

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**SEMEN CONGELADO EN EQUINOS: INFLUENCIA DEL SITIO Y LA DOSIS
DE INSEMINACIÓN SOBRE EL TRANSPORTE ESPERMÁTICO Y LA
RESPUESTA INFLAMATORIA.**

por

**Sofía LAZCANO MONTIEL
Flores PEREYRA MONTANS**

**TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el
título de Doctor en Ciencias
Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria**

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2020**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

María José Estradé

Segundo miembro (Tutor):

Nicolas Cazales Penino

Tercer miembro:

Richard Núñez Olivera

Fecha:

01/10/2020

Autores:

Sofía Lazcano Montiel

Florencia Pereyra Montans

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a la Facultad de Veterinaria por darnos la oportunidad de formarnos como profesionales, así como a aquellos profesores que desarrollan la docencia con vocación y se esfuerzan por mejorar cada día nuestra casa de estudio.

A nuestro tutor Nicolás Cázales por habernos permitido formar parte de su proyecto, por guiarnos y enseñarnos con entusiasmo, alegría y buena onda.

A quienes colaboraron en la realización del trabajo de campo, al personal del frigorífico SAREL, principalmente a Nestor "en bloque" por su disposición, voluntad y simpatía. A las compañeras del proyecto, en particular a Pilar García, con quienes compartimos largas jornadas de trabajo.

Agradecemos a las funcionarias de Biblioteca, quienes nos ayudaron en la búsqueda de material bibliográfico.

A nuestras amigas y amigos de facultad y de la vida que apoyaron, acompañaron y entendieron nuestras ausencias durante este proceso, con los cuales recordamos experiencias inolvidables.

Agradecimientos de Florencia Pereyra:

Quisiera agradecer el apoyo incondicional de mis padres, mi hermano y Patricia que fueron un pilar fundamental. Gracias por su comprensión, estímulo constante y por darme la confianza necesaria para superar los desafíos que se presentaron. A la abuela Zuhima, por estar siempre pendiente y enorgullecerse por cada logro, por más pequeño fuese. A Rodrigo mi novio y amigo, por entender esta pasión, acompañarme y motivarme a seguir. A Sofi mi compañera de tesis y amiga, agradezco haber recorrido esta carrera juntas. Finalmente a Jorge y Nico mis maestros y guía, por confiar en mí, abrirme las puertas, enseñarme con paciencia y transmitirme su fuerte vocación.

Agradecimientos de Sofía Lazcano:

Quiero agradecer a mis padres, Mónica y Héctor, por regalarme su amor e inculcarme los valores que me acompañan en la vida, a mi hermano Federico, por ser mi cómplice y amigo. A Nicolas mi esposo, por impulsarme y acompañarme, por creer en mí y desafiarme siempre a ser mejor. A mi familia por estar siempre pendientes de mi carrera.

Al Servicio de Veterinaria y Remonta, oficiales, enfermeros y compañeros veterinarios, a quienes tengo como referentes, con quienes comparto días de trabajo y una linda amistad, gracias por su apoyo. Gracias también, a los veterinarios con los que he trabajado de forma honoraria, quienes me han transmitido la dedicación y vocación que requiere esta profesión, la cual intentaré mantener.

A Flor, con quien realizamos este trabajo, pero más importante aún mi gran amiga, con quien compartimos horas de estudio, exámenes, momentos felices y no tanto, con la cual seguiré contando en esta nueva etapa que comienza.

TABLA DE CONTENIDOS

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDOS	4
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	7
1.INTRODUCCIÓN	9
1.1. RELEVANCIA	9
1.2. EFICIENCIA REPRODUCTIVA	9
1.3. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL Y SEMEN CONGELADO	9
1.4. INTERACCIÓN ÚTERO-ESPERMATOZOIDES	11
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	12
2.1.SEMEN CONGELADO:	13
2.1.1.INTRODUCCIÓN:	13
2.1.2.PROCESAMIENTO DEL SEMEN	14
2.1.3.TASAS DE PREÑEZ	14
2.1.3.1 CONCEPTOS PREVIOS	14
2.1.3.2 MOMENTO Y FRECUENCIA DE LA INSEMINACION ARTIFICIAL	15
2.1.3.3 TASAS DE PREÑEZ Y DOSIS DE INSEMINACION	16
2.1.3.4 TASA DE PREÑEZ Y TECNICA	16
2.1.3.5 SELECCION DE LA YEGUA	17
2.2. TRANSPORTE ESPERMÁTICO	18
2.2.1. INTRODUCCIÓN	18
2.2.2.CONTRACCIONES UTERINAS	18
2.2.3. TRANSPORTE EN EL TRACTO REPRODUCTOR FEMENINO	19
2.2.4.RESERVORIOS EN LA HEMBRA	20
2.2.5. ELIMINACIÓN DEL SEMEN	21
2.3.ENDOMETRITIS	22
2.3.1.INTRODUCCIÓN	22
2.3.2.ENDOMETRITIS POST SERVICIO	22
2.3.3.DIAGNÓSTICO DE ENDOMETRITIS	23
2.3.4.FACTORES QUE AFECTAN LA RESPUESTA INFLAMATORIA	24
2.3.4.1. TIPO DE SEMEN (FRESCO O CONGELADO)	24
2.3.4.2. DOSIS Y CONCENTRACIÓN	26
2.3.4.3. SITIO DE INSEMINACIÓN	26

3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	27
4.1. OBJETIVO GENERAL	27
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1 PROYECTO	27
5.2 DURACIÓN, LUGAR Y ANIMALES	27
5.3 MANEJO REPRODUCTIVO DE LAS YEGUAS	28
5.4 SEMEN UTILIZADO	30
5.5 DISEÑO EXPERIMENTAL	30
5.6 COLECTA Y EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS:	31
5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
6. RESULTADOS	33
6.1 TRANSPORTE ESPERMÁTICO	34
6.2 RESPUESTA INFLAMATORIA	36
7. DISCUSIÓN	38
8. CONCLUSIONES	41
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Diseño experimental.....	32
Tabla 2. Media (\pm EE) de motilidad espermática total y progresiva del semen descongelado evaluado por CASA.....	34
Tabla 3. Media (\pm EE) de espermatozoides recuperados en los lavados de las trompas uterinas ipsilateral al folículo dominante de las yeguas del grupo control y de las yeguas inseminadas en el cuerpo del útero (Body) y en la punta del cuerno (Tip) con 50×10^6 (50) y 400×10^6 (400) de espermatozoides a las 2, 4 y 12 h pos-inseminación.....	35
Tabla 4. Media (\pm EE) de polimorfonucleares (PMNs) ($\times 10^6$) en los lavados uterinos de las yeguas control y de las yeguas inseminadas en la punta del cuerno (T) y en el cuerpo del útero (B) con 50×10^6 y 400×10^6 de espermatozoides a las 2, 4 y 12 horas pos-inseminación.....	37
Figura 1. Microscopía electrónica de barrido de espermatozoide equino y el epitelio de la papila.....	21
Figura 2. Microscopía electrónica de barrido, vista de gran aumento de los espermatozoides asociados con las cilias del epitelio.....	22
Figura 3. Microscopía electrónica de barrido mostrando espermatozoides y neutrófilos en el cuerno uterino a las 4 horas post inseminación.....	24
Figura 4. Microscopía electrónica de barrido mostrando la fagocitosis de un espermatozoide en el lumen uterino.....	24
Figura 5. Imagen ecográfica de folículo preovulatorio mayor a 33mm.....	29
Figura 6. Imagen ecográfica de corte transversal de cuerno uterino con edema 3 (compatible con estro).....	30
Figura 7. Rodado de cepillo citológico sobre portaobjetos.....	30
Figura 8. (A) Microscopía óptica (400x) de muestra citológica uterina negativa, conteniendo células endometriales. (B) Microscopía óptica (400x) de muestra citológica uterina positiva, conteniendo polimorfonucleares.....	31
Figura 9. Acondicionamiento para toma de muestras del lavado uterino.....	33
Figura 10. Lavados uterinos recuperados.....	33
Figura 11. (A) Lavado de tuba uterina ipsilateral al folículo dominante para recuperación de espermatozoides. (B) Recuperación en microtubos Eppendorf.....	34
Figura 12. Media de espermatozoides (\pm EE) recuperados de las tubas uterinas ipsilateral al folículo dominante en relación al (A) Tiempo y Sitio de inseminación; (B) Tiempo y Dosis de inseminación (C) Dosis y Sitio de inseminación.....	36
Figura 13. Porcentaje de yeguas con presencia de espermatozoides en los lavados de las tubas uterinas ipsilateral al folículo dominante luego de ser inseminadas en la punta del cuerno (Tip) y en el cuerpo del útero (Body) con 50×10^6 (50) y 400×10^6 (400) de espermatozoides a las 2, 4 y 12 horas pos-inseminación.....	37
Figura 14. Media de PMNs (\pm EE) recuperados en los lavados uterinos en relación al (A) Tiempo y Sitio de inseminación; (B) Tiempo y Dosis de inseminación y (C) Dosis y Sitio de inseminación.....	39

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la influencia del sitio y la dosis de inseminación sobre el transporte espermático y la respuesta inflamatoria uterina luego de la inseminación artificial (IA) con semen congelado equino. Se utilizaron 105 yeguas destinadas a faena, clínicamente normales, cíclicas, en celo y con citología endometrial negativa. Las yeguas fueron aleatoriamente inseminadas en el cuerpo del útero (Body) o en la punta del cuerno uterino ipsilateral al folículo dominante (Tip) con una pajuela - 50×10^6 (50) o con ocho pajuelas - 400×10^6 (400) de espermatozoides. Las yeguas del grupo control no fueron inseminadas. Las yeguas fueron humanitariamente sacrificadas a las 2, 4 y 12 h posteriores a la IA, conformando los siguientes grupos experimentales: **Body 50** (2h, 4h y 12h); **Tip 50** (2h, 4h y 12h); **Body 400** (2h, 4h y 12h); **Tip 400** (2h, 4h y 12h) y **Control**. Las tubas uterinas fueron separadas del útero y lavadas individualmente con 1 mL de solución salina fosfatada bufferada (PBS) para el conteo de espermatozoides en la cámara de Neubauer®. El útero se lavó con 50 mL de PBS para el posterior conteo de polimorfonucleares (PMNs) en cámara de Neubauer®. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (two-way ANOVA). Se consideraron como variables independientes el sitio, la dosis y el tiempo de inseminación; mientras que el número de espermatozoides y PMNs en los lavados fueron consideradas como variables dependientes. Se utilizó el método de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer para las variables paramétricas y las pruebas de Wilcoxon y Kruskal-Wallis para analizar los datos no paramétricos. La IA profunda aceleró el transporte espermático y aumentó el número de espermatozoides que alcanzaron la tuba uterina, sin aumentar la reacción inflamatoria comparado con la IA en el cuerpo del útero. Cuanto mayor la dosis de inseminación mayor el número de espermatozoides que alcanzaron la trompa uterina, causando una respuesta inflamatoria más intensa, pero de resolución más rápida. La IA profunda, no causó mayor inflamación que la IA en el cuerpo del útero cuando se utilizó la dosis alta. Mientras que, con la dosis baja la IA profunda causó menor reacción inflamatoria que la IA en el cuerpo del útero. En conclusión, la dosis y el sitio de inseminación afectaron el transporte espermático, mientras que la reacción inflamatoria fue influenciada por la dosis, el sitio y el tiempo pos-inseminación. La IA profunda es una técnica segura para ser utilizada en la yegua siempre y cuando se realice de forma correcta.

SUMMARY

The aim of this study was to determine the influence of the insemination site and dose on sperm transport and inflammatory response after artificial insemination (AI) using frozen semen. 105 mares destined for slaughter, clinically normal, cyclical, in heat, with negative endometrial cytology were used. The mares were randomly inseminated in the body (Body) or in the tip of the uterine horn ipsilaterally to the dominant follicle (Tip) with one straw - 50×10^6 (50) or eight straws - 400×10^6 (400) of spermatozoa. The mares in the control group were not inseminated. The mares were humanely slaughtered at 2, 4 and 12 h post-insemination, forming the following groups: Body 50 (2h, 4h and 12h); Tip 50 (2h, 4h, 12h); Body 400 (2h, 4h, 12h); Tip 400 (2h, 4h, 12h) and Control. The uterine tubes were separated from the uterus and flushed individually with 1mL of phosphate buffered saline (PBS) solution for sperm count in the Neubauer® chamber. The uterus was flushed with 50 mL of PBS for polymorphonuclear (PMNs) cells count in the Neubauer® chamber. Data were analyzed using two-way analysis of variance (two-way ANOVA). Insemination site, dose and time were considered as independent variables; while the sperm number and PMNs number in the flushes were considered as dependent variables. The multiple comparison Tukey-Kramer Test was used for parametric variables and the Wilcoxon and Kruskal-Wallis tests were used to analyze the non-parametric data. Deep horn AI accelerated sperm transport and increased the number of spermatozoa that reached the uterine tube, without increasing the inflammatory reaction compared to AI in the uterine body. The higher insemination dose increased the number of spermatozoa reaching the uterine tube, causing a more intense inflammatory response but with a faster resolution. Deep horn AI did not cause more inflammation than the AI in the uterine body. In conclusion, insemination site and dose affected sperm transport, while the inflammatory response was influenced by dose, site and post-insemination time. Deep AI is a safe technique to be used on the mare as long as it is done in a correct manner.

1.INTRODUCCIÓN

1.1. RELEVANCIA

Los equinos fueron introducidos a la región junto con la ganadería en el siglo XVII, desde entonces han sido una herramienta agropecuaria fundamental y protagonista de numerosas actividades. Al 2012 el stock equino en Uruguay constaba de aproximadamente 425 mil cabezas, ocupando el puesto 21 en el ranking mundial y el segundo puesto en cuanto a la relación habitantes por caballo, siendo un 10% animales reproductores (Ferrari y col., 2012). El número de animales deportivos y funcionales va en aumento al igual que las exportaciones de equinos en pie para actividades deportivas, paseo o reproducción. El sector equino, genera un valor agregado bruto para la economía uruguaya de casi un punto de PBI, aportando más de U\$\$ 330 millones (dólares americanos) al año, U\$\$ 29 millones (dólares americanos) en exportaciones y en lo que respecta al empleo, se estima que el sector genera anualmente U\$\$ 106 millones (dólares americanos) y 18.000 puestos de trabajo directos, que a su vez, componen núcleos familiares integrados por aproximadamente 67.000 personas (Ferrari y col., 2012). La importancia de profundizar los conocimientos en el área de la reproducción equina, radican no sólo en interés socio-económico, productivo y en salud animal, sino también, en que dada su similitud con la fisiología reproductiva humana, la yegua constituye un buen modelo de estudio para el humano ponderando la investigación en dicha especie (Ginther y col., 2004; Mihm y Evans, 2008; Gastal, 2011).

1.2. EFICIENCIA REPRODUCTIVA

El objetivo en la producción equina es generar un potro sano por yegua por año, para lograrlo, deben concebir en el primer mes post parto. La fertilidad está íntimamente relacionada con la eficiencia reproductiva y esta última con los resultados económicos (Nath, 2011).

La selección de la especie equina enfocada hacia el desarrollo de aptitudes deportivas, fenotípicas o utilitarias, fue en detrimento de su habilidad reproductiva. Es debido a esto que las yeguas presentan la tasa de fertilidad más baja en comparación con las demás especies domésticas (Engelken, 1999 citado por Sharma y col., 2010). Otro aspecto que influye sobre la capacidad reproductiva es la presencia de anestro estacional. La yegua es poliéstrica estacional de día largo (Brinsko y col., 2010). De acuerdo con un trabajo realizado en Rio Grande do Sul el 100% de las yeguas demostró estar ciclando en la primera quincena de octubre, mientras que en la primera quincena de mayo la totalidad de las yeguas en el estudio se hallaron en anestro (Winter, 2007). A esta limitación temporal fisiológica, se le agrega en algunas razas, una delimitación reglamentaria de la temporada de servicio. La cual puede incluso, estar determinada fuera del período cíclico natural, como ser el caso del Pura Sangre de Carrera en el hemisferio sur.

1.3. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL Y SEMEN CONGELADO

En 1784 se realizó por primera vez una inseminación exitosa en perros, surgiendo así la primera gran biotecnología para mejorar la reproducción y la genética de los animales de granja. La investigación sobre inseminación artificial (IA) en equinos comenzó en Rusia en 1899, estimulada particularmente por necesidad

bélica (Foote, 2010). La primera preñez con semen congelado en el caballo data de 1957, durante varios años esta tecnología reproductiva ha denotado un progreso limitado en comparación con otras especies (Barbacini, 2011). La congelación del semen permite su preservación por largos periodos de tiempo, facilita el almacenamiento y la disponibilidad, pero sobre todo puede ser usado prescindiendo de la presencia física del padrillo (Loomis, 2001; Loomis y Squires, 2005; Miller, 2008). Sin embargo, la mayoría de los sementales tienen un detrimento en la fertilidad con la congelación de semen (Loomis, 2001; Miller, 2008). La falta de estandarización en protocolos (Loomis, 2001; Sánchez, 2008) y la gran variabilidad en la calidad del semen congelado entre padrillos e incluso entre eyaculados del mismo animal (Vidament, 1997; Loomis y Graham, 2008) llevan a que la tasa de preñez con semen congelado varíe en un rango de 30% a 60% por ciclo (Sánchez, 2008). Gracias a la investigación, se han logrado grandes progresos. Las técnicas de procesamiento de semen han mejorado, se encuentran disponibles nuevos crioprotectores, se conoce el momento óptimo para inseminar a la yegua, que junto al uso de los inductores de la ovulación ha permitido la implementación de nuevas estrategias de inseminación que facilitan su uso. A pesar de esto, aún no hay consenso en ciertos aspectos y la técnica no ha desarrollado su máximo potencial, por lo que es fundamental continuar investigando.

La dosis inseminante es uno de los aspectos donde no se ha logrado consenso y ha ido variando con el tiempo de la mano de la investigación. Tradicionalmente la dosis recomendada tanto para semen fresco como para semen refrigerado es de 500×10^6 de espermatozoides con motilidad progresiva. Para el caso del semen refrigerado, asumiendo una pérdida del 50% suele enviarse el doble. Esta dosis ha sido probada a lo largo del tiempo (Brinsko, 2006). Pickett y col.(1997) relacionaron tasa de preñez y número de espermatozoides, recomendaron la dosis de 500×10^6 de espermatozoides con motilidad progresiva para los centros de cría promedio, siendo que la dosis de 100×10^6 de espermatozoides con motilidad progresiva arrojaba resultados inferiores y dosis mayores no mejoraban la fertilidad. Los autores señalaron que cuando las condiciones no son las óptimas, al usar dosis menores a 500×10^6 de espermatozoides con motilidad progresiva las tasas de preñez eran mayormente perjudicadas (Pickett y col. 1997 citado por Brinsko 2006). Fue de este modo, que la dosis de 500×10^6 de espermatozoides con motilidad progresiva, se convirtió en un dogma que incluso en la actualidad rara vez se ve desafiada (Brinsko, 2006). Sería de esperar que, desde ese momento, las mejoras en los diluyentes y el manejo de la yegua permitirían dosis de inseminación más bajas con éxito en los centros de reproducción promedio (Brinsko, 2006). Dosis menores (300×10^6 de espermatozoides: Ganhe y col, 1998; 100×10^6 espermatozoides totales de semen fresco: Rigby y col., 1998 y Kenney y col., 1975) logran resultados de fertilidad aceptables. Investigadores chinos con anterioridad, ya habían probado la eficacia de la inseminación a dosis menores (Cheng y col., 1962, citado por Brinsko 2006).

En el caso del semen congelado, evaluar los resultados de fertilidad para concluir cuál sería la dosis adecuada, resulta desafiante. Existe una gran variación entre los métodos de congelación, las calidades de los diluyentes, el momento y método de inseminación, etc. Además, muchos trabajos reportan el número total de espermatozoides utilizados, siendo que la motilidad post descongelación varía ampliamente entre los padrillos y entre eyaculados del mismo padrillo (Brinsko, 2006). Esto se ve reflejado en la reseña realizada por Brinsko, donde para la

inseminación convencional las dosis utilizadas en los trabajos varían entre 14×10^6 a 800×10^6 espermatozoides con motilidad progresiva (Brinsko, 2006). Si bien no se ha determinado una dosis estándar, el criterio mínimo para la comercialización de semen congelado parece ser una motilidad progresiva mayor a 30-35% y más de 600×10^6 de espermatozoides totales por dosis inseminante (Sanchez y col., 2008). La Federación Mundial de Cría de Caballos Deportivos en un esfuerzo por estandarizar dichos parámetros estableció los siguientes estándares para sus socios: más de 35% de motilidad progresiva post descongelado y dosis mayor a 250×10^6 espermatozoides motiles post descongelado.

Así mismo las dosis de inseminación también varían acorde a la técnica empleada. Las técnicas de inseminación profunda en dosis bajas pueden ser utilizadas para semen fresco, refrigerado y congelado, con el objetivo de reducir el número de espermatozoides de la dosis de inseminación (Brinsko, 2006). Más espermatozoides son recuperados del oviducto cuando se insemina profundamente, cerca de la unión útero tubárica (Rigby y col., 2000). Esto evidencia una mayor optimización del semen, lo cual constituye una ventaja cuando el stock es limitado. Reforzando dicho concepto Samper y col., (2008), tras fraccionar dosis de semen, concluyeron que con inseminación profunda es posible reducir el número espermatozoides y lograr tasas de preñez aceptables con semen congelado en entornos comerciales. No obstante, el nivel de reducción que resulte en una fertilidad aceptable varía entre padrillos (Brinsko, 2006), a modo de ejemplo: Petersen y col. (2002) inseminando con 50×10^6 de espermatozoides con motilidad progresiva mediante técnica de inseminación profunda, obtuvieron una tasa de recuperación embrionaria de 64% y Buchanan y col. (2000) con dosis menores (25×10^6 espermatozoides con motilidad progresiva) obtuvieron una tasa de preñez similar (60%) (Buchanan y col., 2000).

El interés por reducir el número de espermatozoides necesarios para conseguir buenos índices de preñez ha sido motivado por el elevado costo de la dosis inseminante de algunos padrillos, los costos de importación y exportación del semen, la imposibilidad de algunos sementales para cubrir la alta demanda de semen fresco, el uso de semen proveniente de la cola del epidídimo, semen sexado entre otras razones. Por estos motivos los propietarios presionan a los veterinarios para que fraccionen las dosis inseminantes como práctica habitual. Mientras los registros de razas admitan más de un descendiente por dosis de semen vendido, los dueños de yeguas continuarán tratando de maximizar el dinero invertido en una dosis de semen congelado, en consecuencia, el número de espermatozoides por inseminación se reduce significativamente (Samper y Plough, 2010).

1.4. INTERACCIÓN ÚTERO-ESPERMATOZOIDES

Una vez que los espermatozoides son depositados en el útero, comienzan dos eventos importantes: el transporte espermático que garantiza la llegada de gametos normales al sitio de fertilización (Suárez, 2006; Troedsson y col., 1998) y la respuesta inflamatoria fisiológica, mediante la cual se elimina el exceso de semen y contaminantes del útero (Troedsson y col., 1998; Woodward y col., 2013). Varios factores modifican estos dos eventos, entre ellos la dosis (Cazales y col., 2018), la concentración espermática (Kotilainen y col., 1994; Fiala y col., 2007) y el uso de semen congelado (Kotilainen y col., 1994).

Tanto en la monta natural como en la inseminación artificial, el semen es depositado en el útero. En este momento, ocurre además una contaminación bacteriana, la cual se pensaba que era la responsable del influjo de polimorfonucleares (PMN) al útero luego del servicio (Troedsson, 2006). Posteriormente estudios demostraron que dicho fenómeno se desarrollaba aún cuando la contaminación bacteriana fuera insignificante (Kotilainen y col., 1994). A su vez, los espermatozoides demostraron tener efecto quimiotáctico tanto *in-vivo* como *in-vitro* (Troedsson y col., 1995). La migración de los PMNs al endometrio ocurre rápidamente, ya a los 30 minutos post inseminación se recuperaron PMNs de la luz uterina mediante lavados uterinos (Katila, 1995).

La respuesta inflamatoria uterina consiste en una respuesta innata. Esta respuesta inespecífica permite repetir el "desafío" inmunológico sin desarrollo de anticuerpos anti-esperma (Canisso y col., 2020). Los espermatozoides, activan la cascada de complemento la cual dispara una señal quimiotáctica para la llegada de PMNs (Troedsson y col., 1995; Troedsson, 2006). Los neutrófilos activados se unen a los espermatozoides mediante mecanismos dependiente e independientes de complemento (Troedsson, 2006). Durante este proceso existe liberación de prostaglandina F2alfa (PGF2a) vía ciclooxygenasa a partir del metabolismo del ácido araquidónico desde las membranas celulares. La PGF2a además de ser un mediador inflamatorio, estimula contracciones miométriales (Troedsson, 2006)

El transporte espermático es un proceso complejo que culmina con la llegada de una pequeña fracción de los espermatozoides al oviducto (Scott, 2000). Aunque los espermatozoides participan activamente en el transporte a través del tracto reproductivo femenino, las contracciones uterinas y en el oviducto pueden ser más importantes que la motilidad espermática en si misma (Troedsson y col., 1998). Contracciones uterinas frecuentes, llevan rápidamente los espermatozoides hacia la punta de los cuernos, donde fue posible evidenciarlos ocho minutos luego de la inseminación en cuerpo uterino (Katila y col., 2000). El transporte espermático parece completarse a las 4 horas post inseminación (Brinsko y col., 1991) cuando la misma es realizada en el cuerpo uterino, pero cuando se utiliza la técnica de inseminación profunda, lavados uterinos tan pronto como 1 hora después de la inseminación no afectaron las tasas de preñez (Samper y col., 2016), indicando que tal vez dicho procedimiento acelere el tránsito de los espermatozoides hacia el sitio de fertilización.

Este trabajo se realizó con el fin de aportar conocimientos que ayuden a esclarecer algunos aspectos sobre la inseminación artificial con semen congelado en equinos. Para la cual se compara el transporte espermático (número de espermatozoides que alcanzan las tubas uterinas) y la reacción inflamatoria obtenida al inseminar en sitios distintos, con dosis diferentes. Se hipotetiza que el transporte espermático y la reacción inflamatoria uterina post-inseminación son dependientes del sitio de inseminación, de la dosis inseminante y del tiempo pos-inseminación.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.SEMEN CONGELADO:

2.1.1.INTRODUCCIÓN:

La primera preñez con semen congelado en el caballo data de 1957 y se obtuvo usando semen obtenido de la cola del epidídimo (Barker y Gandier, 1957). Sin embargo, durante varios años esta tecnología reproductiva ha denotado un progreso limitado en el equino comparado con otras especies (Barbacini, 2011). Los toros se han seleccionado basándose en la habilidad de su esperma para resistir los procesos de criopreservación, lo que ha permitido optimizar esta técnica. Dicha selección no ha sido aplicada en los padrillos, resultando en una gran variabilidad en la congelabilidad del semen entre los individuos (Loomis y Graham, 2008). Durante un largo periodo en la especie equina, solo algunos registros de razas autorizaba el uso de semen congelado, por este motivo el interés económico era mínimo y por ende los recursos asignados a su investigación eran escasos (Barbacini, 2011).

En 2001, la Asociación Americana de Cuarto de Milla y la Asociación Americana de Paint Horse, habilitaron la inseminación con esta técnica (Loomis, 2001; Squires, 2006). Actualmente la mayoría de las razas permiten su uso, resultando una mejora en la fertilidad (Barbacini, 2011). Uruguay y la región no son ajenos a estos cambios, las principales sociedades de criadores, como ser la sociedad de criadores de caballos criollos (SCCC), árabes (SCCA) y cuarto de milla (SCCM) admiten productos obtenidos por esta técnica.

La inseminación artificial con semen congelado presenta las siguientes ventajas: en primer lugar, la preservación del semen por largos periodos, lo cual permite su comercialización en todo el mundo. Facilita la coordinación del envío, que puede ser realizado con anticipación y almacenado en los establecimientos de cría hasta el momento óptimo de inseminación, además reduce el costo de transporte de las yeguas y la potencial transmisión de enfermedades contagiosas. En segunda instancia maximiza la utilización de padrillos de élite debido al menor desperdicio de semen ya que todo el semen colectado para la congelación es procesado, resultando en promedio 10-12 dosis inseminantes por eyaculado congelado (Loomis, 2001). Además se puede utilizar el semen aun cuando el padrillo no está disponible ya sea por competencias, enfermedades, recuperación de una lesión o incluso cuando ha muerto (Loomis, 2001; Loomis y Squires, 2005; Miller, 2008).

A pesar de esto, la técnica enfrenta algunas limitaciones a tener en cuenta: en primer lugar, mayores costos y experiencia técnica en el manejo del semen, en parte debido a los cuidados que demanda su almacenamiento y transporte. En segundo lugar, el éxito de la inseminación y la maximización de la fertilidad del semen congelado, requiere que quienes lo utilicen estén familiarizados con los procedimientos adecuados y con las estrategias del servicio. Dado a que en el equino se recomienda que la inseminación con semen congelado se realice dentro de 12 horas previas o 6 horas posteriores a la ovulación, es necesario un manejo intensivo de la yegua y un mayor número de revisiones, lo cual incrementa los costos (Loomis, 2001; Loomis y Squires, 2005; Miller, 2008). Otra limitante es la gran variabilidad en la calidad en el semen congelado entre padrillos (Leño, 2006) e incluso entre eyaculados del mismo animal (Vidament, 1997; Loomis y Graham, 2008). También se debe tener presente que la mayoría de los padrillos tienen un

detrimento en la tasa de preñez con la congelación (Loomis, 2001; Miller, 2008), asimismo un gran porcentaje de éstos pueden producir semen con una calidad post descongelación más aceptable de lo que se ha informado en la literatura (Loomis y Graham, 2008). Algunos sementales toleran mejor la criopreservación cuando ciertos aspectos del protocolo son personalizados (Loomis y Graham, 2008).

2.1.2.PROCESAMIENTO DEL SEMEN

Luego de la colecta, se incorpora al semen diluyente en base a leche descremada y se evalúa su motilidad y concentración. El plasma debe ser removido, generalmente mediante centrifugación y resuspendido en un diluyente con agentes crioprotectores para su congelación. Por último, el semen es acondicionado en pajuelas para ser congelado siguiendo el protocolo indicado para el diluyente en particular (Sánchez y col., 2008).

Los diluyentes para congelar contienen sustancias que estabilizan el pH, neutralizan metabolitos tóxicos producidos por los espermatozoides, protegen contra shock térmico, mantienen el balance electrolítico y osmótico, inhiben el crecimiento bacteriano y aportan energía. Además, presentan crioprotectores intracelulares y extracelulares que previenen la formación de cristales de hielo intracelular (Alvarenga y col., 2016). Los crioprotectores se clasifican como: penetrantes y no penetrantes. Dentro de la primera categoría se encuentran etilenglicol, glicerol, metilformaldehído, dimetilsulfoxido y amidas (metilformamidina y dimetilformamidina), mientras que azúcares, lipoproteínas y otras macromoléculas componen el segundo grupo. Los penetrantes generalmente son más efectivos, ya que modifican propiedades celulares y extracelulares. (Graham, 2011). La combinación de crioprotectores brinda mayor protección comparado con el uso de un único agente (Alvarenga y col., 2016).

Es reconocido, en general, que las tasas de preñez con semen congelado son menores que las obtenidas con semen fresco. Esta reducción es atribuida a dos factores: la disminución del número de espermatozoides viables y la disfunción de la subpoblación sobreviviente. Incluso con adecuados protocolos de congelación, un 40-50% de los espermatozoides no sobreviven. El shock de frío, la tasa de enfriamiento, la composición del diluyente y el estrés osmótico afectan la proporción de sobrevivientes, mientras que la estabilidad de la membrana, el estrés oxidativo, la integridad de los receptores y estructura nuclear perjudican la funcionalidad de estos (Watson, 2000).

2.1.3.TASAS DE PREÑEZ

2.1.3.1 CONCEPTOS PREVIOS

Los resultados reproductivos pueden evaluarse con los siguientes parámetros; Tasa de preñez por temporada: porcentaje de yeguas servidas durante la temporada que quedaron preñadas; Tasa de preñez por ciclo: para este parámetro se toma en consideración el número de ciclos utilizados y la cantidad de preñeces logradas. Es un indicador más sensible para evaluar la fertilidad del padrillo; Tasa de preñez al primer ciclo: porcentaje de yeguas preñadas en el primer ciclo utilizado (Nath, 2011).

Las tasas de preñez varían ampliamente en un rango de 30% a 60% por ciclo, sin embargo, es posible obtener resultados menores al 10% o mayores al 70% de preñez por ciclo o temporada (Sanchez, 2008). Esta variación es debida a la falta de estandarización en protocolos de la técnica que incluyen: manejo, procesamiento y variación individual del semen; selección de la hembra (edad y categoría); momento y sitio de inseminación, así como la dosis, volumen y concentración del semen utilizado (Loomis, 2001; Sánchez, 2008).

Bajo condiciones controladas, con manejo consistente de la yegua y personal experimentado en el procesamiento del semen, se observa una diferencia aproximada del 10% en las tasas de preñez por ciclo para semen refrigerado y congelado (Jasko y col., 1992). Jasko en 1992 obtuvo tasas de preñez por ciclo: de 65% con semen refrigerado y 56% para semen congelado (Jasko, 1992 citado por Loomis, 2001). Esta variación también fue constatada por Loomis (2001) quien obtuvo tasas de preñez al primer ciclo y tasa de preñez por temporada 59,4% y 74,7% respectivamente en semen refrigerado y 51,3% 75,6% con semen congelado. Es posible que esto no ocurra comercialmente debido a las inconsistencias y errores técnicos en el manejo del semen refrigerado y congelado a campo. Esto fue confirmado por Squires y col. (2006) donde documentaron tasas de preñez por ciclo de 44% y 46% para semen refrigerado y congelado respectivamente. Posteriormente Loomis y Squires (2005) documentaron tasas similares a las anteriores: tasa de preñez al primer ciclo de 58,1% y tasa de preñez por ciclo 52,7%. En este caso la información fue recabada en la temporada 2003 a partir de la utilización de semen proveniente de un único lugar (Loomis y Squires, 2005). La tasa de preñez por ciclo fue 45% en un estudio retrospectivo con datos obtenidos durante la temporada 2006-2007, en este caso se utilizó una dosis de inseminación profunda dentro de 6 horas post ovulación (Miller, 2008). Una tasa similar (48,6%) se obtuvo con igual técnica en un estudio retrospectivo realizado en un centro de inseminación comercial en Inglaterra, donde tampoco se evidenció diferencia en la tasa de preñez entre el uso de semen refrigerado y congelado (Lewis y col. 2015).

2.1.3.2 MOMENTO Y FRECUENCIA DE LA INSEMINACION ARTIFICIAL

Existen numerosos protocolos que modifican el número de inseminaciones por ciclo y el momento de la inseminación artificial (IA) en relación a la ovulación. Los resultados son perjudicados cuando la inseminación se realiza más de 12 horas antes o después de la ovulación, a medida que dicho intervalo decrece la tasa de preñez se incrementa (Sieme y col., 2003).

Usando IA dentro de 8 horas pre ovulación y 6 horas post ovulación las tasas de preñez obtenidas fueron 39,1% y 37,8% respectivamente, no habiendo diferencias entre inseminar pre o post ovulación (Barbacini y col., 1999).

Una de las limitaciones del uso del semen congelado radica en el mayor costo veterinario asociado a la necesidad de examinar a la yegua 3 o 4 veces por día para conseguir inseminar dentro de las 6 a 8 horas post ovulación. Una forma de simplificar dicho manejo es utilizar inseminación con dos dosis a tiempo fijo. Este protocolo implica exámenes ecográficos diarios durante el celo, inducción de la ovulación usando gonadotrofina coriónica humana (hCG) cuando se detecta un folículo mayor a 35 mm e inseminación a las 24 y 40 h después de la inyección. De

esta manera las yeguas que ovulan de 18 a 52 h después de la inducción quedarán cubiertas (Loomis y Squires, 2005). No se evidenciaron diferencias en la tasa de preñez en yeguas que recibieron múltiples inseminaciones, (el 90% dos dosis: a las 24 y 40 horas post inducción con hCG), frente a yeguas inseminadas con única dosis dentro de las 6 horas post ovulación (Squires y col., 2006) concordando con la información publicada por Loomis y Squires (2005). Vidament (2005), describe una tasa de preñez por ciclo de 45% usando doble inseminación con 300×10^6 de espermatozoides totales separada 24 horas, la cual se redujo a 33% cuando para la segunda inseminación se utilizó 150×10^6 espermatozoides totales.

Si bien este método es conveniente en cuanto al manejo, su uso se ve restringido cuando la cantidad de semen es limitado o costoso, como lo son el caso de padrillos que han muerto o que residen en otro país (Miller, 2008). En cambio, si se utiliza la técnica de dos IA a tiempo fijo descrita anteriormente, pero se reduce el número total de espermatozoides a la mitad en cada inseminación (400×10^6), la tasa de preñez no presenta diferencias significativas con la obtenida con una sola inseminación dentro de 6 horas post ovulación con 800×10^6 (Reger y col., 2003).

2.1.3.3 TASAS DE PREÑEZ Y DOSIS DE INSEMINACION

La dosis mínima recomendada para obtener tasas de preñez por ciclo satisfactorias es de $>300 \times 10^6$ de espermatozoides con motilidad progresiva para semen fresco y de $>200 \times 10^6$ de espermatozoides con motilidad progresiva para semen congelado cuando se utiliza la inseminación convencional, mientras que dosis de inseminación $\leq 100 \times 10^6$ de espermatozoides con motilidad progresiva tiende a tener tasas de preñez por ciclo subóptimas (Morris y Lyle, 2011).

Con el fin de disminuir el número de espermatozoides necesarios para obtener buenos índices de preñez es que se crearon las técnicas de inseminación profunda por histeroscopia e inseminación profunda en punta del cuerno guiada de forma manual transrectalmente. Usando 100×10^6 de espermatozoides en cuerpo, punta de cuerno o histeroscopia no se evidenciaron diferencias en las tasas de preñez, al comparar dichos resultados con 800×10^6 en cuerpo (Sieme y col., 2004).

2.1.3.4 TASA DE PREÑEZ Y TECNICA

Las técnicas de inseminación a dosis bajas, se desarrollaron inicialmente para su uso con semen sexado, ya que su procesamiento es lento como para producir dosis inseminantes adecuadas para inseminar en el cuerpo uterino (Sieme y col., 2004). A su vez, el aumento del uso del semen congelado y el alto costo de la dosis de semen de algunos padrillos, han sido incentivo para reducir la cantidad de espermatozoides utilizados por inseminación. Aunque esta técnica puede parecer novedosa, trabajadores rusos informaron sobre la inseminación profunda en equinos en la década de 1930 (Brinsko, 2006)

Se han descrito dos técnicas para la inseminación con bajos números de espermatozoides: la inseminación profunda en punta de cuerno con una pipeta flexible, atraumática guiada de forma manual transrectalmente hasta corroborar que la punta de la pipeta se encuentre próxima a la papila de la unión útero tubárica

(UUT) y la inseminación profunda por endoscopia a través de la utilización de un histeroscopio.

La inseminación profunda manual en el cuerno ipsilateral al folículo preovulatorio es un método sencillo utilizado actualmente para la IA con dosis bajas. La mayor desventaja manifestada por algunos autores, es que puede causar trauma e irritación durante su manipulación si no es realizado cuidadosamente (Reger y col., 2003; Samper y col. 2008). Ésto, fue lo que argumentaron Reger y col., (2003) tras hallar una disminución en la recuperación embrionaria cuando se realizó la técnica profunda en comparación con la convencional (20% y 50% respectivamente), empleando dos inseminaciones con 200×10^6 e intervalo de 16 horas (Reger y col., 2003). Los mismos resultados fueron obtenidos por Squires y col., (2002). Sin embargo diversos estudios no evidenciaron diferencias en la tasa de preñez, poniendo en cuestionamiento dicha afirmación, tal es el caso del trabajo publicado por Sieme y col.(2004) donde no se reportaron diferencias en las tasas de preñez entre ambas técnicas con 100×10^6 ni con 800×10^6 de espermatozoides congelados, en hembras normales (Sieme y col., 2004). De todas maneras la IA en punta de cuerno no es una técnica óptima para yeguas problema (Sieme y col., 2004). Al igual que Sieme y col. (2004), Clement y col. (2005) y Petersen y col. (2002) no obtuvieron diferencias en los resultados obtenidos entre los métodos convencional y profundo, en estos trabajos, usaron doble inseminación en un intervalo de 24 horas, en punta de cuerno con 400 millones y 50 millones de espermatozoides respectivamente. Por otro lado Govaere y colaboradores (2014), obtuvieron resultados beneficiosos usando inseminación profunda con dosis bajas (27×10^6 de espermatozoides con motilidad progresiva).

2.1.3.5 SELECCION DE LA YEGUA

La selección y manejo de la yegua tiene un rol significativo en los resultados obtenidos con semen congelado (Sieme y col., 2004). Entre otros factores evaluados, el estatus de las yeguas demostró presentar el mayor impacto sobre la tasa de preñez (Samper, 2001).

Datos recolectados por Samper, durante las temporadas reproductivas entre 1991 y 2000, de 578 yeguas inseminadas con semen congelado de 108 padrillos, arrojaron una tasa de preñez al primer ciclo de 56,7%. Al desglosar dichos datos en categorías de yeguas, se observa una tasa de 37,2 % en yeguas vírgenes mayores 8 años; 56,2% en yeguas falladas; 59,3% en yeguas paridas, 68,8% en vírgenes menores de 7 años y 38,5% en yeguas que debieron ser tratadas por endometritis (Samper, 2001). Otros autores también reportaron diferencias en las tasas de preñez entre yeguas falladas, vírgenes y paridas, siendo menores en yeguas consideradas problemáticas (falladas) que en yeguas reproductivamente normales (37,2% y 48,4% respectivamente) (Barbacini y col., 1999). La fertilidad con semen congelado también se ve disminuida en yeguas inseminadas en el primer celo posparto (20%) comparado con el celo subsiguiente (56%) (Sieme y col., 2004) y en yeguas mayores a 16 años (Barbacini, 1999)

En la última década se han logrado progresos en el método de congelación, disponibilidad de nuevos crioprotectores, mayor conocimiento de los profesionales en técnicas de evaluación, manejo y descongelación del semen, uso de estrategias

de inseminación más simples y disponibilidad de hormonas para las hembras, son algunos de los cambios que han incrementado los resultados tornando la técnica más popular entre criadores y veterinarios.

2.2. TRANSPORTE ESPERMÁTICO

2.2.1. INTRODUCCIÓN

El transporte espermático en la hembra es mucho más que la simple migración de los espermatozoides al sitio de fertilización (Scott, 2000). Diversos mecanismos regulan el paso de los espermatozoides a través del tracto reproductor femenino asegurando que solo los que tengan morfología y motilidad normal sean los que tengan éxito y consigan llegar al sitio de fertilización (Suarez, 2006).

Los espermatozoides pueden permanecer dentro de la hembra durante días o incluso meses en algunas especies, a la espera de la llegada del ovocito (Suarez, 2006). Existen, en los equinos, reportes de preñeces con inseminación cinco a seis días antes de la ovulación (Day, 1942; Burkhardt, 1949).

En los animales en que el semen es depositado en la vagina, existe una respuesta inmunitaria a este nivel, además el cérvix y el mucus cervical constituyen otra barrera para la selección de los espermatozoides. En el equino, tanto en la monta natural como en la IA el semen es depositado en el útero, por lo que dichas barreras son evitadas. En cambio, los espermatozoides deben enfrentar la respuesta inflamatoria uterina y atravesar la unión útero-tubárica para lograr ingresar a la tuba uterina (Suárez, 2002). Solo unos pocos espermatozoides alcanzan la tuba uterina en comparación con la cantidad depositada. Pese a que el número siempre es proporcionalmente bajo, se demostró un aumento de células espermáticas en la misma al día 5 y 8 luego de comenzado el celo en comparación con días previos o posteriores (Parker y col. 1975).

Se ha observado que la habilidad del semen congelado para pasar la UUT, formar reservorios y en particular para alcanzar la ampolla fue mucho menor que la del semen fresco (Bader, 1982).

2.2.2. CONTRACCIONES UTERINAS

Si bien la motilidad de los espermatozoides contribuye al transporte a través del tracto reproductivo femenino, las contracciones del miometrio pueden ser más importantes (Troedsson y col. 1998). La prostaglandina está presente en el plasma seminal pero también es originada por la endometritis fisiológica inducida por el servicio, donde no solo actúa como mediador inflamatorio sino que también estimula las contracciones uterinas (Troedsson, 2006). Además, la monta, la distensión de la vagina, la manipulación cervical, la infusión uterina y en algunos casos la estimulación con el padrillo resultan en un pico de oxitocina (Nikolakopoulos y col. 2000), dichos estímulos incrementan el número de contracciones uterinas medidas por ultrasonografía (Campbell y England, 2004). Katila y col. (2000) utilizando cintigrafía demostraron la ocurrencia de contracciones uterinas dentro de la primera media hora luego de la inseminación pero con gran variación entre las hembras,

entre 5 y 65 contracciones durante este periodo. Se identificaron también cuatro a siete movimientos circulares de espermatozoides en el cuerpo y en zona más ventral de los cuernos uterinos, seguidos de una rápida afluencia de espermatozoides en la punta del cuerno y el posterior retorno al cuerpo. Hallazgos similares se reportaron por Troedsson y Liu en un trabajo no publicado, donde usaron electromiografía (Troedsson y col., 1998). La actividad miométrica inicial duró media hora, para luego aumentar nuevamente a las 4 horas hasta al menos 12 horas después de la inseminación. Es probable que esta segunda fase de contracciones sea necesaria para la eliminación del exceso de semen (Troedsson y col., 1998).

2.2.3. TRANSPORTE EN EL TRACTO REPRODUCTOR FEMENINO

Ocho minutos después de la inseminación artificial se evidenciaron espermatozoides marcados por radioisótopos en la punta de los cuernos uterinos (Katila y col., 2000). En el 66.6% de las yeguas se pudieron recuperar espermatozoides de la tuba uterina a la media hora de la inseminación (Fiala y col., 2010). Sin embargo, Brinsko y colaboradores realizando lavados uterinos a las 0,5 y 2 horas post inseminación tuvieron una disminución en la tasa de preñez (Brinsko y col., 1990), mientras que lavados realizados 4 horas post inseminación, no redujeron la fertilidad (Brinsko y col. 1991). Bader (1982) comparó el transporte espermático en yeguas sacrificadas a las 2, 4 y 6 horas de inseminadas, usando dosis de 100 a 4700×10^6 . Al igual que los citados autores recuperó espermatozoides a las 2 horas, pero encontró diferencias significativas en el número de espermatozoides entre los intervalos de tiempo estudiados, siendo la mayor cantidad a las 4 horas post inseminación. En coincidencia, un trabajo publicado por Fiala y col. (2007) el porcentaje de yeguas que tenían espermatozoides en las tubas uterinas y unión útero tubárica (UUT), independientemente de las concentraciones de espermatozoides comparadas, fue similar en todos tiempos de observación (2, 4 y 24 horas). Con cualquiera de las tres concentraciones utilizadas, 2 h después de la inseminación habría suficiente esperma en la UUT para permitir la fecundación en más del 54% de las yeguas, aumentando a 67 y 74% a las 4 y 24 h. Por otro lado, Fiala y col. (2010) no observaron diferencias en el número de espermatozoides obtenidos en el oviducto, ni en el número de yeguas con presencia de espermatozoides en las tubas uterinas entre los grupos 0,5, 1, 2, 4, 10 y 24 horas post IA con dosis de 500×10^6 de semen refrigerado. En otro estudio Samper y col. (2016), demostraron que lavados uterinos realizados 1 hora post IA con semen congelado en punta de cuerno, no afectaron las tasas de preñez en yeguas normales, mientras que yeguas subfértiles mostraron una tendencia a incrementar la fertilidad.

La distribución espermática es idéntica tanto en los cuernos como en las tubas uterinas, independientemente del lugar donde se encuentre el folículo dominante cuando se utiliza inseminación en cuerpo uterino (Fiala y col., 2008; Fiala y col., 2010). En cambio, cuando la inseminación se realiza en cuerno ipsilateral al folículo dominante, la recuperación espermática del oviducto del mismo lado, fue mayor que la del contralateral a las 18 horas post inseminación con semen fresco (Rigby y col., 2000). La cantidad de espermatozoides obtenidos de la trompa uterina ipsilateral en yeguas inseminadas en la punta del cuerno del mismo lado, duplica al de las yeguas inseminadas en el cuerpo uterino (Rigby y col., 2000).

2.2.4.RESERVORIOS EN LA HEMBRA

La yegua presenta estro prolongado, la duración promedio es de 6,5 días y la ovulación generalmente ocurre 24 a 48 horas antes de finalizarse (McCure y col., 2011). Por lo que para conseguir la fertilización, los espermatozoides del equino se han adaptado a sobrevivir por largo tiempo en el tracto reproductivo de la hembra, es por eso que luego de su llegada al oviducto, se agrupan formando reservorios (Scott y col., 2000). La unión útero tubárica (Scott y col., 2000), el epitelio oviductal (Thomas y col., 1994) y las glándulas endometriales (Fiala y col., 2010) se han sugerido como los posibles sitios de reserva

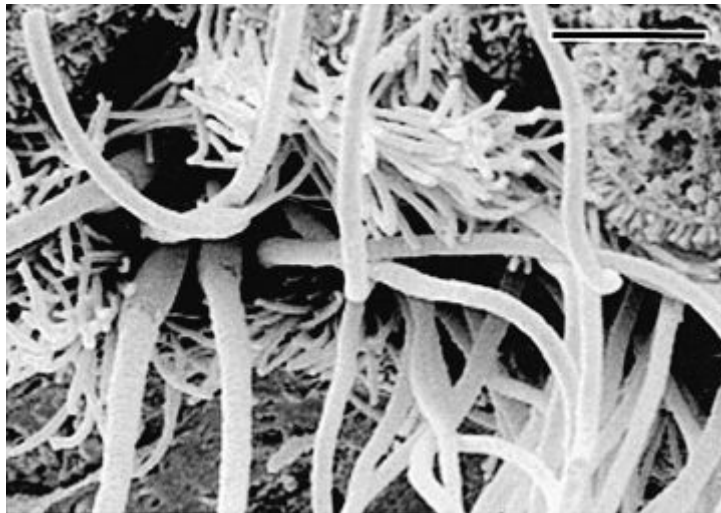


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido de espermatozoides equinos y el epitelio de la papila, donde los espermatozoides se encuentran en la profundidad de un pliegue epitelial de la unión útero tubárica, presentando la disposición uno al lado del otro 18 horas después de la inseminación (bar=2 μ m) (Scott, 2000)

El reservorio oviductal cumple tres funciones: previene la poliespermia, mantiene la fertilidad y regula la capacitación e hiperactivación del espermatozoide. La capacitación se define como un conjunto de cambios en la membrana plasmática que permite la reacción acrosómica. La hiperactivación es un incremento en la motilidad del flagelo (Suárez, 2002).

Un 70% de las yeguas presentan espermatozoides en la unión útero tubárica a la 1, 2 o 4 horas post inseminación (Fiala y col., 2010) y 18-26 horas post inseminación (Scott y col., 2002). Los mismos se localizan, particularmente dentro de la luz de la papila o insertos en la pared, en contacto íntimo con el epitelio luminal, siendo posible observarlos dispuestos en grupos uno al lado del otro a las 18-26 horas post inseminación (Scott y col., 2002). Fiala y colaboradores en 2010, a su vez, observaron células espermáticas en las glándulas endometriales desde 0,5 hasta las 24 horas post inseminación, cuyo número decrece con el transcurso del tiempo.



Figura 2. Microscopía electrónica de barrido, vista de gran aumento de los espermatozoides asociados con las cilias del epitelio (bar=1 μ m) (Suárez, 2006).

Las células espermáticas se adhieren al epitelio oviductal por la región rostral del acrosoma (Thomas y col., 1994). Dicha adhesión impide la capacitación y prolonga la viabilidad de los espermatozoides hasta el momento próximo a la ovulación, lo cual se logra manteniendo la concentración de calcio baja dentro de éstos. Esto podría servir para prolongar la vida útil de los espermatozoides, ya que la capacitación y la posterior reacción acrosómica implican un aumento de calcio que finalmente conducen a la muerte del espermatozoide si no se produce la fertilización (Dobrinski y col., 1996; Ball, 2011).

Dobrinski y col. (1995) demostraron *in vitro* que los espermatozoides criopreservados presentan una menor capacidad para unirse al epitelio del oviducto y a la zona pelúcida que los de semen fresco. Observaron también, un mayor porcentaje de espermatozoides con daño de membrana, daño acrosomal y menor motilidad. Esto explica en parte la reducción de la fertilidad del semen congelado.

2.2.5. ELIMINACIÓN DEL SEMEN

Al momento del ingreso del embrión al útero las condiciones deben ser óptimas, por lo que el exceso de semen, los espermatozoides anormales y contaminantes que puedan ingresar durante la monta o inseminación artificial deben ser eliminados. Esto se logra gracias a las contracciones y a la respuesta inflamatoria uterina. Un estudio realizado por Katila y col. (2000), demostró que a las 2,5 horas de la inseminación la mayoría del semen se encontraba en la vagina mientras otra parte había sido eliminada y que a las 4,5 horas prácticamente no se encontraba semen en el útero.

Bader (1982), evidenció fagocitosis, interrupción de la membrana plasmática y pérdida del acrosoma en espermatozoides recuperados de tracto reproductivo femenino y evaluados mediante microscopía electrónica a las 4 horas post IA. Dichas alteraciones se incrementaron con el paso de tiempo. Una eliminación gradual desde el oviducto puede ser interpretada como el resultado de la reducción de espermatozoides encontrados a las 6 horas en comparación con 4 horas, es probable que (al igual que se ha descrito en otras especies) algunos espermatozoides pasen a través de los oviductos hacia cavidad abdominal (Bader, 1982).

2.3.ENDOMETRITIS

2.3.1.INTRODUCCIÓN

El útero de la yegua está protegido de contaminantes gracias a mecanismos físicos, inmunológicos y al sistema linfático funcional (Malschitzky y col. 2007). Durante el servicio el semen es depositado junto con bacterias en el útero, constituyendo una fuente de contaminación y causando una respuesta inflamatoria (Troedsson, 2011).

2.3.2.ENDOMETRITIS POST SERVICIO

La reacción inflamatoria inducida por el servicio, es un proceso fisiológico y necesario por el cual el exceso de semen y la contaminación bacteriana son eliminados del tracto reproductivo femenino (Troedsson y col., 1998). Dicho proceso se desarrolla mediante dos caminos complementarios: eliminación mecánica y respuesta inflamatoria. La respuesta inflamatoria es de tipo innata, lo cual constituye una ventaja cuando se sirve sucesivamente con el mismo padrillo (Lyle, 2011). Una vez en el útero los espermatozoides estimulan la cascada de complemento, determinando el influjo de PMNs al útero (Troedsson y col., 1995; Troedsson, 2006; Woodward y col., 2013). Kotilainen y col., (1994) concluyeron que dicha respuesta ocurre tanto por inseminación artificial como por monta natural. Katila (1995) demostró el influjo de PMNs a la luz uterina a partir de los 30 minutos post IA. El número fue en aumento hasta lograr el pico a las 8 horas, manteniéndose por 12 a 24 horas. A las 48 horas la mayoría de los PMNs habían desaparecido. Sin embargo, en otro estudio, dos días después de la monta o inseminación, fue posible recuperar espermatozoides intactos, dañados y cabezas espermáticas dentro de neutrófilos por lavado uterino (Watson y Nikolakopoulos, 1996), los autores adjudicaron esta menor tasa de remoción espermática al momento en que las yeguas fueron cubiertas (un día antes de la ovulación), ya que el día de la ovulación el útero y el cérvix comienzan a estar bajo influencia de la progesterona (Watson y Nikolakopoulos, 1996). Fiala y col. (2007) evidenciaron un comportamiento similar al obtenido por Katila (1995), presentándose el momento de mayor inflamación a las 4 horas cuando se comparó con 2 y 24 horas (Fiala y col., 2007).

Los PMNs fagocitan los espermatozoides capturados y aumenta la liberación de prostaglandina F2alfa (PGF2a) a partir del metabolismo de ácido araquidónico de las membranas celulares por la vía de la ciclooxigenasa (Troedsson y col., 1995; Canisso y col., 2020). Este mediador también tiene acción sobre el miometrio, causando la contracción del músculo liso, contribuyendo a la eliminación del líquido acumulado y productos inflamatorios nocivos (Troedsson y col., 1995). La oxitocina que es liberada por la pituitaria frente a diversos estímulos relacionados a la monta o la inseminación, también participa en las contracciones miometriales (Nikolakopoulos y col., 2000). Una vez que dichos productos nocivos son eliminados del útero, la inflamación disminuye y el ambiente retorna a la normalidad, siendo posible la sobrevivencia del embrión cuando entra al útero el día 5 o 6 post ovulación. Aquellas hembras que fallan en resolver la endometritis dentro de 48-72 horas luego del servicio, son categorizadas como yeguas susceptibles a la endometritis persistente post-servicio (Woodward y col., 2013; Canisso y col., 2020).

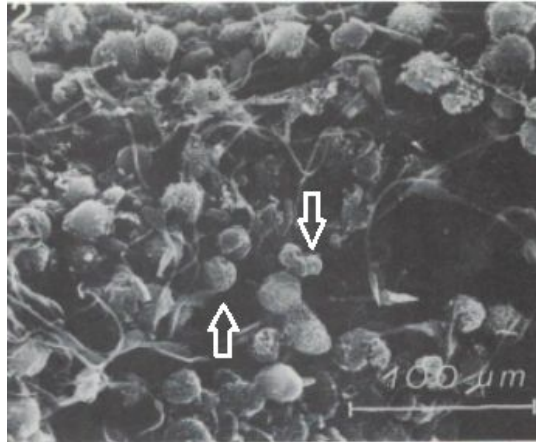


Figura 3. Microscopía electrónica de barrido mostrando espermatozoides y neutrófilos en el cuerno uterino a las 4 horas post inseminación (Bader,1982).

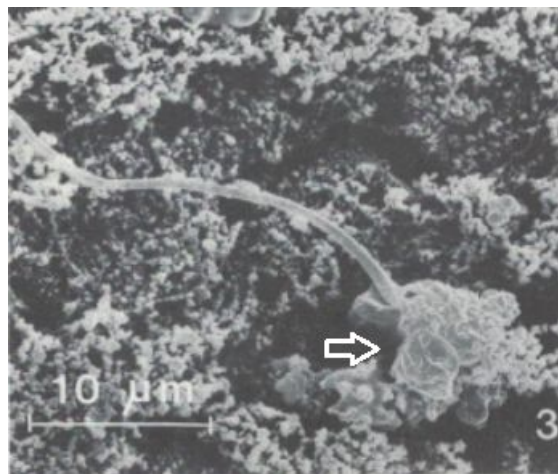


Figura 4. Microscopía electrónica de barrido mostrando la fagocitosis de un espermatozoide en el lumen uterino (Bader, 1982).

2.3.3.DIAGNÓSTICO DE ENDOMETRITIS

Los métodos usados para evaluar la inflamación uterina son: la medición del acúmulo de fluido uterino con ecografía y conteo de PMNs en muestras obtenidas por cepillos citológicos, hisopos o colecta de fluido uterino mediante tampones o lavado de bajo volumen (Bohn y col., 2014). La toma de muestras uterinas debe realizarse bajo condiciones de esterilidad, evitando que el dispositivo de muestreo sea expuesto al ambiente, y solamente se exteriorice una vez atravesado el orificio externo del cérvix. Para su observación las muestras se preparan haciendo rodar el cepillo o hisopo sobre un portaobjetos y se deja secar para una posterior tinción con Wright Giemsa (Card, 2005). Se puede utilizar una doble protección para minimizar la contaminación vestibular, vaginal y cervical al momento de la entrada y salida del útero (Card, 2005).

El lavado uterino de bajo volumen consiste en infundir 50-150 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y a continuación se masajea el útero previo a la colecta del lavado (Bohn y col., 2014; LeBlanc, 2011). Su principal ventaja es que permite evaluar mayor superficie endometrial (Bohn y col., 2014; Canisso y

col.,2020). La colecta es centrifugada y resuspendida en 1 ml de PBS o de lo contrario se debe mantener en un tubo en vertical para que decante. Se toma una muestra para colocar en el portaobjetos y se tiñe como ya fue descrito (Card, 2005; LeBlanc 2011).

Las células presentes en una muestra endometrial exfoliativa incluyen células endometriales, neutrófilos, linfocitos, monocitos, macrófagos, eritrocitos y escamas. Los criterios para la interpretación de los resultados citológicos fueron reseñados por Card (2005). Estos métodos incluyen: cantidad de neutrófilos por campo (400x), neutrófilos por portaobjetos, relación de neutrófilos-células epiteliales y el porcentaje de neutrófilos (Card, 2005). Algunos autores usan un sistema positivo/negativo, mientras que otros cuantifican el grado de inflamación, pero hay una falta de acuerdo sobre las pautas (Card, 2005).

Un trabajo realizado por Jorge y col. (2017) que compara el porcentaje de PMNs obtenidos por las técnicas de cepillo citológico y lavado de bajo volumen, concluye que no hay diferencias entre la utilización de estas técnicas en cuanto a su eficacia, en cambio plantea mayor practicidad con el uso del cepillo frente al lavado de bajo volumen. Bohn y col. (2014) también compararon técnicas citológicas de diagnóstico, en este caso los métodos evaluados fueron: cepillo citológico e hisopo con doble protección y lavado de bajo volumen. La celularidad, la calidad morfológica de las células y el número de células inflamatorias por campo (400x), fueron los parámetros considerados. Además, cada muestra se clasificó como: adecuada, mínimamente adecuada e inadecuada para el diagnóstico. La técnica por cepillo citológico fue la mejor calificada, seguida por el lavado a bajo volumen mientras que las muestras obtenidas por hisopo presentaban células rotas o dispuestas en grupos gruesos, con fondo mucoide grueso que dificultan la identificación celular (Bohn y col., 2014).

2.3.4.FACTORES QUE AFECTAN LA RESPUESTA INFLAMATORIA

2.3.4.1. TIPO DE SEMEN (FRESCO O CONGELADO)

Mediante observaciones clínicas se ha sugerido que una marcada y prolongada endometritis post servicio se desencadena tras la IA con semen congelado (Kotilainen y col., 1993; Troedsson, 2006). Se han mencionado como posibles causas: la elevada concentración espermática utilizada (Kotilainen y col., 1994; Fiala y col., 2007), la ausencia de plasma seminal (Troedsson y col., 1995), la reacción a componentes de los diluyentes para la congelación (Kotilainen y col., 1994; Palm y col., 2008) y mayor proporción de espermatozoides muertos (Katila, 2012).

Kotilainen y col. (1994) con el fin de esclarecer los motivos que llevan al semen congelado a causar una reacción más intensa, comparó los efectos de inseminar con semen fresco y congelado, en altas concentraciones o diluidos. El mayor número de PMNs, a las 6 horas de la inseminación, se obtuvo con semen congelado, pero la respuesta inflamatoria fue igualada al llevar el semen fresco a la misma concentración y mismo número de espermatozoides inseminados (Kotilainen y col., 1994). Frente a éstos resultados los autores sugirieron que, una mayor concentración, lleva a mayor contacto de los espermatozoides con el endometrio, lo

que causa más irritación y una respuesta inflamatoria más marcada (Kotilainen y col., 1994).

Como ha sido expuesto previamente, en el procesamiento del semen, gran parte del plasma seminal debe ser removido para su criopreservación. Existe evidencia contradictoria sobre el rol del plasma seminal en el transporte espermático y en la inflamación uterina de las yeguas (Portus y col., 2005). Mientras que in vitro los estudios muestran una acción moduladora y supresora de la unión de PMNs a los espermatozoides (Troedsson y col., 1995), in vivo ha sido demostrado que el plasma seminal es capaz de inducir por sí mismo, un aumento de PMNs en el lumen uterino (Fiala y col. 2002). Sin embargo, la presencia del plasma seminal acorta la duración de la endometritis inducida por el servicio. Troedsson y col., (2001) recuperaron menor número de PMNs a las 24 horas que a las 6 y a las 12 horas post inseminación cuando se utilizaron espermatozoides en presencia de plasma seminal. Mientras que esta diferencia no fue constatada cuando se reemplazó por diluyente comercial. En el mismo sentido, en un trabajo donde se evaluó la evolución en el tiempo de respuesta inflamatoria del plasma seminal, se determinó un pico en el conteo de PMNs a las 4 horas disminuyendo a las 24, entre tanto, en la leche descremada mostró un aumento significativo a las 24 horas, demostrando por lo tanto, que la reacción causada por el plasma seminal se resuelve más rápido (Fiala y col., 2002). El mecanismo por el cual el plasma acorta la duración de la respuesta inflamatoria, no está claro (Troedsson, 2006), pero se ha observado, que el efecto supresor sobre la quimiotaxis disminuye cuando el plasma seminal es sometido a tratamientos con calor (Dhams y Troedsson, 2002). Alghamdi y col.(2004) aislaron proteínas presentes en el plasma y posteriormente las agregaron a espermatozoides. Aquellos espermatozoides que recibieron dicho tratamiento presentaron una reducción en la adhesión a los PMNs, demostrando que dicho efecto sobre la opsonización y fagocitosis, está asociado a la fracción proteica del plasma seminal. Los mismos investigadores suspendieron espermatozoides en plasma seminal o en diluyente de semen con los que se inseminaron yeguas 12 horas después de haberles inducido una endometritis. La tasa de preñez fue 77% en el grupo inseminado con espermatozoides suspendidos en plasma seminal, en cambio se redujo drásticamente (5%) cuando se usó diluyente, dejando ver su efecto protector (Alghamidi y col., 2004). Portus y col. (2005), por otro lado, hallaron in vivo que la adición de plasma seminal previo a la inseminación, causó un aumento de PMNs obtenidos en lavado a las 6 horas posteriores a la misma. En este estudio, se identificó una disminución en las contracciones uterinas. La diferencia puede deberse a que el lavado se realizó a las 6 horas de la inseminación, próximo al pico inflamatorio observado por Fiala y col. (2002).

Al igual que el plasma seminal y la leche descremada, los diferentes diluyentes también provocan respuesta inflamatoria por sí mismos. Palm y col. (2008), compararon la inflamación causada a las 12 horas tras la infusión de PBS, plasma seminal, diluyente en base a leche descremada y diluyente en base a yema de huevo. La mayor respuesta fue observada cuando se usó plasma seminal y diluyente en base a leche, siendo el diluyente en base a yema de huevo el que causó menor respuesta. La yema de huevo contiene progesterona y fue este diluyente el que presentó mayor cantidad de progesterona entre las sustancias infundidas en dicho estudio. La alta concentración de esta hormona podría ser la responsable de la menor respuesta inflamatoria del endometrio (Palm y col., 2008).

Durante la criopreservación, incluso con el uso de protocolos adecuados, un 40-50% de los espermatozoides no sobreviven (Watson, 2000), se ha responsabilizado al alto porcentaje de espermatozoides alterados o muertos de la mayor reacción inflamatoria ocasionada por el semen congelado (Kotilainen et al. 1994), pero esta teoría fue refutada posteriormente. Para evaluar dicha hipótesis Katila (1997) inseminó yeguas con espermatozoides vivos e inactivados por calor, la reacción inflamatoria a las 5 horas no varió entre los grupos, tampoco fue diferente la eliminación espermatozoides (Katila, 1997). Por otro lado, Clerc (2020) obtuvo menor número de PMNs en el grupo de yeguas inseminadas con espermatozoides muertos cuestionando el efecto de los espermatozoides muertos en la endometritis inducida por el semen congelado (Clerc, 2020).

2.3.4.2. DOSIS Y CONCENTRACIÓN

Como hemos enunciado previamente el número total de espermatozoides y la concentración espermática influyen en la respuesta inflamatoria, a mayor concentración y mayor número espermático más intensa es la respuesta (Kotilainen y col., 1994). En un trabajo realizado por Fiala y col. (2007) comparando concentraciones de 5, 25 y 50 millones de espermatozoides por mililitro y dosis de 100, 500 y 1000 millones respectivamente observaron que la respuesta inflamatoria es dependiente de la concentración, con una mayor respuesta en el grupo más concentrado para mediciones a las 2 y 4 horas, no así para el conteo de PMNs a las 24 horas, donde no hubo diferencias significativas concordando con Güvenc y col. (2005). Probablemente un mayor número o concentración de espermatozoides induce una quimiotaxis más fuerte de PMNs, lo que resulta en una fagocitosis rápida y eficiente, dando como resultado un proceso inflamatorio de corta duración (Fiala y col., 2007). Ésto también lo demostraron Nikolakopoulos y Watson (2000) al detectar que la respuesta inflamatoria tarda más en resolverse en el grupo que utilizó menor concentración y dosis, donde hallaron más PMNs a las 48 horas, que en el de mayor concentración de espermatozoides (aprox 80% vs 37% respectivamente). Los resultados no son distintos cuando se mantiene constante la concentración inseminante pero se varía el número total de espermatozoides, esto fue evidenciado recientemente en un trabajo publicado por Gomes y col. (2019) donde mayor número de PMNs se obtuvieron a las 4 horas tras la inseminación con 800 millones cuando se comparó con una dosis de 40 millones, pero contrario a los citados autores en este trabajo la reacción evaluada a las 24 continuó siendo mayor en el grupo de dosis alta.

2.3.4.3. SITIO DE INSEMINACIÓN

Existe preocupación acerca de la posibilidad de que la inseminación profunda con pipeta guiada transrectalmente cause trauma o irritación de la mucosa uterina, resultando en una mayor respuesta inflamatoria que la técnica convencional. Para esclarecer esta sospecha, Güvenc y colaboradores compararon el número y porcentaje de PMNs 24 horas post IA con semen congelado en cuerno y cuerpo uterino. No se evidenciaron diferencias significativas, concluyendo que no es una técnica traumática ni irritante, por lo que no incrementa el riesgo de endometritis post servicio en yeguas sanas (Güvenc y col., 2005). Así mismo, Cazales y col. (2016) y demostraron mayor reacción inflamatoria a las 12 horas tras la inseminación

convencional en el cuerpo uterino que post inseminación profunda guiada transrectalmente (Cazales y col., 2016).

3. HIPÓTESIS

La técnica (convencional en cuerpo uterino o profunda en punta de cuerno) y la dosis (50×10^6 o 400×10^6 de espermatozoides) de inseminación afectan el transporte espermático y la reacción inflamatoria post-inseminación.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este estudio fue determinar la influencia del sitio (cuerpo o punta de cuerno uterino) y la dosis (50×10^6 o 400×10^6 de espermatozoides) de inseminación sobre el transporte espermático y la respuesta inflamatoria uterina luego de la inseminación artificial (IA) con semen congelado equino.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar el efecto del sitio (cuerpo o punta de cuerno uterino) y la dosis de inseminación (50×10^6 o 400×10^6 de espermatozoides) con semen congelado, sobre el número de espermatozoides recuperados de la tuba uterina ipsilateral al folículo dominante a las 2, 4 y 12 horas post-inseminación.
- 2) Determinar el efecto del sitio y la dosis de inseminación con semen congelado, sobre el número de polimorfonucleares en la luz uterina a las 2, 4 y 12 horas post-inseminación.
- 3) Determinar si el uso de la pipeta guiada hasta la punta del cuerno uterino causa un aumento en el número polimorfonucleares en la luz uterina en comparación con la inseminación en cuerpo del útero.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 PROYECTO

El presente trabajo está comprendido dentro de un proyecto de investigación mayor, el cual forma parte de la Tesis Doctoral del tutor. Para su realización contó con la aprobación de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, (Formulario N° 111130-001637-13).

5.2 DURACIÓN, LUGAR Y ANIMALES

El trabajo experimental se desarrolló durante los meses de octubre a marzo en las temporadas reproductivas 2015-2016, 2016-2017 y 2017-2018 en el Frigorífico de Equinos SAREL SRL, departamento de Canelones, Uruguay.

Se seleccionaron 105 yeguas cíclicas, en estro, destinadas a faena, con condición corporal mínima de 3 (0/5) (Hennecke y col., 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.

Para el congelamiento de semen se utilizó un solo padrillo de raza Pura Sangre de Carrera (PSC), comprobadamente fértil, de 8 años de edad, saludable y con buena condición corporal.

5.3 MANEJO REPRODUCTIVO DE LAS YEGUAS

Las yeguas fueron sometidas a un examen ginecológico mediante palpación y ecografía transrectal (Mattos y col., 1984). Para ser incluidas dentro del estudio debían estar ciclando y en estro; presentar tono uterino grado dos y cérvix relajado; en la imagen ecográfica: ausencia de contenido uterino y cuerpo lúteo funcional, presencia de folículos mayores a 33 mm de diámetro (Fig. 5) y edema uterino grado tres (Fig. 6)

Las yeguas seleccionadas fueron sometidas a un examen citológico del lumen uterino luego de una cuidadosa limpieza del área perineal con agua potable y jabón neutro, finalizando la limpieza con una solución jabonosa líquida con clorhexidina al 2 %. Posteriormente, se enjuagó y se secó con papel absorbente. A continuación, se procedió a la toma de la muestra mediante el uso de cepillos ginecológicos estériles (Cito-Brush®, Juvaquez, España) y un dispositivo para toma de muestras citológicas de Botupharma (Botucatu, São Paulo), evitando la contaminación por el ambiente vestibular, vaginal y cervical (Mattos y col., 1984). Seguidamente, el cepillo fue rodado con suavidad sobre la superficie de un portaobjeto (Fig. 7), se dejó secar al aire y se coloreó con tinción de Panóptico Pappenheim (Diff-Quik®, Baxter Health Care, Miami, FL) para posteriormente ser evaluado microscópicamente en búsqueda de polimorfonucleares (PMNs) (Fig. 8B). Sólo fueron utilizadas yeguas sin presencia de PMNs al examen citológico (Fig. 8A).



Figura 5. Imagen ecográfica de folículo preovulatorio mayor a 33mm de diámetro.



Figura 6. Imagen ecográfica de corte transversal de cuerno uterino con edema 3 (compatible con estro)

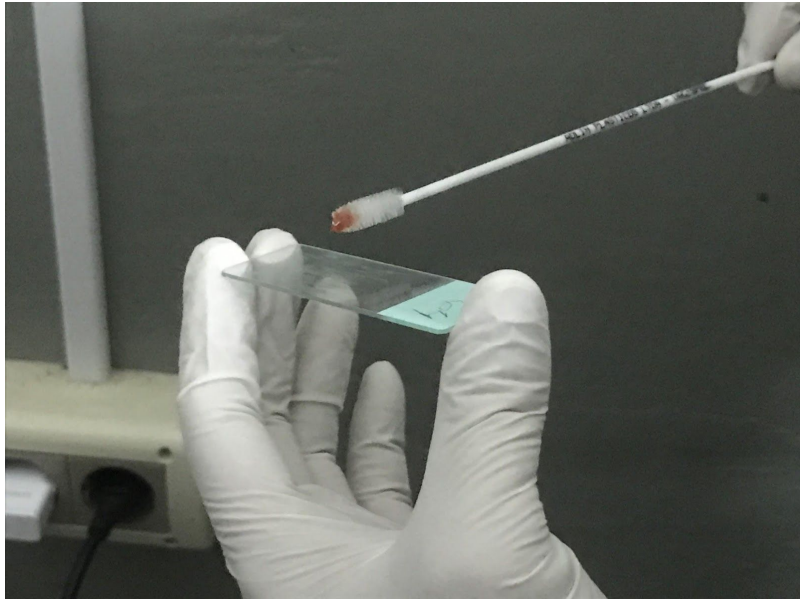


Figura 7. Rodado de cepillo citológico sobre portaobjetos

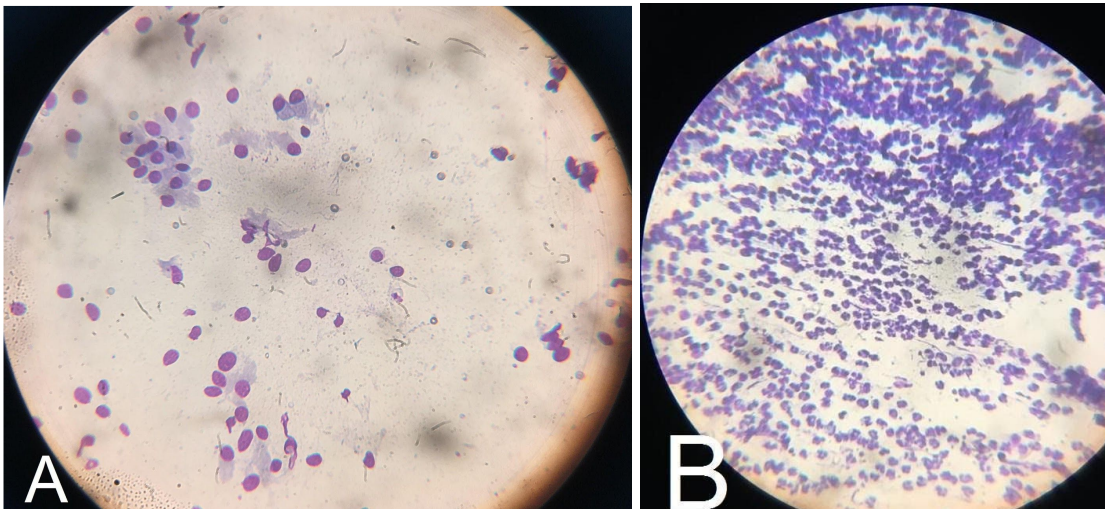


Figura 8. (A) Microscopía óptica (400x) de muestra citológica uterina negativa, conteniendo células endometriales. (B) Microscopía óptica (400x) de muestra citológica uterina positiva, conteniendo polimorfonucleares.

5.4 SEMEN UTILIZADO

Para la IA se utilizó semen congelado con un diluyente comercial (Botucurio®, Botupharma, Brasil) siguiendo las recomendaciones 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). Este padrillo fue clasificado como de buena congelabilidad (motilidad progresiva > 35 % post descongelado) y buenas tasas de preñez por ciclo (> 50%) con semen congelado (Vidament, 2005; Loomis, 2014; Sieme, 2014). El semen estaba acondicionado en pajuelas de 0,5 mL, con 50×10^6 espermatozoides totales por pajuela. El protocolo de descongelamiento fue a 37°C en baño maría durante 30-60 segundos. Solo se emplearon muestras que post descongelamiento tuvieran una motilidad progresiva de los espermatozoides >30%, esta característica fue evaluada subjetivamente tras la observación al microscopio óptico de luz con contraste de fase (Alphaphot2 Nikon) y platina térmica a 37°C cada vez que se iba a inseminar una yegua.

5.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Las yeguas seleccionadas fueron aleatoriamente inseminadas en el cuerpo del útero (Body), o en la punta del cuerno ipsilateral al folículo dominante (Tip) con una pajuela de 0,5 mL – 50×10^6 espermatozoides totales (50) o con ocho pajuelas de 0,5 mL – 400×10^6 espermatozoides totales (400). La inseminación profunda se realizó con una pipeta flexible atraumática de 75 cm de largo (Minitüb, Tiefenbuch, Alemania) guiada transrectalmente hasta la punta del cuerno uterino, mientras que la inseminación convencional 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. Las yeguas control, no fueron inseminadas. Una vez inseminadas las yeguas fueron humanitariamente sacrificadas aleatoriamente a las 2, 4 y 12 horas post-inseminación conformando los siguientes grupos experimentales: **Body 50** – inseminación en el cuerpo del útero con 50×10^6 espermatozoides **2h** (n=6), **4h** (n=6) y **12h** (n=7); **Tip 50** – inseminación en la punta del cuerno ipsilateral al folículo dominante con 50×10^6 espermatozoides **2h** (n=12), **4h** (n=9) y **12h** (n=8); **Body 400** – inseminación en el cuerpo del útero con 400×10^6 espermatozoides **2h** (n=8), **4h** (n=6) y **12h** (n=6) y **Tip 400** - inseminación en la punta del cuerno ipsilateral al folículo dominante con 400×10^6 espermatozoides **2h** (n=7), **4h** (n=7) y **12h** (n=7). Las yeguas del **grupo control** (n=16) no fueron inseminadas.

Tabla 1. Diseño experimental

Lugar de IA	NTE (x10 ⁶)	Volumen (mL)	N° pajuelas	Spzs/pajuela (x10 ⁶)	Yeguas			Total yeguas
					2 h	4 h	12 h	
Tip 50	50	0,5	1	50	12	9	8	29
Tip 400	400	4	8	50	7	7	7	21
Body 50	50	0,5	1	50	6	6	7	19

Body 400	400	4	8	50	8	6	6	20
Control	-	-	-	-	-	-	-	16
								105

Tip = Punta de cuerno ipsilateral al folículo dominante, Body = Cuerpo uterino, NTE=Número total de espermatozoides, Spzs= espermatozoides, IA=Inseminación artificial, h = horas post inseminación

5.6 COLECTA Y EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS:

Los órganos reproductivos completos fueron recuperados y procesados dentro de diez minutos posteriores al sacrificio. Los úteros, se lavaron con 50 mL de solución salina fosfatada tamponada (PBS) 0,1 M pH 7,4, con una sonda Foley (24 FR) introducida por la punta del cuerno derecho, estando bloqueadas las aberturas del cérvix y la punta del cuerno izquierdo por pinzas hemostáticas (Fig. 9). El líquido recuperado (Fig.10), se homogeneizó y se tomó una muestra representativa para el conteo de PMNs en la cámara de Neubauer®. Cada PMN contado representaba 10×10^3 PMNs/mL.



Figura 9. Acondicionamiento para toma de muestras del lavado uterino.



Figura 10. Lavados uterinos recuperados.

Las tubas uterinas ipsilateral al folículo dominante fueron separadas del útero y lavadas con 1 mL de solución de PBS con 0,1% dodecil sulfato sódico a partir del infundíbulo en dirección a la unión útero-tubárica (Rigby y col., 2000), para lo cual se introdujo un catéter corto 18 G en el infundíbulo y para evitar el reflujo se colocó una hemostática con mandíbulas cubiertas con goma (Fig. 11A). El líquido fue escurrido manualmente hasta ser recuperado en microtubos tipo Eppendorf (DELTALAB S.L., Barcelona, España) de 3 mL de capacidad (Fig. 11B), previa homogeneización se tomó una alícuota para el conteo de espermatozoides en la cámara de Neubauer®. Cada espermatozoide contado en la cámara equivalió a 10×10^3 espermatozoides/mL.

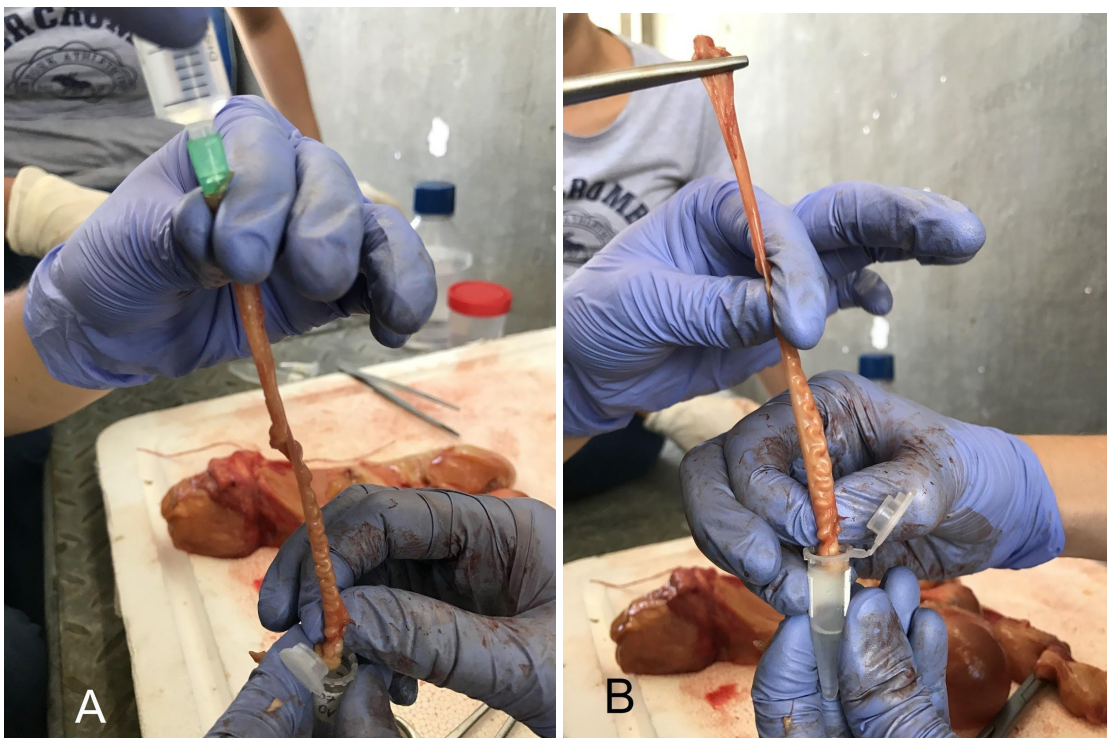


Figura 11. (A) Lavado de tuba uterina ipsilateral al folículo dominante para recuperación de espermatozoides. (B) Recuperación en microtubos Eppendorf.

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa estadístico Graph Pad Prism Versión 8.0.2 (San Diego, CA, USA) para la evaluación de las variables. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza de dos vías (two-way ANOVA). Fueron consideradas como variables independientes la dosis de inseminación (50 o 400 x 10⁶ espermatozoides), el sitio de inseminación (punta del cuerno o cuerpo del útero), el tiempo pos-inseminación (2, 4, 12 h) y sus interacciones; mientras que el número de células espermáticas y PMNs en los lavados fueron consideradas como variables dependientes. Se utilizó el método de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer para las variables paramétricas y las pruebas de Wilcoxon y Kruskal-Wallis para analizar los datos no paramétricos. Diferencias de Probabilidades < 0,05 fueron consideradas significativas. Probabilidades entre 0,05 y 0,09 fueron consideradas tendencia. Los datos fueron presentados como media ± error estándar.

6. RESULTADOS

La motilidad total y progresiva media del semen descongelado evaluado por el sistema de análisis computarizado (CASA) están demostradas en la Tabla 2.

Tabla 2. 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

6.1 TRANSPORTE ESPERMÁTICO

Las yeguas inseminadas tuvieron una media de espermatozoides recuperados de las trompas uterinas ipsilaterales al folículo dominante superior a las yeguas control en todas las horas evaluadas (P < 0,05) (Tabla 3). En las yeguas del grupo Body 50 no se recuperaron espermatozoides, no diferenciándose con las yeguas control (Tabla 3). En las yeguas que se recuperaron espermatozoides la media varió de 0,2 x 10⁴ (0,0005% de la dosis inseminante) para las yeguas del grupo Body 400 a las 2 h a 1,4 x 10⁴ (0,0035% de la dosis inseminante) para las yeguas del grupo Tip 400 a las 4 h (Tabla 3).

Tabla 3. Media (± EE) de espermatozoides (x10⁴) recuperados en los lavados de las trompas uterinas ipsilateral al folículo dominante de las yeguas del grupo control y de las yeguas inseminadas en el cuerpo del útero (Body) y en la punta del cuerno (Tip) con 50x10⁶ (50) y 400x10⁶ (400) de espermatozoides a las 2, 4 y 12 h post-inseminación.

			Tiempo en horas		
			2	4	12
Tratamiento	Control	0 ± 0*			
	Body 50		0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Tip 50		0,3 ± 0,1*	1,2 ± 0,1*	0,4 ± 0,2*
	Body 400		0,2 ± 0,2*	0,8 ± 0,3*	1,0 ± 0,4*
	Tip 400		0,9 ± 0,3*	1,4 ± 0,3*	1,1 ± 0,5*

Presencia de asterisco (*) representa valores que se diferencian estadísticamente ($P < 0,05$) del grupo control. Body 50 = IA en el cuerpo del útero con 50×10^6 de espermatozoides; Tip 50 = IA en la punta del cuerno con 50×10^6 de espermatozoides; Body 400 = IA en el cuerpo del útero con 400×10^6 de espermatozoides; Tip 400 = IA en la punta del cuerno con 400×10^6 de espermatozoides.

El Sitio de inseminación influyó el transporte espermático ($P = 0,025$) pero este no fue afectado por el Tiempo ($P = 0,230$) (Fig. 12 A). No se observó interacción Tiempo por Sitio ($P = 0,852$). Se observó una tendencia ($P = 0,070$) a mayor transporte espermático a las 2 h en las yeguas inseminadas en la punta del cuerno en relación a las yeguas inseminadas en el cuerpo del útero (Fig. 12 A).

La Dosis de inseminación modificó el transporte espermático ($P < 0,001$) el cual no se vio afectado por el Tiempo ($P = 0,175$) (Fig. 12 B). No se observó interacción Tiempo por Dosis ($P = 0,233$) (Fig. 12 B). Se observó mayor transporte espermático a las 4 ($P = 0,007$) y 12 ($P = 0,012$) horas post-inseminación en las yeguas inseminadas con 400×10^6 en relación a las yeguas inseminadas con 50×10^6 de espermatozoides (Fig. 12 B).

Tanto la Dosis ($P < 0,001$) como el Sitio ($P = 0,006$) de inseminación influenciaron el transporte espermático, no habiendo interacción Dosis por Sitio ($P = 0,749$) (Fig. 12 C). Se observó mayor transporte espermático ($P < 0,003$) en las yeguas inseminadas con 400×10^6 en relación a las yeguas inseminadas con 50×10^6 de espermatozoides independientemente del sitio de inseminación (Fig. 12 C). Las yeguas del grupo Tip 50 tuvieron mayor transporte espermático ($P = 0,022$) que las yeguas del grupo Body 50 (Fig. 12 C). No se apreciaron diferencias en el transporte espermático entre yeguas inseminadas con 400×10^6 en la punta del cuerno y en el cuerpo del útero ($P > 0,09$).

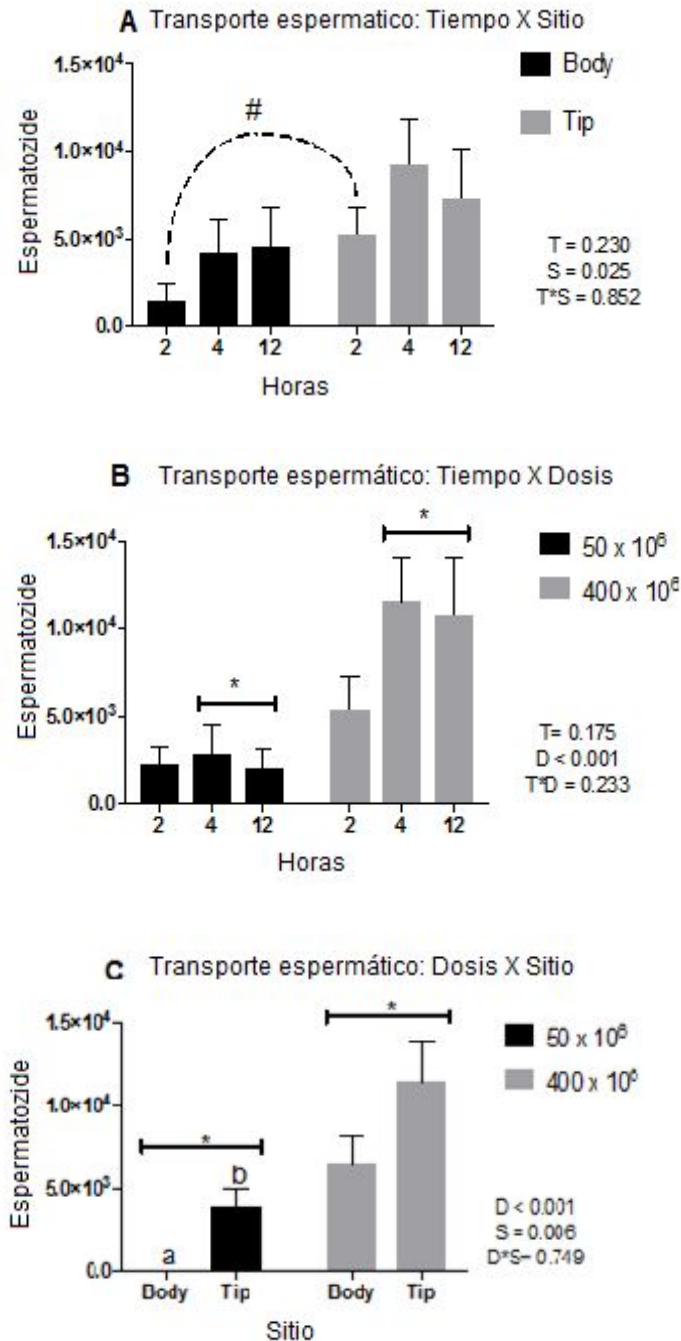


Figura 12. Media de espermatozoides (\pm EE) recuperados de las trompas uterinas ipsilateral al folículo dominante en relación al (A) Tiempo y Sitio de inseminación; (B) Tiempo y Dosis de inseminación (C) Dosis y Sitio de inseminación. Asterisco (*) Representa diferencias ($P < 0,05$) entre grupos; (a,b) y (x,y) representan diferencias ($P < 0,05$) dentro de los grupos; Numeral (#) representa una tendencia estadística entre grupos ($p = 0,070$). Body = IA en el cuerpo del útero; Tip = IA en la punta del cuerno; T = tiempo; S = sitio; D = dosis

El porcentaje de yeguas con presencia de espermatozoides en la trompa uterina ipsilateral al folículo dominante a las 2 h post-inseminación no varió entre las yeguas del grupo Tip 50, Body 400 y Tip 400 ($P = 0,161$) (Fig. 13). Se observó una tendencia ($P = 0,069$) a un mayor porcentaje de yeguas con presencia de espermatozoides en la trompa uterina en las yeguas del grupo Tip 400 comparado con las yeguas del grupo Body 50 a las 2 h pos-inseminación (Fig. 13).

A las 4 h post-inseminación, se observó un mayor porcentaje ($P = 0,016$) de yeguas con presencia de espermatozoides en las trompas uterinas en las yeguas del grupo Body 400 y Tip 400 en relación a las yeguas del grupo Body 50 (Fig. 13). No se observaron diferencias ($P > 0,09$) entre las yeguas del grupo Tip 50, Body 400 y Tip 400 (Fig. 13).

A las 12 h pos-inseminación hubo diferencia ($P = 0,05$) en el porcentaje de yeguas con presencia de espermatozoides en la trompa uterina a favor de las yeguas del grupo Body 400 en comparación a las yeguas del grupo Body 50 (Fig. 13). Se observó una tendencia ($P = 0,069$) a mayor presencia de espermatozoides en las trompas uterinas en las yeguas del grupo Tip 400 en relación a las del grupo Body 50 (Fig. 13). No habiendo diferencias ($P > 0,09$) entre el resto de los grupos evaluados a las 12 h pos-inseminación (Fig. 13).

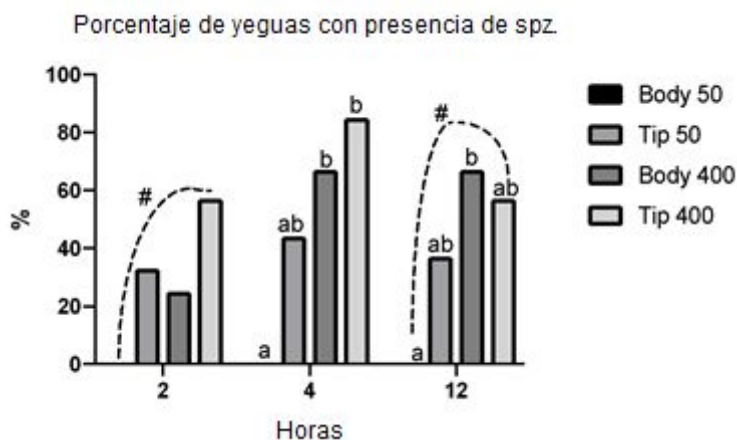


Figura 13. Porcentaje de yeguas con presencia de espermatozoides en los lavados de las trompas uterinas ipsilateral al folículo dominante luego de ser inseminadas en la punta del cuerno (Tip) y en el cuerpo del útero (Body) con 50×10^6 (50) y 400×10^6 (400) de espermatozoides a las 2, 4 y 12 horas post-inseminación. (a,b) representan diferencia estadística ($P < 0,05$) dentro de los grupos; Numeral (#) representa tendencia estadística dentro de los grupos ($p = 0,069$); % = porcentaje de yeguas.

6.2 RESPUESTA INFLAMATORIA

La media de PMNs encontrados en los lavados uterinos de las 16 yeguas del grupo control fue de $0,34 \times 10^6 \pm 0,13 \times 10^6$ PMNs (Tabla 4). Las yeguas inseminadas tuvieron mayor número de PMNs ($P < 0,05$) que las yeguas del grupo control con excepción de las yeguas del grupo B50 a las 2 h, T50 a las 4 h y T400 a las 12 h ($P > 0,05$) (Tabla 4).

Tabla 4. Media (\pm EE) de PMNs ($\times 10^6$) en los lavados uterinos de las yeguas control y de las yeguas inseminadas en la punta del cuerno (Tip) y en el cuerpo del útero (Body) con 50×10^6 y 400×10^6 de espermatozoides a las 2, 4 y 12 horas post-inseminación

		Tiempo en horas			
		2h	4h	12h	
	Control	$0,3 \pm 0,1^*$			
	Body 50	$6,0 \pm 0,48$	$141,8 \pm 21,8^*$	$94,4 \pm 13,2^*$	
Tratamiento	Tip 50	$12,0 \pm 3,0^*$	$28,6 \pm 5,1$	$77,8 \pm 15,3^*$	
	Body 400	$154,6 \pm 51,1^*$	$183,2 \pm 43,5^*$	$67,3 \pm 9,2^*$	
	Tip 400	$90,4 \pm 19,6^*$	$376,8 \pm 98,6^*$	$39,2 \pm 5,6$	

Presencia de asterisco (*) representa valores que se diferencian estadísticamente ($P < 0,05$) del grupo control. Body 50 = IA en el cuerpo del útero con 50×10^6 de espermatozoides; Tip 50 = IA en la punta del cuerno con 50×10^6 de espermatozoides; Body 400 = IA en el cuerpo del útero con 400×10^6 de espermatozoides; Tip 400 = IA en la punta del cuerno con 400×10^6 de espermatozoides.

El Tiempo ($P = 0,024$) y el Sitio ($P = 0,001$) de inseminación alteraron el número de PMNs presentes en el lavado uterino, no observándose interacción Tiempo por Sitio ($P = 0,270$) (Fig. 14 A). Se observó una mayor ($P = 0,009$) reacción inflamatoria a las 4 h pos-inseminación en las yeguas inseminadas en el cuerpo del útero en relación a las inseminadas en la punta del cuerno (Fig. 14 A). Las yeguas inseminadas en el cuerpo del útero tuvieron menor ($P < 0,05$) número de PMNs a las 2 h que a las 4 h post-inseminación (Fig. 14 A). A las 12 h post-inseminación en el cuerpo del útero el número de PMNs recuperados de los lavados uterinos no se diferenció de las 2 y 4 horas post-inseminación ($P > 0,09$) (Fig. 14 A). En el grupo de yeguas inseminadas en la punta del cuerno no hubo diferencias en el número de PMNs recuperados de los lavados uterinos entre ninguna de las horas evaluadas ($P > 0,05$) (Fig. 14 A).

El tiempo post-inseminación ($P = 0,001$) y la Dosis de inseminación ($P < 0,001$) influenciaron la reacción inflamatoria (Fig. 14 B), observándose una interacción Tiempo por Dosis ($P < 0,001$). Se apreció una mayor reacción

inflamatoria ($P < 0,003$) en las yeguas inseminadas con 400×10^6 en relación a las yeguas inseminadas con 50×10^6 de espermatozoides a las 2 y 4 h post-inseminación (Fig. 14 B). Mientras que un menor número de PMNs ($P = 0,012$) fueron recuperados de los lavados uterinos de las yeguas inseminadas con 400×10^6 en relación con las inseminadas con 50×10^6 de espermatozoides a las 12 h post-inseminación (Fig. 14 B). Las yeguas inseminadas con 50×10^6 tuvieron mayor ($P < 0,001$) número de PMNs en la luz uterina a las 4 y 12 horas comparado con las 2 h post-inseminación (Fig. 14 B). No hubo diferencias ($P > 0,09$) en la reacción inflamatoria entre las 4 y 12 horas post-inseminación entre las yeguas inseminadas con 50×10^6 de espermatozoides (Fig. 14 B). En las yeguas inseminadas con 400×10^6 la reacción inflamatoria fue mayor a las 2 y 4 h que a las 12 h post-inseminación ($P < 0,05$). No habiendo diferencias ($P > 0,05$) en el número de PMNs entre yeguas a las 2 y 4 horas post-inseminación con 400×10^6 de espermatozoides (Fig. 14 B).

Tanto la Dosis ($P = 0,001$) como el Sitio ($P = 0,003$) de inseminación afectaron la respuesta inflamatoria, no habiendo interacción Dosis por Sitio ($P = 0,935$) (Fig. 14 C). Se observó una mayor ($P < 0,001$) reacción inflamatoria en las yeguas inseminadas con 400×10^6 en relación a las inseminadas con 50×10^6 cuando estas fueron inseminadas en la punta del cuerno (Fig. 14 C). Hubo una tendencia ($P = 0,086$) a una mayor reacción inflamatoria en las yeguas inseminadas con 400×10^6 en relación a las inseminadas con 50×10^6 cuando estas fueron inseminadas en el cuerpo del útero (Fig. 14 C). No se observó diferencias en el número de PMNs recuperados en los lavados uterinos entre las yeguas inseminadas con 400×10^6 en la punta del cuerno o en el cuerpo del útero ($P > 0,09$) (Fig. 14 C). Por otro lado, si se vio una mayor reacción inflamatoria en las yeguas inseminadas con 50×10^6 en el cuerpo del útero en relación a las yeguas inseminadas con 50×10^6 de espermatozoides en la punta del cuerno ipsilateral al folículo dominante ($P = 0,039$) (Fig. 14 C).

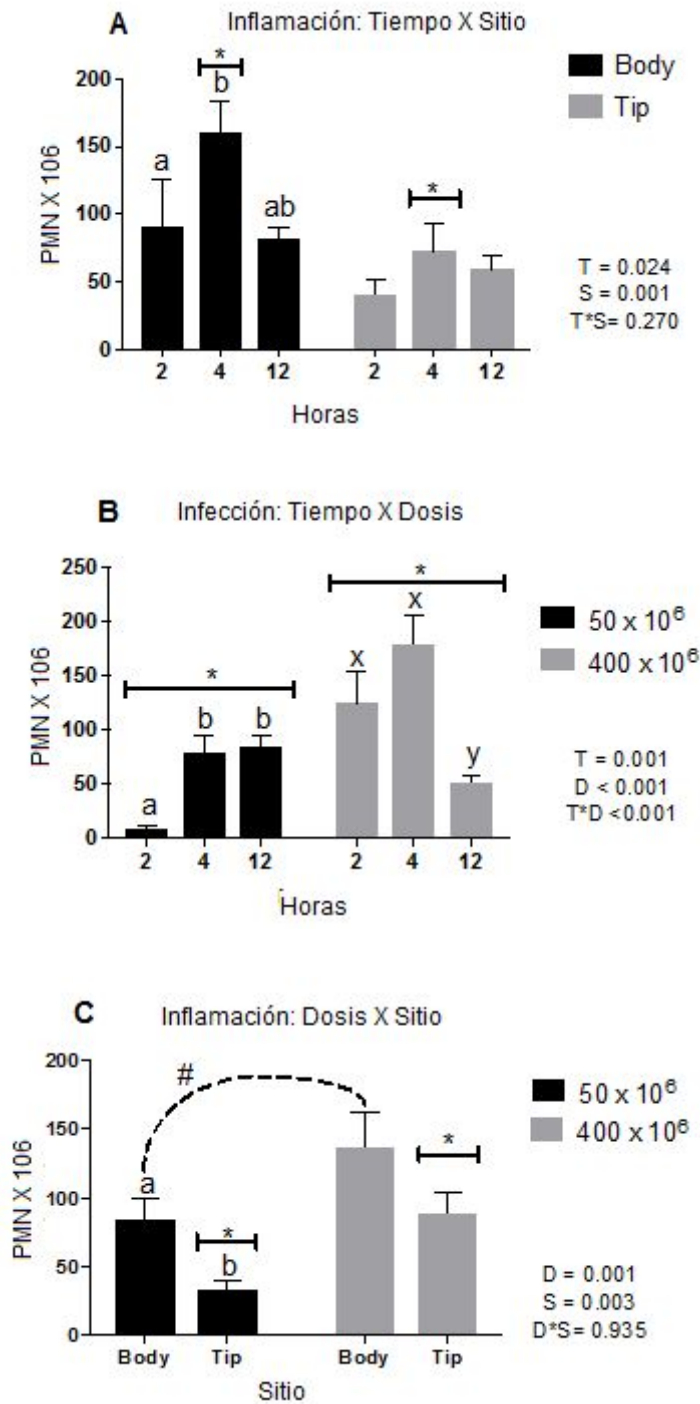


Figura 14. Media de PMNs (\pm EE) recuperados en los lavados uterinos en relación al (A) Tiempo y Sitio de inseminación; (B) Tiempo y Dosis de inseminación y (C) Dosis y Sitio de inseminación. Asterisco (*) Representa diferencias ($P < 0,05$) entre grupos; (a,b) y (x,y) representan diferencias ($P < 0,05$) dentro de los grupos; Numeral (#) representa una tendencia estadística entre grupos ($p = 0,086$). Body = IA en el cuerpo del útero; Tip = IA en la punta del cuerno; T = tiempo; S = sitio; D = dosis.

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demostró que el sitio de inseminación influyó en el transporte espermático, viéndose favorecido con la inseminación profunda. Un mayor número de espermatozoides se recuperaron en la tuba uterina ipsilateral al folículo dominante en los grupos inseminados con dicha técnica. Las ventajas de reducir la distancia que los espermatozoides deben recorrer para alcanzar el sitio de fertilización fueron demostradas previamente en ovinos y humanos (reseñado por Brinsko, 2006). Esto fue observado también en equinos por Rigby y col. (2000) quienes inseminando con semen fresco con la técnica de inseminación profunda recuperaron el doble de espermatozoides de la tuba ipsilateral que cuando inseminaron en el cuerpo del útero. Similares resultados fueron obtenidos por Leão (2006) quien utilizó semen congelado. Usando inseminación convencional en el cuerpo del útero, lavados uterinos realizados 0,5 y 2 horas luego de la misma, disminuyeron las tasas de preñez (Brinsko y col. 1989). En cambio, cuando se utiliza inseminación profunda, es posible realizar lavados uterinos post inseminación tan pronto como una hora luego de la misma sin afectar las tasas de preñez (Samper y col., 2016). En el mismo sentido, en nuestro trabajo pudimos evidenciar una tendencia a un mayor transporte espermático inseminando en punta de cuerno a las 2 horas post inseminación, demostrando que la IA profunda aceleraría el transporte espermático.

Independientemente del lugar de inseminación, con la dosis de 400×10^6 un mayor número de espermatozoides alcanzaron las tubas uterinas a las 4 y 12 horas post inseminación. En cambio, a las 2 horas post-inseminación, no hubo diferencias significativas en el transporte espermático entre las dosis. Esto coincide con los resultados obtenidos por Fiala y col. (2007) quienes a diferentes dosis y concentración espermática no observaron diferencias significativas en el número de espermatozoides recuperados de las tubas uterinas a las 2 horas post-inseminación, concluyendo que, el comienzo del transporte espermático no depende de la dosis ni la concentración utilizada (Fiala y col., 2007). Esto confirma lo dicho Troedsson y col. (1998) quienes afirman que si bien la motilidad de los espermatozoides contribuye al transporte a través del tracto reproductivo femenino, las contracciones del miometrio serían las responsables de llevar los espermatozoides hacia la punta de los cuernos, en los primeros 30 minutos posteriores a la IA (Katila y col., 2000), demostrando que las mismas tienen un rol importante al inicio, impulsando la llegada de los espermatozoides a la unión útero tubárica.

En el grupo Body 50 no se recuperaron espermatozoides de las tubas uterinas, siendo el único grupo que no se diferenció del control. Mientras que a igual dosis las yeguas inseminadas en punta de cuerno tuvieron mayor número de espermatozoides. Sugiriendo que, para conseguir un transporte espermático a dosis bajas, es necesario el uso de técnicas que aproximen los espermatozoides al sitio de fertilización. Esto se alinea con los resultados obtenidos por Leão (2006) y Govaere y col. (2014). Leão comparó, al igual que nosotros, la recuperación espermática mediante lavados de oviductos, utilizando semen congelado a una dosis de 20×10^6 en cuerpo y punta de cuerno, no obteniendo recuperación espermática para la inseminación en el cuerpo del útero. Por el contrario Woods y col., (2000) usando semen fresco y Morris y col., (2003) con semen congelado y dosis inseminantes más bajas que en nuestro trabajo, no obtuvieron diferencias en tasas de preñez entre la inseminación profunda y la inseminación en cuerpo uterino. Esto puede deberse a la

fertilidad intrínseca de los padrillos y a las diferencias en el semen utilizado. En general, los resultados obtenidos con el uso de semen fresco son superiores a los obtenidos con semen congelado (Brinsko, 2006). Para el caso de semen congelado, es sabido que existe gran variabilidad en la calidad del semen congelado entre padrillos e incluso entre eyaculados del mismo animal (Vidament, 1997; Loomis y Graham, 2008). También, se debe considerar que durante el proceso de congelación además de reducir el número de espermatozoides viables, ocurren daños a la subpoblación sobreviviente (Watson, 2000). Algunas de estas alteraciones no son evidentes mediante la evaluación de los parámetros convencionales del semen luego de descongelado (Dobrinsky y col., 1995). De esta manera se podría explicar, en parte, los resultados obtenidos por Morris y col., (2003) donde inseminando en el cuerpo uterino, aun utilizando una dosis de espermatozoides motiles 20% menor a la nuestra, obtuvieron una buena tasa de preñez. También, es importante tener presente que estos trabajos evaluaban tasa de preñez, no espermatozoides recuperados. Donde la sensibilidad de la técnica utilizada para la recuperación posiblemente no refleje en su totalidad la población de espermatozoides presentes en la tuba uterina, por lo que la comparación debe hacerse con cautela.

Con el uso de dosis alta no evidenciamos diferencias en el transporte espermático cuando variamos el lugar de inseminación, esto concuerda con los resultados obtenidos por Clement y col., (2005) y Sieme y col. (2004) quienes utilizando dosis mayores a 100×10^6 en la punta del cuerno y en el cuerpo del útero no obtuvieron diferencias en las tasas de preñez. Sugiriendo que el lugar de inseminación no sería un factor crítico cuando se insemina con dosis mayores a 100×10^6 de espermatozoides.

Solo yeguas con citología uterina negativa se incluyeron en el estudio, sin embargo, se obtuvieron PMNs de los lavados del grupo control. Estos hallazgos coinciden con los obtenidos por Fiala y col., (2007) en los que se observó luego de la muestra citológica, un aumento en los PMNs en el grupo control. Reafirmando los resultados obtenidos por Williamson y col., (1987) donde la manipulación cervical y uterina resultó en una respuesta inflamatoria. La presencia de PMNs en el lavado uterino de las yeguas control, también puede relacionarse con el cambio en la técnica diagnóstica (cepillo ginecológico vs lavado con bajo volumen), aunque algunos autores no demostraron diferencias en la sensibilidad entre las técnicas (Jorge y col., 2017). Las yeguas inseminadas presentaron un aumento en el número de PMNs recuperados comparado con las yeguas del grupo control, esto coincide con lo descrito por varios autores (Kotilainen y col., 1994; Katila, 1995; Troedsson y col., 1995; Güvenc y col., 2005; Fiala y col., 2007; Gomes y col., 2018).

Las yeguas inseminadas en el cuerpo uterino presentaron una mayor reacción inflamatoria que aquellas inseminadas en punta de cuerno utilizando la dosis baja. Mientras que no se observaron diferencias significativas en la reacción uterina de las yeguas inseminadas con 400×10^6 entre los sitios de inseminación. Squires y col., (2002), atribuyen el detrimento en la fertilidad con IA profunda en su estudio, a una supuesta mayor reacción inflamatoria ocasionada por la técnica. En cambio, los resultados obtenidos en nuestra investigación, permiten afirmar que la introducción de la pipeta guiada transrectalmente hasta la punta del cuerno, no causó mayor reacción inflamatoria que la inseminación en el cuerpo del útero. Otro estudio que evaluó la reacción inflamatoria a las 24 h post inseminación con semen

congelado, usando 27×10^6 de espermatozoides con motilidad progresiva, no observó diferencias entre inseminar en la punta del cuerno o en el cuerpo del útero (Güvenc y col., 2005). Esto podría explicarse porque a las 24 horas, ha comenzado la resolución fisiológica de la reacción inflamatoria y el número de PMNs es menor que los observados a las 4 horas post-inseminación (Katila, 1995).

Al evaluar el efecto de las dosis sobre la reacción uterina en el tiempo, se determinó una interacción tiempo por dosis. Mientras que en las yeguas inseminadas con la dosis alta el mayor recuento de PMNs se observó a las 2 y 4 horas, en las yeguas inseminadas con la dosis baja, la reacción inflamatoria más intensa se presentó a las 4 y 12 horas post inseminación. Resultados similares fueron observados por Kotilainen y col., (1994) y Fiala y col., (2007), probablemente las dosis altas producen un mayor estímulo quimiotáctico, que atrae un mayor número de PMNs a las 2 y 4 horas post inseminación resolviendo el cuadro inflamatorio de forma más rápida. Mientras que las dosis bajas producen un estímulo débil que perdura en el tiempo. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Fiala y col., (2007) para semen refrigerado donde el alto número y/o concentración de espermatozoides causó una reacción inflamatoria mayor, que tal vez sea más eficaz y rápida en la eliminación de esperma y productos residuales, resultando en un proceso más corto. Güvenc y col., (2005), Fiala y col., (2007) y Gomes y col., (2019) evidenciaron una notoria disminución de la respuesta inflamatoria a las 24 horas post inseminación, independientemente de la dosis utilizada. En el presente estudio en las yeguas inseminadas con 50×10^6 de espermatozoides, el proceso inflamatorio fue más leve pero persistente en el tiempo, esta dosis causó un bajo estímulo quimiotáctico, similar a lo observado por Nikolakopoulos y Watson, (2000) quienes, evaluando 48 horas después, concluyeron también que cuanto más leve era el insulto, mayor era el grado de inflamación residual.

Frente a los resultados expuestos previamente, cabe destacar que fueron recabados a partir de yeguas clínica y reproductivamente sanas, sin historia reproductiva previa. El semen utilizado fue de un único padrillo, cuya fertilidad fue previamente comprobada. Las inseminaciones fueron realizadas previo a la ovulación. Por este motivo, se debe ser cauto a la hora de extrapolar los resultados al ejercicio práctico, así como a animales subfértiles o a yeguas susceptibles a endometritis persistente post-servicio.

Los datos obtenidos en el presente trabajo confirman la hipótesis planteada, tanto el sitio como la dosis de inseminación modifican el transporte espermático y la reacción inflamatoria endometrial post-inseminación. Los resultados de esta investigación demuestran que la inseminación con semen congelado mediante técnica convencional a dosis alta, garantiza el transporte espermático eficaz y una resolución de la respuesta inflamatoria más rápida que con la dosis baja. Constituyendo así una técnica sencilla que permite extender el uso de semen congelado. Por otro lado, es deseable reducir el número de espermatozoides utilizados con el objetivo de optimizar la técnica y mejorar los resultados económicos. En nuestro estudio, demostramos que es posible disminuir la dosis sin comprometer la llegada de espermatozoides ni ocasionar mayor inflamación, a través de la inseminación profunda.

8. CONCLUSIONES

Con la dosis alta (400×10^6 de espermatozoides), el transporte espermático fue mayor y también fue mayor la respuesta inflamatoria pero con una rápida resolución de la misma. El lugar de inseminación (cuerpo o punta de cuernos) no es un factor trascendental cuando se usa esta dosis.

La IA profunda con una dosis baja (50×10^6 de espermatozoides) aumentó el transporte espermático y disminuyó la reacción inflamatoria. Esta técnica viabiliza la utilización de un número bajo de espermatozoides, no recomendándose la IA con dosis bajas en el cuerpo del útero.

La pipeta guiada transrectalmente hasta la punta del cuerno, no causó mayor reacción inflamatoria que la inseminación en el cuerpo del útero.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. Alghamdi, A., Troedsson, M. H. T., Laschkewitsch, T., & Xue, J. L. (2001). Uterine secretion from mares with post-breeding endometritis alters sperm motion characteristics in vitro. *Theriogenology*, 55(4), 1019-1028.
3. Alvarenga, M. A., Papa, F. O., & Neto, C. R. (2016). Advances in stallion semen cryopreservation. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 32(3), 521-530.
4. Bader, H. (1982). An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 32, 59-64.
5. Ball, B. A. (2011). Sperm-Oviduct Interactions En: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., & Varner, D. D. *Equine Reproduction*, 2a ed. St. Louis, Ed Blackwell. pp 1155-1161
6. Barbacini (2011) Breeding with Frozen Semen. En: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., & Varner, D. D. *Equine Reproduction*, 2a ed. St. Louis, Ed Blackwell. pp 2987-2993
7. Barbacini, S., Marchi, V., & Zavaglia, G. (1999). Equine frozen semen: results obtained in Italy during the 1994–1997 period. *Equine Veterinary Education*, 11(2), 109-112.
8. Barker, C. A. V., & Gandier, J. C. C. (1957). Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science*, 21(2), 47.
9. Bohn, A. A., Ferris, R. A., & McCue, P. M. (2014). Comparison of equine endometrial cytology samples collected with uterine swab, uterine brush, and low-volume lavage from healthy mares. *Veterinary clinical pathology*, 43(4), 594-600.
10. Brinsko, S. P. (2006). Insemination doses: how low can we go?. *Theriogenology*, 66(3), 543-550.
11. Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., & Love, C. C. (2010). *Manual of Equine Reproduction-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
12. Brinsko, S. P., Varner, D. D., & Blanchard, T. L. (1991). The effect of uterine lavage performed four hours post insemination on pregnancy rate in mares. *Theriogenology*, 35(6), 1111-1119.
13. Buchanan, B. R., Seidel Jr, G. E., McCue, P. M., Schenk, J. L., Herickhoff, L. A., & Squires, E. L. (2000). Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. *Theriogenology*, 53(6), 1333-1344.

14. Burkhardt, J. (1949). Supervivencia de esperma en el tracto genital de la yegua. *The Journal of Agricultural Science*, 39 (2), 201-203
15. Campbell, M. L. H., & England, G. C. W. (2004). Effect of teasing, mechanical stimulator and the intrauterine infusion of saline on uterine contractions in mares. *Veterinary Record*, 155(4), 103–110.
16. Card, C. (2005). Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. *Theriogenology*, 64(3), 580-588.
17. 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.
18. 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.
19. Clement, F., Duchamp, G., Larry, J. L., & Vidament, M. (2005). Effects of frequency of insemination, number of spermatozoa and insemination site on fertility of equine frozen semen. *Anim Reprod Sci*, 89, 208-211.
20. Clerc, M (2020) Reacción inflamatoria uterina luego de la inseminación artificial con espermatozoides vivos y muertos en yeguas. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República.
21. Dahms, B. J., & Troedsson, M. H. T. (2002). The effect of seminal plasma components on opsonisation and PMN-phagocytosis of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 58(2-4), 457-460.
22. Day, F. T. (1942). Survival of spermatozoa in the genital tract of the mare. *The Journal of Agricultural Science*, 32(1), 108-111.
23. Dobrinski, I., Suarez, S. S., & Ball, B. A. (1996). Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells in vitro. *Biology of reproduction*, 54(4), 783-788.
24. DOBRINSKI, I., THOMAS, P. G., & BALL, B. A. (1995). Cryopreservation reduces the ability of equine spermatozoa to attach to oviductal epithelial cells and zonae pellucidae in vitro. *Journal of andrology*, 16(6), 536-542
25. Ferrari A, Mayid S, Perez F, Lopez D, Recuero M (2012). Caracterización y potencialidades del sector ecuestre en Uruguay. *Uruguay XXI*. pp150. Disponible en:<http://www.uruguayxxi.gub.uy/wpcontent/uploads2012/04/Sector%20Ecuestre.pdf>. Fecha de consulta: 18/10/2013
26. Fiala, S. M., 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.

27. Fiala, S., Cruz, L. A., Rodrigues, R., Jobim, M. I., Gregory, R. M., & Mattos, R. C. (2010). Sperm cells in the reproductive tract of the mare: Where can we find them. *Pferdeheilkunde*, 26(1), 19-21.
28. Foote, R. H. (2010). The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J. Anim. Sci*, 80, 1-10.
29. Gastal (2011) Ovulation: Part 2. Ultrasonographic Morphology of the Preovulatory Follicle. En: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. (2011) *Equine Reproduction*, 2a ed. St. Louis, Ed Blackwell. pp 2032-2054.
30. Gomes, G. M., Crespilho, A. M., Leão, K. M., Jacob, J. C., Gomes, L. P., Segabinazzi, L. G., ... & Alvarenga, M. A. (2019). Can Sperm Selection, Inseminating Dose, and Artificial Insemination Technique Influence Endometrial Inflammatory Response in Mares?. *Journal of Equine Veterinary Science*, 73, 43-47.
31. Govaere, J. L. J., Hoogewijs, M. K., De Schauwer, C., De Vliegher, S., Van Soom, A., Duchateau, L., & de Kruif, A. (2014). Effect of artificial insemination protocol and dose of frozen/thawed stallion semen on pregnancy results in mares. *Reproduction in domestic animals*, 49(3), 487-491
32. Graham (2011) Principles of Cryopreservation. En: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., & Varner, D. D. *Equine Reproduction*, 2a ed. St. Louis, Ed Blackwell. pp 2959-2963
33. Güvenc, K., Reilas, T., & Katila, T. (2005). Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares. *Theriogenology*, 63(9), 2504-2512.
34. Rules for use of insemination within the auspices of the WBFSH <http://www.wbfs.org/files/Semen%20standards.pdf>
35. Jasko, D. J., Moran, D. M., Farlin, M. E., Squires, E. L., Amann, R. P., & Pickett, B. W. (1993). Pregnancy rates utilizing fresh, cooled, and frozen-thawed stallion semen. In *Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners (USA)*.
36. Jorge, M. L. N., Orlandi, C. M. B., & Santana, A. E. (2017). Citocentrifugação e métodos convencionais na citologia uterina de éguas em estro e diestro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 802-806
37. Katila, T. (1995). Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biology of Reproduction*, 52(monograph_series1), 515-517.
38. Katila, T., Sankari, S., & Mäkelä, O. (2000). Transport of spermatozoa in the reproductive tracts of mares. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, (56), 571-578.
39. Kotilainen, T., Huhtinen, M., & Katila, T. (1994). Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*, 41(3), 629-636.

40. Leão, K. M. (2006). Avaliação de diferentes técnicas de inseminação artificial em éguas utilizando um baixo número de espermatozoides. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia da Universidade Estadual Paulista. UNESP.
41. LeBlanc, M. M. (2011) Uterine Cytology . En McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. (2011) Equine Reproduction, 2a ed. St. Louis, Ed Blackwell. pp 1922-1927.
42. LeBlanc, M. M., & Causey, R. C. (2009). Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(s3), 10-22
43. Lewis, N., Morganti, M., Collingwood, F., Grove-White, D. H., & Argo, C. M. (2015). Utilization of One-Dose Postovulation Breeding With Frozen-Thawed Semen at a Commercial Artificial Insemination Center: Pregnancy Rates and Postbreeding Uterine Fluid Accumulation in Comparison to Insemination With Chilled or Fresh Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(11-12), 882-887.
44. Loomis, P. R. (2001). The equine frozen semen industry. *Animal reproduction science*, 68(3-4), 191-200
45. Loomis, P. R., & Graham, J. K. (2008). Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal reproduction science*, 105(1-2), 119-128.
46. Loomis, P. R., & Squires, E. L. (2005). Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology*, 64(3), 480-491.
47. Lyle SK, Immunological Considerations en: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., & Varner, D. D. (Eds.). (2011). *Equine reproduction*, 2a ed. St. Louis, Ed Blackwell. pp 2588-2596
48. Malschitzky, E., Jobim, M. I. M., Gregory, R. M., & Mattos, R. C. (2007). Endometrite na égua, novos conceitos. *Revista brasileira de reprodução animal*, 31(1), 17-26.
49. Mihm, M., & Evans, A. C. O. (2008). Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 48-56.
50. Miller, C. D. (2008). Optimizing the use of frozen–thawed equine semen. *Theriogenology*, 70(3), 463-468.
51. Moreira 2010 usando 200 millones totales de semen congelado en cuerpo o punta de cuerno obtuvo para ambos grupos un 75% de preñez, no habiendo diferencias al usar esa dosis
52. Moreira, J. C. D. G. D. (2010). Inseminação artificial em éguas: estudo da utilização de uma dose reduzida de sêmen congelado em diferentes locais de

deposição (Bachelor's thesis, Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária).

53. Morris and Lyle (2011) Low Dose Insemination. En: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., & Varner, D. D. *Equine Reproduction*, 2a ed. St. Louis, Ed Blackwell. pp 3037-3041
54. Morris, L. H. A., Tiplady, C., & Allen, W. R. (2003). Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa onto the uterotubal junction. *Equine veterinary journal*, 35(2), 197-201.
55. Nath Laura C, Reproductive Efficiency en: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., & Varner, D. D. (Eds.). (2011). *Equine reproduction*, 2a ed. St. Louis, Ed Blackwell. pp 2779-2789
56. Nikolakopoulos, E., & Watson, E. D. (2000). Effect of infusion volume and sperm numbers on persistence of uterine inflammation in mares. *Equine veterinary journal*, 32(2), 164-166.
57. Nikolakopoulos, E., Kindahl, H., Gilbert, C. L., Goode, J., & Watson, E. D. (2000). Release of oxytocin and prostaglandin F₂ α around teasing, natural service and associated events in the mare. *Animal reproduction science*, 63(1-2), 89-99.
58. O.J. Ginther, E.L. Gastal, M.O. Gastal, D.R. Bergfelt, A.R. Baerwald, R.A. Pierson. Comparative Study of the Dynamics of Follicular Waves in Mares and Women; *Biology of Reproduction*, Volume 71, Issue 4, 1 October 2004, Pages 1195–1201
59. 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 , IL-6, TNF- α and COX-2 mRNA in the equine endometrium. *Theriogenology*, 70(5), 843-851.
60. Patrick M. McCue, Charles F. Scoggin and Alicia R.G. Lindholm (2011). Estus. En: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., & Varner, D. D. *Equine Reproduction*, 2a ed. St. Louis, Ed Blackwell. pp 1716-1727
61. Petersen, M. M., Wessel, M. T., Scott, M. A., Liu, I., & Ball, B. A. (2002). Embryo recovery rates in mares after deep intrauterine insemination with low numbers of cryopreserved equine spermatozoa. *Theriogenology*, 58(2-4), 663-665.
62. Portus, B. J., Reilas, T., & Katila, T. (2005). Effect of seminal plasma on uterine inflammation, contractility and pregnancy rates in mares. *Equine veterinary journal*, 37(6), 515-519.
63. Reger, H. P., Bruemmer, J. E., Squires, E. L., Maclellan, L. J., Barbacini, S., Necchi, D., & Zavaglia, G. (2003). Effects of timing and placement of cryopreserved semen on fertility of mares. *Equine Veterinary Education*, 15(2), 101-106.

64. Rigby, S., Derczo, S., Brinsko, S., Blanchard, T., Taylor, T., Forrest, D. W., & Varner, D. (2000, November). Oviductal sperm numbers following proximal uterine horn or uterine body insemination. In CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS (Vol. 46, pp. 332-334).
65. Rigby, S., Hill, J., Miller, C., Thompson, J., Varner, D., & Blanchard, T. (1999). Administration of oxytocin immediately after insemination does not improve pregnancy rates in mares bred by fertile or subfertile stallions. *Theriogenology*, 51(6), 1143-1150.
66. Samper, J. C. (2001). Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Animal Reproduction Science*, 68(3-4), 219-228.
67. Samper, J. C., & Plough, T. (2010). Techniques for the insemination of low doses of stallion sperm. *Reproduction in domestic animals*, 45, 35-39.
68. Samper, J. C., Gomez, I., & Sanchez, R. (2008). Rectally guided or hysteroscopic insemination: is there a difference?. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28(11), 640-644.
69. 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 Equine Medicine*, 32(1), 24-26.
70. Sanchez, R., Gomez, I., & Samper, J. C. (2008). ARTIFICIAL INSEMINATION WITH FROZEN SEMEN. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination E-Book*. pp 175-183
71. Sanchez, R., Gomez, I., & Samper, J. C. (2008). ARTIFICIAL INSEMINATION WITH 15 FROZEN SEMEN. *Equine breeding management and artificial insemination*, 175.
72. Scott, M. A. (2000). A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Animal Reproduction Science*, 60, 337-348.
73. Scott, M. A., Varner, D. D., Liu, I. K. M., & Enders, A. C. (2002). Presumptive evidence of a preovulatory sperm reservoir in the mare: morphological investigations using scanning electron microscopy. *Theriogenology*, 58(2-4), 639-642.
74. Sharma, S., Dhaliwal, G.S. & Dadarwal D. (2010) Reproductive efficiency of Thoroughbred mares under Indian subtropical conditions: A retrospective survey over 7 years. *Animal Reproduction Science* 117: 241–248
75. Sieme, H., Bonk, A., Hamann, H., Klug, E., & Katila, T. (2004). Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology*, 62(5), 915-928.

76. Sieme, H., Schäfer, T., Stout, T. A. E., Klug, E., & Waberski, D. (2003). The effects of different insemination regimes on fertility in mares. *Theriogenology*, 60(6), 1153-1164.
77. Squires, E. L., Reger, H. P., MAGELLAN, L., & Bruemmer, J. E. (2002). Effect of time of insemination and site of insemination on pregnancy rates with frozen semen. *Theriogenology*, 58(2-4), 655-658.
78. Suarez, S. S. (2002). Gamete transport. In *Fertilization* (pp. 3-28). Academic Press.
79. Suarez, S. S. (2006). Gamete and zygote transport. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, 1, 113-145.
80. Thomas, P. G., Ball, B. A., & Brinsko, S. P. (1994). Interaction of equine spermatozoa with oviduct epithelial cell explants is affected by estrous cycle and anatomic origin of explant. *Biology of reproduction*, 51(2), 222-228.
81. Troedsson Mats H.T. (2011) Endometritis. En McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. (2011) *Equine Reproduction*, 2a ed. St. Louis, Ed Blackwell. pp 2608-2619
82. Troedsson, M. H. (2006). Breeding-induced endometritis in mares. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 22(3), 705-712.
83. Troedsson, M. H. T., Crabo, B. G., Ibrahim, N., & Scott, M. (1995). Mating-induced endometritis: mechanisms, clinical importance, and consequences. In *Proceedings of the... annual convention*.
84. Troedsson, M. H. T., Liu, I. K. M., & Crabo, B. G. (1998). Sperm transport and survival in the mare. *Theriogenology*, 49(5), 905-915.
85. 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. *Animal reproduction science*, 68(3-4), 273-278.
86. Troedsson, M. H., Liu, I. K., Ing, M., & Pascoe, J. (1995). Smooth muscle electrical activity in the oviduct, and the effect of oxytocin, prostaglandin F₂ α , and prostaglandin E₂ on the myometrium and the oviduct of the cycling mare. *Biology of Reproduction*, 52(monograph_series1), 475-488.
87. VIDAMENT M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim Reprod Sci* 2005;89(1-4):115-136.
88. 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.
89. Watson, E. D. (2000). Post-breeding endometritis in the mare. *Animal reproduction science*, 60, 221-232.
90. Watson, E. D., & Nikolakopoulos, E. (1996). Sperm longevity in the mare's uterus. *Journal of Equine Veterinary Science*, 16(9), 390-392.

91. Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, 60, 481-492.
92. Winter, G. H. Z. (2007). Características reprodutivas sazonais da égua crioula em uma propriedade à latitude 29°38 S no Rio Grande do Sul.
93. Woods, J., Rigby, S., Brinsko, S., Stephens, R., Varner, D., & Blanchard, T. (2000). Effect of intrauterine treatment with prostaglandin E2 prior to insemination of mares in the uterine horn or body. *Theriogenology*, 53(9), 1827-1836.
94. Woodward, E. M., Christoffersen, M., Campos, J., Betancourt, A., Horohov, D., Scoggin, K. E., ... & 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