encuentra alterada en las yeguas susceptibles a endometritis persistente, pero no así en las yeguas resistentes (Woodward et al., 2013). La relajación del cérvix, contracciones miometriales, buen drenaje linfático y contacto con el padrillo, favorece la evacuación uterina y por ende a la correcta resolución del cuadro inflamatorio (Katila, 2001).

La susceptibilidad se debe probablemente a diversos factores o una combinación de ellos. Parece que el principal defecto que lleva a la endometritis persistente es la actividad miometrial anormal; pudiendo disminuir la frecuencia, intensidad y duración de las contracciones uterinas, dificultando la correcta evacuación mecánica del útero (LeBlanc, 2003). No obstante, Rigby et al. (2001) sugirió que la endometritis persistente pos-cobertura no se encuentra solo ligada a la edad ni al número de partos. Otros factores que también colaboran en la endometritis son, cambios vasculares en el endometrio, conocido como angiopatías (Nikolakopoulos y Watson, 1997; Rigby et al., 2001); alteración en las respuestas hormonales (Troedsson, 1999; Rigby et al., 2001); sobreproducción de mucus (Causey, 2006), y deficiencia en el sistema inmunitario. En yeguas multíparas, además, se incluyen alteraciones en la interacción neuromuscular (Rigby et al., 2001), o deterioro del drenaje linfático debido a la dilatación uterina (Troedsson, 1999) y descenso ventral del útero (LeBlanc et al., 1998). Finalmente,

factores genéticos también pueden predisponer a ciertas yeguas al desarrollo de endometritis persistente, aunque aún no se ha establecido una base genética específica (LeBlanc, 2003).

La degeneración vascular de la mucosa uterina parece contribuir al retraso de la evacuación uterina, predisponiendo a la persistencia de la endometritis (LeBlanc, 2003). Se ha observado esclerosis (angiosis) venosa y arterial en biopsias endometriales obtenidas de yeguas susceptibles (Schoon et al., 1999). Los cambios degenerativos en los vasos sanguíneos incluyen la elastosis, fibrosis y fibroelastosis de la pared de los vasos, así como fibrosis perivascular y procesos de calcificación. La magnitud de las lesiones aumenta con los partos y con la edad de la yegua. La angiosis reduce la fertilidad indirectamente, mediante la disminución de la perfusión endometrial y el drenaje uterino causado por la reducción de la función venosa. El hallazgo clínico de yeguas que padecen angiosis, es la persistencia del edema endometrial después de la ovulación. La linfangiectasia endometrial es un evento normal durante el estro, desarrollando el típico edema estral de la pared uterina, pero debe desaparecer durante diestro, siempre y cuando los mecanismos de drenaje estén intactos. El descenso ventral del útero en yeguas, generalmente viejas y parturientas, parece contribuir al problema (LeBlanc, 2003).

El drenaje linfático uterino se encuentra desgastado en algunas yeguas susceptibles. Los ganglios linfáticos uterinos evacúan material de la luz uterina y drenan el edema uterino. LeBlanc et al. (1995) comprobaron que al infundir 40 mL de tinta china en el útero de yeguas fértiles en diestro, la tinta fue absorbida por la circulación linfática. Sin embargo, cuando fueron infundidos úteros de yeguas susceptibles, con retraso en la evacuación uterina, solo una pequeña porción de tinta fue captada por el drenaje linfático. Estas últimas yeguas presentaron histológicamente una endometritis severa difusa y crónica (LeBlanc et al., 1995).

El cérvix incompetente, también predispone a la endometritis pos-cobertura. El cuello uterino o cérvix, cumple una doble función; por un lado es una barrera física, protegiendo al útero de contaminantes del exterior, y por otro permite la evacuación y el drenaje uterino. En yeguas con cérvix incompetentes, la función se encuentra comprometida; lo que genera una relajación cervical insuficiente durante el estro, dificultando el drenaje uterino. Es muy común observar dicho caso en las yeguas viejas vírgenes (Pycock, 2006). Por el contrario, puede suceder un cierre inadecuado del

cérvix durante el diestro y preñez, predisponiendo a la entrada de microorganismos al interior del útero, poniendo en riesgo la preñez (Bucca, 2013).

La caída ventral del útero dentro de cavidad abdominal ocurre tras el deterioro del tracto reproductivo y la distensión de los ligamentos anchos por preñeces repetidas (LeBlanc et al., 1998). LeBlanc et al. (1998), observaron que las yeguas que presentaban retraso en la evacuación del fluido intrauterino, presentaban el útero caído; en cambio en yeguas resistentes a endometritis y fértiles, el útero estaba posicionada horizontalmente.

2.2 Técnicas de evaluación de la respuesta inflamatoria uterina

El diagnóstico clínico de endometritis se basa principalmente en un conjunto de datos: historia clínica de la yegua, presencia líquido intrauterino, edema uterino exacerbado, ciclos estrales cortos y corrimiento vulvar y/o cervical. Sin embargo, estos signos suelen estar ausentes en la endometritis subclínica, y se deben confirmar mediante exámenes complementarios como citología, bacteriología y biopsia endometrial (LeBlanc y Causey, 2009).

Rutinariamente el diagnóstico de inflamación pos-servicio se realiza mediante ultrasonido. Se evalúa el grado de edema y acumulación de fluido uterino. La presencia de > 2 centímetros de altura de fluido intrauterino durante el estro, persistencia de líquido intrauterino pasadas las 72 h pos-inseminación y fluido presente durante el diestro son indicadores de una yegua susceptible a la endometritis inducida por apareamiento y está asociada a bajas tasas de preñez (Brinsko et al., 2003).

El uso clínico del examen citológico es determinar la presencia o ausencia de una respuesta inflamatoria activa en el útero (LeBlanc, 2011). La citología es dos veces más sensible que el cultivo en la detección de endometritis (LeBlanc y Causey, 2009). La muestra se toma directamente del epitelio mucoso del endometrio mediante hisopo, cepillo, biopsia o lavaje de bajo volumen (LeBlanc, 2011). En una endometritis aguda, mediante microscopio óptico, la citología endometrial revela la presencia de células epiteliales, PMNs (neutrófilos), glóbulos rojos, detritus, mucus, también puede detectar hifas de hongos, levaduras y bacterias si están presentes en el endometrio (LeBlanc, 2011; Cocchia et al., 2012). Un método de interpretación del frotis citológico es contar el número de neutrófilos (PMNs) en 10 campos del microscopio óptico utilizando un objetivo de 40X y obtener un número promedio de PMNs por cada campo observado, para categorizar el grado de inflamación. Yeguas con 0-2 PMNs/campo son consideradas

normales; 3-5 PMNs/campo se clasifican como yeguas con moderada inflamación; mientras que yeguas con > 5 PMNs/campo se clasifican con severa inflamación (Brinsko et al., 2011).

2.3. Reacción inflamatoria

El proceso inflamatorio uterino es un evento complejo que se desarrolla luego de detectado un antígeno; donde convergen componentes celulares y humorales, que resulta generalmente en la destrucción y eliminación de dicho antígeno (MacKay, 2000). Los principales mecanismos de resolución de la endometritis en las yeguas son la respuesta inmune innata (ej. neutrófilos, NK, IFN, TNF) junto con el “clearance” mecánico uterino (Woodward et al., 2013). También colabora la respuesta inmune adaptativa, o sea aquella que guarda memoria específica para cada agente infeccioso (ej. anticuerpos, linfocitos T y B) (Woodward y Troedsson, 2013).

Cualquier contaminación intrauterina, principalmente semen, bacterias y detritos celulares; inician una respuesta inflamatoria (Kotilainen et al., 1994). El útero de las yeguas secreta cierto fluido que brinda propiedades quimioatrayentes dando inicio a un rápido proceso de quimiotaxis que atrae a los PMNs hacia el sitio de inflamación (Pycock y Allen, 1990). Los PMNs neutrófilos son las primeras células en llegar a la luz uterina (Lehrer et al., 1988). Investigaciones recientes colocan a los PMNs, no sólo como el principal tipo celular responsable del proceso de inflamación agudo, sino como una célula con potencial modulador de esta respuesta (Silva, 2016). Dentro de los 30 minutos seguidos a la inseminación, estas células ya se encuentran presentes en el lumen uterino, alcanzando el pico inflamatorio entre las 6 y 12 h pos-IA (Fiala et al., 2007). Solo unos pocos PMNs son detectados a las 24-48 h en yeguas reproductivamente sanas (Katila, 1995). La función principal de los PMNs es destruir patógenos y eliminar restos celulares, bacterias y espermatozoides, favoreciendo así una rápida resolución del proceso inflamatorio (Katila, 2012). Dicha acción la lleva a cabo de dos formas: el mecanismo de acción primario es fijar y capturar microorganismos mediante la fagocitosis; donde el sistema de complemento juega un papel importante al opsonizar los antígenos para una fagocitosis efectiva (Håkansson et al., 1993). El segundo mecanismo de destrucción lo realiza mediante la emisión de NETs (trampas extracelulares de neutrófilos), compuesto por extensiones de ADN e histones con péptidos antimicrobianos (Woodward et al., 2013). Los NETs se extienden hacia un determinado antígeno y lo captura facilitando la fagocitosis por los PMNs (Amulic y Hayes, 2011).

Se encontró que los PMNs de yeguas susceptibles poseen una disminución tanto en la habilidad fagocítica (Watson et al., 1987) como en la funcionalidad general en comparación con los PMNs de yeguas resistentes (Liu et al., 1985). Otros investigadores observaron que los PMNs disfuncionales de las yeguas susceptibles pudieron volverse completamente funcionales en un entorno adecuado (Troedsson et al., 1993). Concluyendo que las yeguas susceptibles poseen una capacidad opsonizante alterada en sus secreciones uterinas en comparación con las yeguas resistentes (Troedsson et al., 1993).

Simultáneamente participan una serie de mediadores de la inflamación que tienen un rol fundamental en la resolución del proceso inflamatorio. Son proteínas reguladoras secretadas por células inmunitarias (Katila, 2012). Las citoquinas son los mediadores más importantes. Fueron definidas como “moléculas de señalización celular asociadas con el reconocimiento y la resolución de la respuesta inflamatoria” (Woodward et al., 2013). Cumplen diversas funciones, de las cuales se destacan: reclutamiento de PMNs a la zona de inflamación y activación de células de defensa incluyendo neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y granulocitos (Katila, 2012). Las citoquinas pro-inflamatorias inician la inflamación y, una vez producida, ocurre una cascada de eventos inflamatorios (Woodward et al., 2013). Existe un equilibrio especial entre las respuestas pro y anti-inflamatorias. Las citoquinas anti-inflamatorias regulan las citoquinas pro-inflamatorias controlando la reacción inflamatoria y protegiendo al endometrio (Parham, 2005). Una respuesta óptima y eficiente al antígeno es fundamental para una resolución efectiva de la inflamación sin generar un mayor daño a la mucosa uterina (Schroder et al., 2004).

Las principales citoquinas que participan en una inflamación aguda, son interleuquina 1 (IL1) alfa y beta; y el factor de necrosis tumoral (TNF), alfa y beta (Kuby et al., 1992). La IL1 es secretada por varios tipos celulares e inducen la liberación de otras citoquinas e histaminas. También la IL1 se encarga de la transcripción de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y de la producción de prostaglandinas E₂ (PGE₂) (Kuby et al., 1992). El óxido nítrico (ON) es un mediador de la relajación del músculo liso (Woodward y Troedsson, 2013). Se evidenció mediante biopsias uterinas que yeguas susceptibles presentaron mayor concentración de iNOS y ON que yeguas resistentes 13 h después de la inseminación; sugiriendo que provoca una disminución en la contractilidad miometrial la cual colabora en la persistencia de la endometritis en yeguas susceptibles (Alghamdi et al., 2005). Mientras tanto, el factor de necrosis tumoral (TNF), induce apoptosis en células infectadas y tumorales, y pueden inducir la síntesis de PGE₂

directa o indirectamente a través de la inducción de IL1 (Woodward, 2012). Ambos IL1 y TNF α estimulan la producción de IL6, la cual actúa modulando TNF α e IL1 en la fase temprana de la inflamación. IL6 tiene propiedades pro y anti-inflamatorias (Tilg et al., 1994). Tiene un papel protector al disminuir los PMNs y reclutar monocitos para dar fin a la reacción inflamatoria (Katila, 2015). Otra citoquina inflamatoria, la IL8, es liberada por macrófagos y células endoteliales y actúa como quimioatrayente para los PMNs (Liu et al., 1997). Además, la IL8 regula la expresión de las moléculas de adhesión de las superficies celulares y facilita la diapédesis de los PMNs a través de las paredes de los vasos sanguíneos (Atreya et al., 2000). El Interferón gamma (IFN- γ) es producida por células activadas tipo T y células natural killer (NK). Estimula la función de los fagocitos mononucleares, y activa los macrófagos para que eliminen antígenos (Feghali y Wright, 1997). Se detectó mediante PCR de biopsias endometriales que los niveles de IL1 β , IL6, y TNF α aumentaron 24 h pos-IA tanto en yeguas resistentes como en susceptibles a la endometritis pos-servicio (Fumuso et al., 2003). En condiciones basales, las yeguas resistentes presentan menor expresión de citoquinas pro-inflamatorias que las susceptibles, sin efecto del ciclo estral (Fumuso et al., 2003). Woodward et al. (2011) sostienen que las yeguas resistentes presentan significativamente mayor cantidad de citoquinas moduladoras de la inflamación IL1RN, IL10 e IL6 a las 6 h pos-IA comparado con las susceptibles.

En la reacción inflamatoria también participan prostaglandinas F2 α endógenas y oxitocina, que son liberadas muy temprano en las yeguas con endometritis (Pycock y Allen, 1990; Troedsson, 1999). La principal función es incrementar las contracciones uterinas para asistir la evacuación intrauterina (Cadario et al., 1995; Troedsson et al., 1995; Combs et al., 1996). También cumplen otros roles: alteran la permeabilidad vascular, mantienen la inflamación activa mediante citoquinas y colagenasas, elastasas y gelatinasas que favorecen el aporte de células e inician inmediatamente el proceso de reparación (Mackay, 2000).

Las inmunoglobulinas (Ig) participan secundariamente en el proceso de la endometritis persistente en yeguas (Asbury et al., 1980). Las Ig son producidas en el endometrio por las células plasmáticas (Mitchell et al., 1982). El fluido uterino de yeguas subfértiles presentó concentraciones significativamente más altas de Igs totales, IgA e IgG que en yeguas normales (Mitchell et al., 1982). Si bien, otro estudio encontró que yeguas infectadas presentan niveles elevados de IgA en sus secreciones uterinas, no fue así con el nivel de IgG (Williamson et al., 1983). Los antígenos son opsonizados por el complemento o IgG, para posteriormente ser fagocitado y destruido por los neutrófilos

(Troedsson et al., 1993). Woodward et al. (2013) concluyeron que a pesar de que el sistema inmune adaptativo cumple un rol importante en la endometritis y los anticuerpos son actores funcionales en la defensa uterina de yeguas susceptibles, es poco probable que un defecto en este mecanismo sea la causa principal de la susceptibilidad a la endometritis (Asbury et al., 1980).

Como la inflamación aguda puede causar daños a los tejidos que contacta, es fundamental que ésta sea controlada lo más rápido posible (Samper et al., 2016). El mismo estímulo que induce la liberación de mediadores pro-inflamatorios, promueve la aparición de mecanismos y de ciertas moléculas que actúan para dar fin al proceso inflamatorio, inhibiendo la producción de citoquinas, bloqueando los receptores celulares u originando la muerte celular (MacKay, 2000).

2.4 Papel de los espermatozoides en la reacción inflamatoria uterina

El espermatozoide es considerado el principal causante de la inflamación fisiológica que ocurre en el útero después del servicio (Kotilainen et al., 1994; Vega, 2011). La introducción de espermatozoides en el tracto reproductivo de la hembra produce una fuerte respuesta neutrofílica en varias especies animales (Cohen, 1984). Troedsson et al., (1995) mostraron que el espermatozoide de la especie equina activa el complemento que resulta en quimiotaxis y la subsecuente invasión masiva de PMNs desde la sangre a la luz uterina. La inseminación en yeguas con espermatozoides libres de bacterias resulta en un influjo de PMNs hacia el útero, generando una respuesta inflamatoria similar a la desencadenada después de la inoculación de bacterias intrauterinas (Troedsson et al., 1995).

La intensidad de la respuesta inflamatoria depende del número total de espermatozoides, ya que cuanto mayor es el número total de espermatozoides presentes en la dosis, más intensa es la respuesta inflamatoria (Kotilainen et al., 1994; Fiala et al., 2007; Cazales et al., 2018). Además, cuanto más tiempo permanecen los espermatozoides en el útero mayor es la respuesta inflamatoria (Samper et al., 2016). También se vio, que a igual número de espermatozoides, el semen concentrado es la presentación que más inflama, si lo comparamos con semen diluido (Kotilainen et al., 1994). Inseminar el mismo número de espermatozoides, en pequeños volúmenes (concentrado), parece provocar respuestas inflamatorias más grandes, en comparación a volúmenes mayores (menos concentradas) (Kotilainen et al., 1994). Por lo que se concluyó que la intensidad de la reacción neutrofílica depende fuertemente de la

concentración y del número total de espermatozoides inseminados (Kotilainen et al., 1994).

Podemos dividir la población de espermatozoides introducidos en el útero en vivos y muertos. Kotilainen et al. (1994), observaron mayor reacción inflamatoria uterina después de inseminar con semen congelado, momento en que sugirieron que podría ser causada por el gran número de espermatozoides muertos que presenta una dosis inseminante típica de semen descongelado. Los PMNs interactúan de manera diferente frente a espermatozoides vivos o muertos; los vivos parecen ser menos fagocitados que los muertos en presencia de plasma seminal (Troedsson et al., 2010). De igual manera se observó que los espermatozoides muertos, dañados o inmóviles son removidos del útero más fácilmente que los funcionales mediante fagocitosis (Harper, 1988). La membrana espermática alberga proteínas adheridas que serían las responsables del reconocimiento de las diferentes poblaciones de espermatozoides, y de la opsonización selectiva en el útero de la yegua, por lo que el plasma seminal juega un papel importante en el proceso inflamatorio (Troedsson et al., 2006).

2.5 Papel del plasma seminal en la reacción inflamatoria uterina pos-cobertura

El semen está compuesto por dos fracciones distintas: los espermatozoides, que componen menos del 1% del volumen total y el plasma seminal (Wite, 1988). A diferencia de otras especies, el eyaculado de padrillo posee grandes volúmenes de plasma seminal (PS). Éste es un fluido producido por la rete testis, epidídimo y glándulas accesorias (Wite, 1988). En la composición del plasma seminal participan elementos como: iones, enzimas, monosacáridos, lípidos, poliaminas, aminoácidos, proteínas, hormonas y prostaglandinas (Katila y Kareskoski, 2006).

El plasma seminal modula la inflamación producida por el servicio (Troedsson, 1999; Troedsson et al., 2001; Vilés et al., 2013), ya que inhibe la activación del complemento, suprime la quimiotaxis de los PMNs y protege a los espermatozoides viables de la fagocitosis (Troedsson et al., 2000). Sirve como vehículo para transportar, nutrir y proteger a los espermatozoides en el tracto femenino, prolongando el tiempo de supervivencia (Töpfer-Petersen et al., 1998). También, regula la capacitación espermática, la reacción acrosomal y la interacción de gametos (Katila, 2012). El PS es rico en oxitocina y prostaglandina, ambos promotores de la contractibilidad endometrial (Samper et al., 2007). Sin embargo, no se demostró un efecto directo del plasma seminal sobre las tasas de preñez (Portus et al., 2005). Doty et al., (2011) demostraron que la Crisp-3 y la lactoferrina (Troedsson et al., 2014), proteínas presentes en el PS,

protege de manera selectiva espermatozoides viables de la unión con PMNs, y favorece la unión de PMNs con espermatozoides no aptos favoreciendo la opsonización de éstos para luego fagocitarlos (Troedsson et al., 2005). Ésto permite a los espermatozoides viables un viaje seguro a través del útero hasta alcanzar las trompas uterinas.

El plasma seminal por sí mismo, causa neutrofilia e incide en la duración e intensidad de la inflamación provocada por los espermatozoides (Fiala et al., 2007). Se hipotetizó que la escasez de PS que presenta el semen congelado puede potenciar la reacción inflamatoria endometrial, pudiendo ser uno de los motivos de las bajas tasas de preñez que presenta dicho método (Vilés et al., 2013). Cuando se insemina con escasa cantidad de plasma seminal (como ocurre en semen congelado/descongelado o pellet de semen fresco centrifugado) la endometritis es más marcada y prolongada (Troedsson et al., 2001; Vilés et al., 2013). Mientras tanto, Christoffersen y Troedsson (2017) observaron clínicamente que la duración de la endometritis pos-servicio es más corta cuando se añade plasma seminal a la dosis inseminante. Sin embargo, Sabatini et al. (2018) inseminaron 15 yeguas con semen congelado/descongelado, dónde a mitad de las yeguas le añadió plasma seminal descongelado no obteniéndose ningún beneficio en la reacción inflamatoria ni en las tasas de preñez. En este trabajo las yeguas fueron evaluadas a las 6 y 20 h pos-IA por presencia de fluido intrauterino; número de PMNs y recuperación embrionaria. No se evidenció diferencias entre ambos grupos. Aunque el estudio falló en demostrar que el plasma seminal disminuye la incidencia de endometritis pos-servicio y mejora las tasas de preñez, sugiere que podría haber diferencias dependientes del padrillo (Sabatini et al., 2018). El semen de determinados padrillos provoca una reacción inflamatoria exacerbada, mientras que el de otros provoca una respuesta inflamatoria más suave independientemente de si la yegua es o no susceptible a la endometritis persistente pos-cobertura (Troedsson et al., 2000).

En otro estudio, investigadores indujeron inflamación uterina 12 h previo a la IA en yeguas, y compararon los resultados de preñez luego de inseminar espermatozoides + PS (77%), y espermatozoides sin PS infundidos con diluyente (5%). Las yeguas inseminadas con PS tuvieron mejores tasas de preñez, demostrando un efecto protector del PS sobre los espermatozoides cuando estos se encuentran en el pico inflamatorio (Alghamdi et al., 2004). Lo que evidencia la propiedad reguladora/inmunosupresora que posee el PS. El PS sigue siendo un campo amplio de investigación, debido a la controversia existente sobre el rol que cumple en el útero de las yeguas.

2.6 El uso de semen congelado y su influencia sobre la reacción inflamatoria uterina pos-cobertura

Parecería que inseminar con semen congelado produce una mayor reacción inflamatoria comparado con semen fresco o refrigerado, a pesar de utilizar igual número de espermatozoides por dosis (Kotilainen et al., 1994). Las tasas de preñez al inseminar con semen congelado son menores que con semen fresco o refrigerado. Una yegua fértil inseminada con semen fresco o refrigerado espera 55-70% de preñez por ciclo; mientras que inseminando con semen congelado/descongelado se espera un rango de 0 a 70 % de preñez por ciclo (Pycock, 2001). Sanchez et al. (2008) afirman que los porcentajes de preñez obtenidos con la utilización de semen congelado son de alrededor del 50% en promedio. Mientras que Squires (2009) reportó tasas de preñez por ciclo de 40-50% con la utilización de semen congelado.

La causa de las menores tasas de preñez obtenidas con semen congelado no es del todo clara y seguramente sean multifactoriales, pero indudablemente se relaciona a alguno de los siguientes factores: poca cantidad de plasma seminal; mayor concentración espermática; gran proporción de espermatozoides muertos, vida media más corta y menor capacidad de alcanzar la trompa uterina y formar adecuadas reservas espermáticas comparado con los espermatozoides frescos y refrigerados (Katila, 2001).

En el proceso de criopreservación del semen equino, el plasma seminal es removido para concentrar los espermatozoides y auxiliar en la motilidad espermática posterior a la descongelación. La motilidad es mayor cuando la proporción del plasma seminal se reduce al 5% en comparación a cuando se reduce a un 10 y 30% o cuando se retira todo el plasma seminal (Alghamdi et al., 2002). Troedsson et al. (1995) sugieren que la remoción del plasma seminal, como ocurre en el semen congelado aumentaría la respuesta inflamatoria después de la inseminación y disminuiría la supervivencia espermática, pero esto no fue demostrado por Kotilainen et al. (1994) que comprobaron que la adición de plasma seminal al semen congelado provocó un aumento en el número de neutrófilos.

También, se sostuvo la postura de que el aumento de la reacción inflamatoria es causada por la alta concentración espermática que presenta el semen congelado (Kotilainen et al., 1994). Para mejorar la tasa de preñez con el uso de semen congelado, se utiliza una concentración mayor de espermatozoides por mL. La crioprotección exitosa ha sido lograda en concentraciones que van de 20 a 1600×10^6

espermatozoides/mL (Kuisma et al., 2006), aunque se recomienda congelar en concentraciones de 100 a 200x10⁶ espermatozoides/mL, ya que la motilidad pos-descongelado es mejor y resulta en mejores tasas de preñez (Vidament, 2005). Además, deben utilizar como mínimo 250x10⁶ espermatozoides con motilidad progresiva para optimizar la fertilidad con semen congelado (Loomis y Squires, 2005; Metcalf, 2007). Fiala et al. (2007) y Cazales et al. (2018), constataron que cuanto mayor es el número de espermatozoides inseminados mayor es la reacción inflamatoria generada y más rápida la resolución del cuadro inflamatorio en yeguas normales.

A diferencia del semen fresco y refrigerado; el semen congelado/descongelado presenta un mayor número de espermatozoides muertos o alterados. Desde que la proporción de espermatozoides muertos en una muestra típica de semen descongelado ronda en el 70%, Kotilainen et al. (1994) y Katila, (1997), especularon que ésto podría ser el causante de la gran reacción inflamatoria producida luego de inseminar con semen congelado. Sin embargo, no se constataron diferencias en el número de neutrófilos recuperados 5 h después de la inseminación con espermatozoides vivos o muertos (Katila, 1997). El método utilizado por Katila (1997) para matar a las células espermáticas fue mediante el uso de microondas y ello pudo haber interferido en el resultado. Además, Katila (1997) utilizó en su ensayo experimental semen fresco y no congelado. Por medio de este estudio Katila (1997), afirmó que inseminar espermatozoides vivos o muertos inducen una respuesta uterina similar de PMNs a las 5 h pos-IA. La determinación de posibles diferencias en la reacción inflamatoria desencadenada por las diferentes poblaciones de espermatozoides puede auxiliar a comprender el proceso inflamatorio uterino pos-cobertura y en la prevención del establecimiento de endometritis persistentes en yeguas susceptibles.

Además de los factores provenientes del semen y de la yegua, se observó que la técnica de inseminación con semen congelado también puede tener influencia sobre la inflamación uterina. Cazales et al. (2016) y Cazales et al. (2018) comprobaron una reacción inflamatoria mayor cuando se inseminó en el cuerpo del útero que cuando se hizo en la punta del cuerno al utilizar una dosis baja, no habiendo diferencias en la reacción inflamatoria cuando se utilizaron dosis altas. En este estudio la inflamación disminuyó con el aumento de la dosis y volumen inseminado a las 12 h pos-IA. Los autores concluyeron que el lugar de inseminación y el número total de espermatozoides afecta la reacción inflamatoria después de la inseminación con semen congelado (Cazales et al., 2018).

Mientras tanto, otros autores sostienen la idea que la reducción en la fertilidad al inseminar con semen congelado es debido a que el número total de espermatozoides aptos para fertilizar cae por debajo del número necesario para lograr una alta probabilidad de fertilización. Se ha demostrado que esto surge desde que en una muestra de semen descongelado, la mitad de los espermatozoides no sobreviven al proceso de criopreservación aunque los protocolos se cumplan de manera óptima, sumado al deterioro en la función de la población espermática que sobrevive (Watson, 2000).

A su vez, la fertilidad está determinada por cada individuo. Existe una enorme variación entre ellos, ya que la calidad del semen y la tolerancia a la congelación no es la misma para todos los padrillos (Vidament et al., 1997). Las observaciones sugieren que el semen de determinados padrillos provoca una reacción inflamatoria exacerbada, mientras que el de otros provoca una respuesta inflamatoria más suave independientemente de si la yegua es o no susceptible a la endometritis persistente pos-cobertura (Troedsson et al., 2000). Esto puede indicar que las diferencias en la composición del plasma seminal también influyen en la reacción inflamatoria uterina.

3. HIPÓTESIS

Cuanta mayor cantidad de espermatozoides muertos en la dosis de inseminación con semen congelado, mayor la reacción inflamatoria uterina 4 horas luego de inseminar yeguas reproductivamente sanas.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Contribuir al conocimiento y a la eficiencia de la inseminación artificial con semen congelado equino, a través del estudio de la reacción inflamatoria endometrial causada por los espermatozoides muertos presentes en la dosis de inseminación.

4.2 Particular

Verificar si el número total de espermatozoides muertos inseminados afectan la cantidad de PMNs en la luz uterina a las 4 horas luego de la IA con semen congelado, buscando identificar posibles diferencias en la respuesta inmune.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo de investigación fue previamente aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) (Formulario N° 111130-001637-13), de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad de la República.

5.1 Lugar y momento

El experimento fue llevado a cabo en el Frigorífico Equino SAREL SRL ubicado en el departamento de Canelones, Uruguay (34°S, 56°O), de febrero a marzo de 2018.

5.2 Animales

5.2.1 Padrillo

Se utilizó semen congelado de un solo padrillo de raza Pura Sangre de Carrera (PSC), de 8 años de edad, saludable, con buena condición corporal y fertilidad probada en programas de inseminación artificial.

5.2.1.1 Colecta, congelamiento y procesamiento del semen

El semen fue colectado con vagina artificial modelo Hannover. Luego de la colecta los eyaculados fueron diluidos y evaluada su motilidad, concentración y morfología espermática. Aquellos eyaculados que reunieron características aceptables, concentración espermática $\geq 200 \times 10^6$ espermatozoides/mL, motilidad progresiva $> 50\%$ y más de 70% de espermatozoides morfológicamente normales fueron procesados para su congelamiento (Kalmar et al., 2014). El semen fue congelado en pajuelas de 0,5 mL a una concentración de 200×10^6 espermatozoides/mL (100×10^6 espermatozoides totales por pajuela) utilizando el diluyente comercial Botucurio® (Botupharma, Botucatú, Brasil) según las indicaciones del fabricante. Por cada eyaculado congelado, tres pajuelas fueron descongeladas en baño maría a 37°C por 30 segundos y analizadas por sistema computarizado CASA (AndroVision®, Minitüb, Tiefenbach, Alemania). Solo se utilizaron las muestras que tuvieron más de 35% de espermatozoides con motilidad progresiva pos-descongelado. El padrillo presentó congelabilidad superior al 90%.

5.2.1.2 Tratamiento del semen

Las pajuelas congeladas fueron divididas aleatoriamente en dos grupos:

Tratamiento 1: Semen Muerto (SM) – Semen congelado con 100% de los espermatozoides muertos. Las pajuelas fueron descongeladas en baño maría a 37°C durante 30 segundos. Luego de descongeladas, fueron inmersas nuevamente en nitrógeno líquido durante 10 segundos, con el fin de matar las células espermáticas. Las pajuelas fueron descongeladas nuevamente, y se corroboró con el microscopio óptico que efectivamente los espermatozoides estuviesen sin motilidad.

Tratamiento 2: Semen Vivo (SV) – Semen congelado con su fracción normal de espermatozoides vivos (> 35 % de motilidad progresiva) y muertos.

Las muestras para inseminación fueron descongeladas en baño maría a 37°C por 30 segundos y fueron evaluadas subjetivamente con un microscopio óptico y platina térmica a 37°C cada vez que se inseminaba una yegua, corroborando los porcentajes de motilidad (0% para el SM y >35% para el SV).

5.2.2 Yeguas

Se asistió a la planta frigorífica 24 veces, donde se examinaron un total de 425 yeguas destinadas a faena, de las cuales fueron seleccionadas 36 yeguas que nos fueron útiles para la investigación. Éstas debían ser dóciles; estar cíclicas, concretamente en estro; con condición corporal mínima de 3 (Hennecke et al., 1983, modificada por Malschitzky, 2001) y clínicamente saludables. El promedio de edad fue de 10,5 años (entre 3 y 25 años), promedio de peso corporal de 452 Kg (entre 340 y 560 Kg) y sin raza definida.

5.2.2.1 Examen ginecológico y citológico

El día previo a la faena, antes de ser incluidas en los grupos experimentales todas las yeguas fueron sometidas a un examen ginecológico, mediante palpación y ecografía transrectal (Mattos et al., 1984; Curnow, 1991). Las yeguas cíclicas con buena conformación vulvar, comportamiento de celo, sin contenido uterino, que presentaban imagen ecográfica uterina compatible con estro, tono uterino y cérvix compatible con celo, ausencia de cuerpo lúteo funcional y folículos ≥ 35 mm de diámetro fueron seleccionadas para el experimento.

Las yeguas seleccionadas fueron sometidas también a un examen citológico del lumen uterino luego de una cuidadosa limpieza del área perineal con agua potable y detergente neutro, finalizando la limpieza con una solución jabonosa líquida con clorhexidina al 2%, se enjuagó y se secó con papel absorbente. Luego de higienizada la región perineal se procedió a tomar la muestra de citología endometrial mediante el uso de cepillos ginecológicos estériles (Cito-Brush®, Juvaquez, España), utilizando un dispositivo para toma de muestras citológicas (Botupharma, Botucatú, Brasil), evitando la contaminación por el ambiente vestibular, vaginal y cervical (Mattos et al., 1984). Una vez tomada la muestra, el cepillo fue rodado suavemente sobre la superficie de un portaobjeto, se dejó secar al aire y se coloreó con tinción de Panóptico Pappenheim (Diff-Quik®, Baxter Health Care, Miami, USA) para posteriormente ser evaluado microscópicamente en búsqueda de PMNs. Sólo fueron utilizadas en el experimento yeguas sin presencia de PMNs al examen citológico.

5.3 Diseño experimental

Se partió de un N de 425 yeguas y concurrimos a la planta frigorífica sucesivas veces hasta que se obtuvo 36 yeguas. Las yeguas seleccionadas fueron aleatoriamente inseminadas en el cuerpo del útero con 8 pajuelas de 0,5 mL (100×10^6 de espermatozoides/pajuela) con 800×10^6 de espermatozoides muertos (SM) o con 800×10^6 de espermatozoides con > 35 % de motilidad progresiva pos-descongelado (SV). La inseminación en el cuerpo del útero se realizó de manera transcervical con una pipeta de inseminación flexible atraumática de 57 cm (Minitüb, Tiefenbuch, Alemania), corroborando transrectalmente la ubicación de la punta de la pipeta en la mitad del cuerpo uterino. Una vez realizada la inseminación, las yeguas fueron humanitariamente sacrificadas a las 4 h pos-inseminación, quedando conformados los siguientes grupos experimentales: SM (n=10) – inseminación artificial en el cuerpo del útero con 800×10^6 de espermatozoides muertos; Grupo: SV (n=10) – inseminación artificial en el cuerpo del útero con 800×10^6 de espermatozoides con > 35% de motilidad progresiva y Grupo control (n=16) – yeguas que no fueron inseminadas.

5.4 Colecta y procesamiento de muestras

Aproximadamente diez minutos luego del sacrificio, los órganos reproductivos completos fueron recuperados e identificados al momento de la retirada de las vísceras en la línea de faena. Los úteros fueron lavados para el conteo de PMNs en la cámara de Neubauer® con 50 mL de PBS 0,1 M pH 7,4 (solución salina fosfatada tamponada), con una sonda Foley (24 FR) introducida a través del cérvix, estando obstruidas las uniones

útero-tubáricas de cada cuerno uterino por pinzas hemostáticas. Una alícuota homogeneizada de 50 µL de la muestra recuperada, fue diluida en 150µL de PBS para el conteo de los PMNs. Cada PMN contado en la cámara de Neubauer® representaba 10x10³ PMNs/mL.

5.5 Análisis estadístico

Las variables fueron evaluadas utilizando el programa estadístico Graph Pad Prism Version 8.0.2 (San Diego, CA, USA). Los datos obtenidos fueron sometidos a una prueba estadística U de Mann-Whitney para datos no paramétricos. Fueron consideradas como variables independientes la IA con espermatozoides vivos y muertos; mientras que el número de PMNs en los lavados uterinos fueron consideradas como variables dependientes. Diferencias de Probabilidades < 0,05 fueron consideradas significativas. Los datos fueron presentados como media ± error estándar (EE).

6. RESULTADOS

En el examen citológico endometrial, todas las yeguas utilizadas presentaron 0 neutrófilos/campo visual, de 10 campos totales visualizados al microscopio óptico con el objetivo 40X.

La motilidad total y progresiva media del semen descongelado evaluado por el sistema de análisis computarizado (CASA) están demostradas en la Tabla 1.

Tabla 1. Media (± EE) de motilidad espermática total y progresiva del semen descongelado evaluado por CASA.

MOTILIDAD	%
TOTAL	57,13 ± 6,29
PROGRESIVA	40,27 ± 4,42

Todas las yeguas inseminadas tuvieron mayor número de PMNs (P < 0,05) que las yeguas del grupo control a las 4 h pos-inseminación. Se observó una mayor (P < 0,05) reacción inflamatoria en las yeguas inseminadas con semen vivo (SV = 82,7x10⁶ ± 15,7x10⁶ PMNs/mL) en relación a las yeguas inseminadas con semen muerto (SM =

$45 \times 10^6 \pm 9,8 \times 10^6$ PMNs/mL. La media de PMNs encontrados en los lavados uterinos de las 16 yeguas del grupo control fue de $0,3 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$ PMNs/mL (Fig. 1).

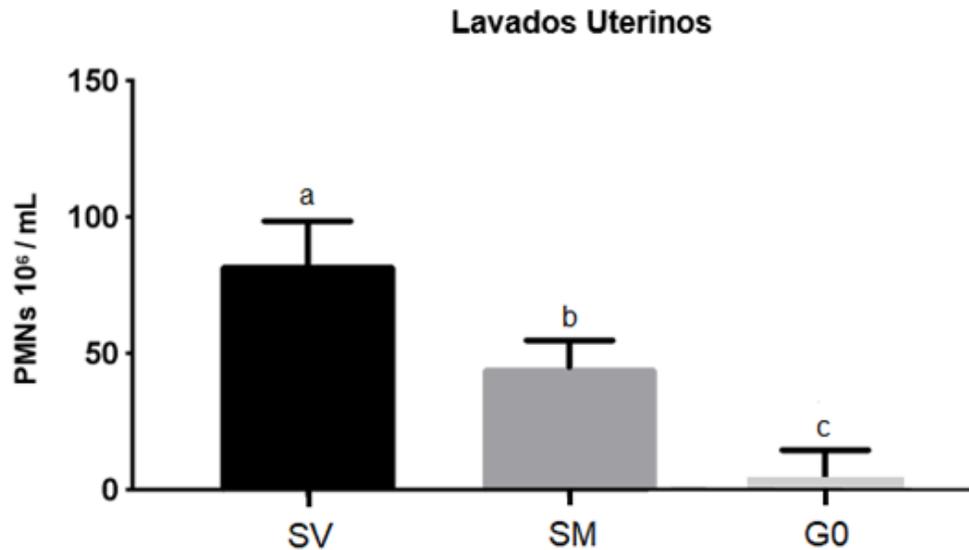


Figura 1. Número de PMNs/mL (\pm EE) recuperados en el lavado uterino 4 h después de la inseminación con espermatozoides vivos y muertos y grupo control. (a,b,c) representa diferencias ($P < 0,05$) entre los grupos. (SV)= yeguas inseminadas en el cuerpo del útero con > 35 % de espermatozoides motiles; (SM)= yeguas inseminadas en el cuerpo del útero con 100% de espermatozoides sin motilidad; (G0)= yeguas de grupo control (sin inseminar).

7. DISCUSIÓN

Varios métodos son usados para modular la respuesta inflamatoria luego de la IA en yeguas, como el uso de plasma rico en plaquetas (Segabinazzi et al., 2017), células madres (Ferris et al., 2014), corticoides (Bucca et al., 2008), agentes inmunomoduladores (Christoffersen et al., 2012) y lavados uterinos (Canisso et al., 2016). Además de estos tratamientos, existen alternativas de manejo relacionados a los protocolos de IA como ser el sitio y la dosis de inseminación que también afectan la respuesta inflamatoria (Cazales et al., 2018), y consecuentemente los índices de concepción.

La presencia de PMNs en la luz uterina de las yeguas es una fuerte evidencia de inflamación (Knudsen, 1964). En el presente estudio, las células inflamatorias no fueron

detectadas en el examen citológico, pero fueron observadas en los lavados uterinos de las yeguas control. Esta presencia de PMNs detectada en los lavajes uterinos, seguramente se deba a la manipulación uterina y cervical durante la toma de muestra para el examen citológico previo a los lavados. Esto concuerda con lo hallado por Williamson et al. (1987), que observaron un aumento transitorio de PMNs luego de la manipulación cervical y corrobora lo descrito por Ball et al. (1988), quienes demostraron que el lavado uterino de bajo volumen es más eficiente que los hisopos y cepillos ginecológicos en detectar PMNs al examen citológico.

El número de PMNs de los lavados uterinos de las yeguas inseminadas fue significativamente mayor que el observado en las yeguas del grupo control. Esto demuestra que el semen congelado/descongelado ya sea con espermatozoides muertos o vivos inicia una respuesta inflamatoria uterina detectable a las 4 h pos-inseminación, concordando con Katila (1997); Fiala et al. (2007) y Gomes et al. (2019).

Los resultados de este estudio y al contrario de nuestras expectativas indicaron que los espermatozoides muertos generan menor cantidad de PMNs intrauterinos que la IA con semen congelado con > 35 % de espermatozoides con motilidad progresiva. Katila (1997) no encontró diferencias en el número de PMNs luego de inseminar con espermatozoides vivos o muertos. A diferencia de nuestro estudio, Katila usó semen fresco y mató los espermatozoides usando un microondas. Del mismo modo, Gomes et al. (2019) tampoco encontraron diferencias en la respuesta inflamatoria uterina entre inseminar con espermatozoides viables seleccionados por Percoll y espermatozoides no seleccionados por el coloide. Esto coincide con lo investigado por Recalde (2014), quien comparó el número de células inflamatorias 6 h después de inseminar yeguas con semen congelado de alta y baja calidad, no encontrando diferencias en el grado de inflamación uterina entre ambos grupos.

Por el momento no existe una explicación clara de porque los espermatozoides muertos generaron menor reacción inflamatoria que los espermatozoides vivos. Probablemente, se explique por la opsonización selectiva que existe en el útero, que hace que los PMNs fagociten de manera distinta los espermatozoides muertos o defectuosos que los espermatozoides viables. Seguramente los espermatozoides muertos sean atacados y fagocitados más rápido, haciendo que los espermatozoides motiles tengan mayor tiempo y área de contacto con el endometrio, prolongando la reacción inflamatoria. De esta manera menor cantidad de neutrófilos serían necesarios para combatir la inflamación provocada por los espermatozoides muertos (Harper, 1988).

La reacción inflamatoria endometrial varía entre animales fértiles y subfértiles así como también con el momento de la inseminación (pre o pos-ovulación), entre el semen congelado, fresco o refrigerado y entre el semen congelado de diferentes padrillos (Bader, 1982; Scott et al., 1995; Scott, 2003). En el presente estudio, las inseminaciones fueron siempre pre-ovulatorias, con semen congelado de un padrillo con fertilidad conocida y sólo se utilizaron yeguas reproductivamente sanas, por lo que estos resultados no se podrían extrapolar directamente a yeguas con problemas reproductivos ni a padrillos subfértiles. La utilización de semen congelado de un solo padrillo fue precisamente para eliminar la variable padrillo que podría afectar la respuesta inflamatoria pos-inseminación. Por el mismo motivo, se utilizaron yeguas sin alteraciones, para eliminar posibles factores de confusión inherentes a la fertilidad de las yeguas.

En resumen, el mayor porcentaje de espermatozoides muertos en las dosis de semen congelado parecería no ser la causa de una mayor reacción inflamatoria endometrial y no sería el motivo de los menores índices de preñez. En conclusión, la deposición de semen congelado/descongelado en el útero provocó un proceso inflamatorio endometrial. Los espermatozoides muertos generaron menor reacción inflamatoria que los espermatozoides vivos a las 4 h pos-inseminación en yeguas reproductivamente sanas.

8. CONCLUSIONES

La deposición de semen congelado/descongelado en útero genera una reacción inflamatoria caracterizada por un aumento en el número de PMNs en la luz uterina. Inseminar con la totalidad de espermatozoides muertos no generó una mayor reacción inflamatoria que haciéndolo con la misma cantidad de espermatozoides con una fracción de > 35 % de espermatozoides vivos, a las 4 h pos-inseminación con semen congelado/descongelado en yeguas reproductivamente sanas. Los espermatozoides muertos parecerían no ser los responsables de la reacción inflamatoria generada tras inseminar con semen congelado.

9. BIBLIOGRAFÍA

Alghamdi, A. S., Troedsson, M. H., Xue, J. L., Crabo, B. G. (2002). Effect of seminal plasma concentration and various extenders on postthaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. *Am J Vet Res*; 63(6): 880-885.

Alghamdi, A. S., Foster, D. N., Troedsson, M. H. T. (2004). Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction*; 127(5):593-600.

Alghamdi, A. S., Foster, D. N., Carlson, C. S., Troedsson, M. H. (2005). Nitric oxide levels and nitric oxide synthase expression in uterine samples from mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis. *American Journal of Reproductive Immunology*, 53(5):230-237.

Alonso, A., Baca Castex, C., Ferrante, A., Caldevilla, M., Pinto, M., Miragaya, M. (2016). Uso de Semen Congelado en Programas de Inseminación Artificial. *Spermova*; 6:107-109.

Amulic, B., Hayes, G. (2011). Neutrophil extracellular traps. *Current Biology*, 21(9): 297-298.

Asbury, A. C., Halliwell, R. E. W., Foster, G. W., Longino, S. J. (1980). Immunoglobulins in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis. *Theriogenology*, 14(4):299-308.

Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Müllberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., Schütz, M., Bartsch, B., Holtmann, M., Becker, C., Strand, D. (2000). Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nature Medicine*, 6(5):583.

Bader, H. (1982). An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*; 32: 59-64.

Ball, B. A., Shin, S. J., Patten, V. H., Lein, D. H., Woods, G. L. (1988). Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. *Theriogenology*; 29(6): 1269-1283.

Brinsko, S. P., Rigby, S. L., Varner, D. D., Blanchard, T. L. (2003). A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis. Proceedings of the AAEP, Vol 49. New Orleans, USA. pp. 363-365.

Brinsko S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., Hartman, D. (2011). Manual of equine reproduction. Missouri, Elsevier, pp. 332.

Brito, L. F. C., Barth, A. D. (2003). Endometritis in mares. Large Animal Veterinary Rounds, 3:9.

Bucca, S., Carli, A., Buckley, T., Dolci, G., Fogarty, U. (2008). The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. Theriogenology; 70:1093-110

Bucca, S. (2013). How to manage cervical incompetence by application of a cervical cerclage suture in the pregnant mare. Proceedings AAEP. Vol 59. Nashville, Tennessee, USA, pp. 28-33.

Cadario, M. E., Thatcher, M. J. D., LeBlanc, M. M. (1995). Relationship between prostaglandin and uterine clearance of radiocolloid in the mare. Biology of Reproduction, 52(monograph_series1):495-500.

Cadario, M. E., Merritt, A. M., Archbald, L. F., Thatcher, W. W., LeBlanc, M. M. (1999). Changes in intrauterine pressure after oxytocin administration in reproductively normal mares and in those with a delay in uterine clearance. Theriogenology, 51(5):1017-1025.

Canisso, I. F., Stewart, J., da Silva, M. A. C. (2016). Endometritis: managing persistent post-breeding endometritis. Veterinary Clinics: Equine Practice; 32(3): 465-480.

Causey, R. C. (2006). Making sense of equine uterine infections: the many faces of physical clearance. The Veterinary Journal; 172(3):405-421.

Cazales, N., Hauret, P., Cavestany, D., Mattos, R. C. (2016). Effect of insemination site on uterine inflammatory response of mares. J Equine Vet Sci; (43):S70-S71.

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?. J Equine Vet Sci, (66): 109-110.

Christoffersen, M., Woodward, E. M., Bojesen, A. M., Petersen, M. R., Squires, E. L., Lehn-Jensen, H., Troedsson, M. H. T. (2012). Effect of immunomodulatory therapy on

the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. *Theriogenology*; 78(5): 991-1004.

Christoffersen, M., Troedsson, M. H. (2017). Inflammation and fertility in the mare. *Reproduction in Domestic Animals*, 52:14-20.

Cocchia, N., Paciello, O., Auletta, L., Uccello, V., Silvestro, L., Mallardo, K., Paraggio, G., Pasolini, M. P. (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(1): 89–98.

Cohen, J. (1984). Immunological aspects of sperm selection and transport. En: Crichton, D. B. *Immunological Aspects of Reproduction in Mammals*. Kent, Ed. Butterworth-Heinemann, p: 77-89.

Combs, G. B., LeBlanc, M. M., Neuwirth, L., Tran, T. Q. (1996). Effects of prostaglandin F₂ α , cloprostenol and fenprostalene on uterine clearance of radiocolloid in the mare. *Theriogenology*, 45(8):1449-1455.

Crum, C. P., Lee, K. R., Nucci, M. R. (2011). *Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology*. 2da. Ed. Philadelphia, Ed. Elsevier Health Sciences, 1216 p.

Curnow, E. M. (1991). Ultrasonography of the mare's uterus. *Equine Vet. Educ*; 3(4):190-193.

Doty, A., Buhi, W. C., Benson, S., Scoggin, K. E., Pozor, M., Macpherson, M., Mutz, M., Troedsson, M. H. T. (2011). Equine CRISP3 modulates interaction between spermatozoa and polymorphonuclear neutrophils. *Biology of Reproduction*, 85(1):157-164.

Feghali, C. A., Wright, T. M. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience* 2(1): d12-d26.

Ferris, R. A., Frisbie, D. D., McCue, P. M. (2014). Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares. *Theriogenology*; 82(1): 36-42.

Fiala, S.M.E. (2004). Transporte espermático e resposta inflamatória na égua após a inseminação com diferentes concentrações de espermatozoides. Pós-graduação em

Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Federal do Rio Grande Sul.

Fiala, S. M. E., Pimentel, C. A., Mattos, A. L. G., Gregory, R. M., Mattos, R. C. (2007). Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. *Theriogenology*, 67(3): 556-562.

Fumuso, E., Giguère, S., Wade, J., Rogan, D., Videla-Dorna, I., Bowden, R. A. (2003). Endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis: effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 96(1-2):31-41.

Gomes, G. M., Crespilho, A. M., Leão, K. M., Jacob, J. C., Gomes, L. P., Segabinazzi, L. G., Papa, F. O., Alvarenga, M. A. (2019). Can Sperm Selection, Inseminating Dose, and Artificial Insemination Technique Influence Endometrial Inflammatory Response in Mares? *J Equine Vet Sci*; 73:43-47.

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

Håkansson, A., Albihn, A., Magnusson, U. (1993). The contribution of complement to opsonic activity in the uterine secretions of mares free of endometritis. *Theriogenology*; 39(3):601-609.

Harper, M. J. K. (1988). Gamete and zygote transport. En: Knobil E. y Neill J. D. *The Physiology of Reproduction*, Nueva York, 103–134pp.

Henneke, D. R., Potter, G. D., Kreider, J. L., Yeates, B. F. (1983). Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Vet. J*; 15(4): 371-372.

Kalmar, J. J., Ball, B. A., Troedsson, M. H. T., McQuerry, K. J., Baumber-Skaife, J., Loomis, P. R., Squires, E. L. (2014). Effect of number of mounts and pre-freeze concentration on stallion seminal parameters. *J Equine Vet Sci*; 1(34):30.

Katila, T. (1995). Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biology of Reproduction Mono 1: Equine Reproduction VI*; 515–517.

Katila, T. (1996). Uterine defence mechanisms in the mare. *Anim Reprod Sci*; 42:197-204.

Katila, T. (1997). Interactions of the uterus and semen. *Pferdeheilkunde*; 13(5): 508-511.

Katila, T. (1997). Neutrophils in uterine fluid after insemination with fresh live spermatozoa or with killed spermatozoa. *Pferdeheilkunde*; 13: 540-540.

Katila, T. (2001). Sperm–uterine interactions: a review. *Anim Reprod Sci*; 68(3-4): 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(1-4): 31-38.

Katila, T., Kareskoski, M. (2006). Components of stallion seminal plasma and their influence on spermatozoa. *Pferdeheilkunde*; 22(2): 193.

Katila T (2011) Sperm – Uterine Interactions. En: McKinnon, A., Squires, E., Vaala, E., Varner. *Equine Reproduction*, 2a ed. Chichester, Wiley-Blackwell, p 1092:1098.

Katila, T. (2012). Post-mating inflammatory responses of the uterus. *Reproduction in domestic animals*; 47:31-41.

Knudsen, O. (1964). Endometrial cytology as a diagnostic aid in mares. *The Cornell Veterinarian*; 54:415-422.

Kotilainen, T., Huhtinen, M., Katila, T. (1994). Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*; 41(3):629-636.

Kuby, J., Goldsby, R., Kindt, T. J., Osborne, B. (1992). *Immunology*, Nueva York, W.H.Freeman & Company, 1656 p.

Kuisma, P., Andersson, M., Koskinen, E. (2006). Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Acta Vet Scand*; 48:14–22.

LeBlanc, M. M., Johnson, R. D., Calderwood Mays, M. B., Valderrama, C. (1995). Lymphatic clearance of India ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. *Biology of Reproduction*; 52: 501-506.

LeBlanc, M. M., Neuwirth, L., Jones, L., Cage, C., Mauragis, D. (1998). Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. *Theriogenology*; 50(1):49-54.

LeBlanc, M. M. (2003). Persistent mating induced endometritis in the mare: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Recent Advances in Equine Reproduction*. New York: International Veterinary Information Service.

LeBlanc, M. M., Causey, R. C. (2009). Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 44:10-22.

LeBlanc, M. M. (2011). Uterine cytology. En: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. *Equine reproduction*. 2da. Ames, Ed. Wiley-Blackwell, pp.1922-1928.

Lehrer, R. I., Ganz, T., Selsted, M. E., Babior, B. M., Curnutte, J. T. (1988). Neutrophils and host defense. *Annals of Internal Medicine*; 109(2):127-142.

Liu, I. K., Cheung, A. T., Walsh, E. M., Miller, M. E., Lindenberg, P. M. (1985). Comparison of peripheral blood and uterine-derived polymorphonuclear leukocytes from mares resistant and susceptible to chronic endometritis: chemotactic and cell elastimetry analysis. *Am J Vet Res*; 46(4):917-920.

Liu, I. K. M., Rakestraw, P., Coit, C., Harmon, F., Snyder, J. (1997). An in vitro investigation of the mechanism of neuromuscular regulation in myometrial contractility. *Pferdeheilkunde*; 13:557-557.

Loomis P. R., Squires, E. L. (2005). Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology*; 64:480–91.

MacKay, R. J. (2000). Inflammation in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract*; 16(1):15-27.

Maischberger, E., Irwin, J. A., Carrington, S. D., Duggan, V. E. (2008). Equine post-breeding endometritis: A review. *Irish veterinary journal*; 61(3):163.

Malschitzky, E., Schilela, A., Meirelles, L. S., Mattos, A. L. G., Gregory, R. M., Mattos, R. C. (2001). Artificial photoperiod in pregnant mares and its effect on pregnancy length and postpartum reproductive performance. *Pferdeheilkunde*; 17(6): 565-569.

Mattos, R. C., Mattos, A. L. G., Günzel, A. R., Klug, E. (1984). Citologia endometrial na égua como método de diagnóstico auxiliar e complementar. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*; 8(2):83-90.

Metcalfe L. (2007). The efficient use of equine cryopreserved semen. *Theriogenology*; 68:423–8.

Mitchell, G., Liu, I. K., Perryman, L. E., Stabenfeldt, G. H., Hughes, J. P. (1982). Preferential production and secretion of immunoglobulins by the equine endometrium-a mucosal immune system. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*; 32:161-168.

Nikolakopoulos, E., Watson, E. D. (1997). Uterine motility in mares resistant and susceptible to endometritis. *J Reprod Fertil Abstr Ser*; 20:32

Parham, P. (2005). *The immune system*. 2da Edición. Nueva York, Garland Science; pp. 431.

Portus, B. J., Reilas, T., Katila, T. (2005). Effect of seminal plasma on uterine inflammation, contractility and pregnancy rates in mares. *Equine Vet J*; 37(6):515-519.

Pycock, J. F. y Allen, W. E. (1990). Inflammatory components in uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis. *Equine veterinary journal*; 22(6):422-425.

Pycock, J. F. (2001). Breeding with chilled and frozen semen. *The Horse Magazine*. Disponible en: <https://thehorse.com/14412/breeding-with-chilled-and-frozen-semen/>
Fecha de consulta: 23/03/2020

Pycock, J. F. (2006). How to maximize the chances of breeding successfully from the older maiden mare. *Proceedings AAEP*. Vol 52. San Antonio, Texas, USA, pp. 245-249.

Recalde, E. C. (2014). Influência da qualidade do sêmen criopreservado equino sobre a taxa de prenhez, hemodinâmica uterina e endometrite pós-cobertura. Tesis de Maestría. São Paulo- Universidad de São Paulo.

Rigby, S. L., Barhoumi, R., Burghardt, R. C., Colleran, P., Thompson, J. A., Varner, D. D., Blanchard, T. L., Brinsko, S. P., Taylor, T., Wilkerson, M. K., Delp, M. D. (2001). Mares with delayed uterine clearance have an intrinsic defect in myometrial function. *Biology of reproduction*; 65(3):740-747.

Sabatini, C., Rota, A., Panzani, D., Tesi, M., Camillo, F. (2018). Postmating Endometritis and Pregnancy Rate Were Not Affected by the Addition to Frozen-Thawed Semen of Filtered Seminal Plasma When Mares Without Evidence of Endometritis Were Artificially Inseminated Once 40 Hours Post-Gonadotropin-Releasing Hormone Treatment. *J Equine Vet Sci*; 62:54-59.

Samper, J. C., Pycocock, J. F., McKinnon, A. O. (2007). Current therapy in equine reproduction. Missouri, Ed. Saunders Elsevier, 492 p.

Samper, J. C. (2009). Uterine edema in the mare. En: Samper, J. C., Equine Breeding Management and Artificial Insemination. St Louis, Saunders Elsevier, pp.133–138.

Samper, J. C., Stanford, M. S., French, H. M., Chapwanya, A. (2016). Post-breeding inflammation in mares after insemination with large and low doses of fresh or frozen semen. *Pferdeheilkunde*; 32(1):24-26.

Sanchez, R., Gomez, I., Samper, J. C. (2008). Artificial Insemination with Frozen Semen, en: Samper, J. C. Equine Breeding Management and Artificial Insemination, 2da. Filadelfia, Estados Unidos, Ed. Saunders Elsevier, pp 175-183.

Schoon, D., Schoon, H. A., Klug, E. (1999). Angioses in the equine endometrium-pathogenesis and clinical correlations. *Pferdeheilkunde*; 15(6):541-546.

Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., Hume, D. A. (2004). Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*; 75(2):163-189.

Scott, M. A., Liu, I. K. M., Overstreet, J. W. (1995). Sperm transport to the oviducts: abnormalities and their clinical implications. Proceedings of the annual convention of the AAEP.

Scott, M. A. (2003). Sperm transport and function in the mare—a review. From epididymis to embryo; 10.

Segabinazzi, L. G., Friso, A. M., Correal, S. B., Crespilho, A. M., Dell'Aqua Jr, J. A., Miró, J., Papa, F. O., Alvarenga, M. A. (2017). Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte migration, and COX-2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible mares treated with platelet-rich plasma before and after AI. *Theriogenology*; 104: 120-126.

Squires, E. L. (2009). Changes in equine reproduction: have they been good or bad for the horse Industry? *J Equine Vet Sci*; 29: 268-273.

Silva, Í. C. (2016). Neutrófilos: aspectos clássicos, plasticidade e novas funções imunorregulatórias. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies*; 7(1).

Tilg, H., Trehu, E., Atkins, M. B., Dinarello, C. A., Mier, J. W. (1994). Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood*; 83(1):113-118.

Töpfer-Petersen, E., Waberski, D., Hess, O., Bellair, S., Schambony, A., Ekhlas-Hundrieser, M., Reineke, A. (1998). The role of seminal plasma in fertilization. *Tierärztliche Umschau*; 53:447-454.

Traub-Dargatz, J. L., Salman, M. D., Voss, J. L. (1991). Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. *J Am Vet Med Assoc*; 198(10):1745-1747.

Troedsson, M. H. T., Liu, I. K. M., Ing, M., Pascoe, J., Thurmond, M. (1993). Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. *Reproduction*; 99(2): 307-313.

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, M. H. T. (1999). Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*; 52(3):461-471.

Troedsson, M. H., Lee, C. S., Franklin, R. D., Crabo, B. G. (2000). The role of seminal plasma in post-breeding uterine inflammation. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*; (56):341-349.

Troedsson, M. H. T., Loset, K., Alghamdi, A. M., Dahms, B., Crabo, B. G. (2001). Interaction between equine semen and the endometrium: The inflammatory response to semen. *Anim Reprod Sci*; 68(3-4):273-278.

Troedsson, M. H. T., Desvovsge, A., Alghamdi, A. S., Dahms, B., Dow, C. A., Hayna, J., Valesco, R., Collahan, P.T., Macpherson, M.L., Pozor, M., Buhi, W. C. (2005). Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim Reprod Sci*; 89(1-4):171-186.

Troedsson, M. H. T., Desvovsge, A. L., Hansen, P. J., Buhi, W. C. (2006). Equine seminal plasma proteins protect live spermatozoa from PMN-binding and phagocytosis, while providing a mechanism for selective sperm elimination of apoptotic and dead spermatozoa. *Anim Reprod Sci*; 94(1-4):60-61.

Troedsson, M. H. T., Doty, A., Macpherson, M. L., Connor, M. C., Verstegen, J. P., Pozor, M. A., Buhi, W. C., (2010). CRISP-3 in equine seminal plasma is involved in selective uterine sperm transport. *Anim Reprod Sci*; 121:192-193.

Troedsson, M. H. T., Esteller-Vico, A., Scoggin, K. E., Woodward, E. M., Squires, E. L., Ball, B. A., Maxwell, H. (2014). Equine seminal plasma derived lactoferrin regulates binding of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) to spermatozoa. *J Equine Vet Sci*; 34(1):49

Troedsson, M. H., Woodward, E. M. (2016). Our current understanding of the pathophysiology of equine endometritis with an emphasis on breeding-induced endometritis. *Reproductive biology*; 16(1): 8-12.

Vega, F. J. P. (2011). Veterinaria: Causas de infertilidad en la yegua: Complejo Endometritis. *ExtremaduraPRE: la revista de la Asociación Extremeña de Criadores de Caballos de Pura Raza Española*; 10:25-29.

Vidament, M., Dupere, A. M., Julienne, P., Evain, A., Noue, P., Palmer, E. (1997). Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*; 48(6):907-917.

Vidament, M. (2005). French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim Reprod Sci*; 89: 115–36.

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

Watson, E. D., Stokes, C. R., Bourne, F. J. (1987). Cellular and humoral defence mechanisms in mares susceptible and resistant to persistent endometritis. *Veterinary immunology and immunopathology*; 16(1-2):107-121.

Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*; 60:481-492.

Williamson, P., Dunning, A., O'Connor, J., Penhale, W. J. (1983). Immunoglobulin levels, protein concentrations and alkaline phosphatase activity in uterine flushings from mares with endometritis. *Theriogenology*; 19(3):441-448.

Williamson, P., Munyua, S., Martin, R., Penhale, W. J. (1987). Dynamics of the acute uterine response to infection, endotoxin infusion and physical manipulation of the reproductive tract in the mare. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*; 35: 317-325.

Wite, I. G. (1988). Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal. En: Hafez ESE. *Reprodução animal*. 4a ed. São Paulo, Ed. Manole, 212-228pp.

Woodward, E., Christoffersen, M., Campos, J., Betancourt, A., Horohov, D., Scoggin, K., Edward, S., Troedsson, M. (2011). Endometrial cytokine expression in mares with different resistance to persistent breeding induced endometritis (PBIE) at multiple time points after insemination. *Biology of Reproduction*; 85:77

Woodward, E. M. (2012). Breeding Induced Endometritis in the Mare: The Local Innate Immune Response. Theses and Dissertations--Veterinary Science. 5. https://uknowledge.uky.edu/gluck_etds/5

Woodward, E. M., Christoffersen, M., Campos, J., Betancourt, A., Horohov, D., Scoggin, K. E., Squires, E. L. and Troedsson, M. H. (2013). Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. *Reproduction*; 145(3):289-296.

Woodward, E. M., Troedsson, M. H. (2013). Equine breeding-induced endometritis: a review. *J Equine Vet Sci*; 33(9):673-682.

Zent, W. W., Troedsson, M. H., Xue, J. L. (1998). Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of Thoroughbred mares: a field study. En *AAEP*; 44:64-65.