

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**TRANSPORTE ESPERMÁTICO EN YEGUAS 2, 4 Y 12 HORAS LUEGO DE LA
INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN CONGELADO**

POR

María Del Pilar GARCÍA LÓPEZ

**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**

2018

TG
851

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa:

Dr. Javier Mirazo

Segundo Miembro (Tutor):

Dr. Nicolás Cazales

Tercer Miembro:

Dr. Alejandro Bielli

Cuarto Miembro:

Dra. María José Estradé

Fecha:

21 de diciembre de 2018

Autor:

María del Pilar García López

AGRADECIMIENTOS

La presente tesina ha sido un gran desafío para mí. Fueron muchos meses dedicados al estudio durante los cuales siempre conté con el apoyo incondicional de mi familia y amigos. Les agradezco infinitamente por todo ese apoyo brindado.

Agradezco especialmente a mi tutor, el Dr. Nicolás Cazales, por haberme brindado la oportunidad de realizar este estudio junto a él, que con su paciencia, dedicación y entusiasmo estuvo en cada paso del presente trabajo, dedicando su tiempo y conocimientos para guiarme y apoyarme con el desarrollo de la tesis.

Otro agradecimiento muy importante a mi co-tutora, la Dra. María José Estradé, por su constante disponibilidad en todo momento y por su ayuda indispensable en la redacción de la tesis.

Quiero agradecer particularmente a mis compañeras del proyecto de tesis, Florencia Pereyra, Sofía Lazcano y Elisa Moreno, quienes compartieron el trabajo en todo momento.

Agradezco a todo el personal del frigorífico, por hacer posible la realización de la investigación, y por la ayuda durante el proceso.

Agradezco al personal de la biblioteca, quienes me ayudaron con la búsqueda de material y con los formatos requeridos.

Agradezco a Laboratorios Santa Elena, por haberme apoyado incondicionalmente durante toda mi carrera.

Por último, pero no menos importante agradezco a toda la familia del Haras Don Alfredo, que estuvieron acompañándome día a día en esta última etapa.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	7
Página	7
RESUMEN	8
SUMMARY	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Inseminación con semen congelado en la actualidad.....	10
1.2 Antecedentes sobre transporte espermático al utilizar semen congelado	10
1.3 Caracterización del problema	11
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Anatomía del aparato reproductor de la yegua	13
2.1.1 Ovarios.....	13
2.1.2 Trompas uterinas	14
2.1.3 Útero	15
2.1.4 Cérvix	15
2.1.5 Vagina	15
2.1.6 Vestíbulo y vulva	15
2.1.7 Vulva	16
2.2 Fisiología reproductiva en la yegua y fotoperiodo.....	17
2.2.1 Ciclo estral	18
2.2.1.1 Estro.....	18
2.2.1.2 Diestro.....	18
2.3 Examen ginecológico.....	19
2.3.1 Palpación rectal.....	19
2.3.2 Ultrasonografía.....	19
2.3.3. Citología endometrial	20
2.3.4. Biopsia endometrial.....	21

2.4 Evaluación de padrillos para congelamiento de semen	23
2.4.1 Valoración seminal	23
2.5 Interacción entre los espermatozoides y el útero.....	27
2.6 Transporte espermático	28
2.7 Selección espermática.....	29
2.8 Interacción entre los espermatozoides y las trompas uterinas	30
2.9 Inseminación artificial en equinos	32
2.9.1 Historia.....	32
2.9.2 Inseminación artificial con semen congelado	33
2.9.2.1. Ventajas	33
2.9.2.2. Frecuencia de inseminaciones por estro.....	33
2.9.2.3. Elección del momento de la inseminación	34
2.9.2.4 Efecto del lugar de inseminación	35
2.9.2.5 Efecto de la dosis (número de espermatozoides) de la IA en las tasas de preñez	36
2.9.3 Procedimientos post inseminación artificial con semen congelado.....	38
3. HIPÓTESIS	39
4.OBJETIVOS	40
4.1 General.....	40
4.2 Específicos	40
5 5.MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1 Lugar y momento donde se realizó la investigación	41
5.2 Animales utilizados en la investigación.....	41
5.3 Examen ginecológico.....	41
5.4 Colecta y procesamiento de semen.....	42
5.5 Diseño experimental	42
5.6 Faena	43
5.7 Colecta y procesamiento de muestras.....	43
5.8 Registro de datos de las yeguas.....	43
5.9 Análisis estadístico	44
6.RESULTADOS	45

6.1 Relación entre el lugar de inseminación y el número de espermatozoides encontrados en las trompas uterinas a las 2, 4 y 12 horas post inseminación	45
6.2 Relación entre la dosis inseminante y el número de espermatozoides encontrados en las trompas uterinas ipsilateral al folículo dominante a las 2, 4 y 12 horas post inseminación	45
6.3 Efecto del sitio y dosis de inseminación sobre el transporte espermático independientemente del tiempo post inseminación	45
7.DISCUSIÓN	47
8.CONCLUSIONES.....	50
9.ANEXO.....	51
10.BIBLIOGRAFÍA	54

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Figura 1. Vista dorsal del aparato reproductivo de la yegua, (Brinsko et al., 2011).	13
Figura 2. Anatomía de las trompas uterinas de la yegua (Schnobrich, 2018)	14
Figura 3. Imagen citológica del endometrio normal de una yegua teñido con la técnica de Panóptico Pappenheim, (Brinsko et al., 2011).	21
Figura 4. Imagen citológica del endometrio de una yegua con endometritis aguda teñido con la técnica de Hematoxilina eosina, (Brinsko et al., 2011).	21
Figura 5. Estructura de un espermatozoide normal (England, 2005).	26
Figura 6. Media de espermatozoides \pm D.S. relacionado al (A) Sitio de inseminación y tiempo; (B) Dosis inseminante y tiempo; (C) Dosis inseminante y sitio.	46

RESUMEN

La inseminación artificial equina con semen congelado ha adquirido a nivel mundial un notable desarrollo durante los últimos años, teniendo un gran impacto en la industria equina, situación que se está viendo reflejada actualmente en nuestro país. Sin embargo, se desconoce el transporte espermático en yeguas cuando se utilizan este tipo de técnicas. El objetivo de estudio fue determinar si el número total de espermatozoides, y el lugar de inseminación tienen alguna influencia en el transporte espermático 2, 4 y 12 horas luego de la inseminación artificial (IA) con semen congelado en yeguas. Para este estudio, se utilizaron 89 yeguas destinadas a faena, saludables y en celo, con folículo dominante ≥ 35 mm de diámetro, edema uterino y citología endometrial negativa (ausencia de polimorfonucleares). Las yeguas fueron aleatoriamente inseminadas con semen congelado proveniente de un solo padrillo con motilidad progresiva post descongelado de > 40 %, en la mitad del cuerpo uterino o en la punta del cuerno ipsilateral al folículo preovulatorio con una pajuela de 0,5 mL (50×10^6 espermatozoides totales) o 8 pajuelas de 0,5 mL (400×10^6 espermatozoides totales). Las yeguas fueron sacrificadas de manera humanitaria a las 2, 4 y 12 horas posteriores a la IA con semen congelado. Las trompas uterinas ipsilaterales al folículo dominante fueron separadas del útero y lavadas con 1 mL de PBS con 0,1% de dodecil-sulfato sódico. Los espermatozoides recuperados en el lavado fueron contados en una cámara hemocito-métrica de Neubauer®. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando ANOVA, considerándose la dosis, el tiempo y el lugar de inseminación como variables independientes y el número de espermatozoides recuperados de las trompas uterinas como variable dependiente. Probabilidades $< 0,05$ fueron consideradas como significativas. Los resultados demostraron que, con respecto al lugar de inseminación y su relación con el tiempo de transporte espermático, existió una tendencia ($p=0,070$) a las 2 horas a favor de la inseminación en la punta del cuerno independientemente de la dosis inseminante. En cuanto a la dosis inseminante, la dosis de 400×10^6 espermatozoides a las 4 horas fue en la que se recuperó un mayor número de espermatozoides de las trompas uterinas. Siendo la que tuvo mayor transporte espermático ($p \leq 0,001$) independientemente del lugar de la inseminación. En relación a la dosis y a la inseminación en el cuerpo uterino independientemente del tiempo, se encontraron diferencias a favor de la inseminación con 400×10^6 , no recuperándose espermatozoides de la trompa uterina ipsilateral al folículo dominante cuando se inseminó con 50×10^6 de espermatozoides totales. Se concluyó que, el inseminar en la punta del cuerno independientemente de la dosis nos favorece y acelera el transporte espermático a las 2 horas post inseminación, facilitando la llegada de los espermatozoides a las trompas uterinas ($p=0,025$). Al utilizar dosis altas de 400×10^6 independientemente del lugar de inseminación se obtienen más cantidades de espermatozoides que inseminando con dosis bajas de 50×10^6 espermatozoides, no habiendo diferencias en inseminar en la punta o en el cuerpo ($p > 0,05$). Al elegir dosis de inseminación bajas de 50×10^6 espermatozoides a diferencia de la inseminación con dosis estándar, conviene inseminar en la punta del cuerno ya que se logra mayor transporte espermático ($p=0,006$).

SUMMARY

Equine artificial insemination with frozen semen has acquired a worldwide remarkable development during the last years, with a great impact in equine industry. This situation has influenced our country. However, sperm transport in mares is unknown when this type of technique is used. The objective of the study was to determine if the total number of spermatozoa, and the site of insemination, have any influence on sperm transport 2, 4 and 12 hours after artificial insemination with frozen semen in mares. For this study, 89 mares intended for slaughter were utilized, healthy and in heat, with dominant follicle ≥ 35 mm of diameter, uterine edema and negative endometrial cytology (absence of polymorphonuclears). The mares were randomly inseminated with frozen semen from a single stallion with progressive motility post-thawing of $> 40\%$, in the middle of the uterine body or at the tip of the ipsilateral horn to the pre-ovulatory follicle with a straw of 0.5 mL (50×10^6 total spermatozoa) or 8 straws of 0.5 mL (400×10^6 total spermatozoa). The mares were sacrificed in a humanitarian way 2, 4 and 12 hours after the artificial insemination with frozen semen. The ipsilateral oviducts to the dominant follicle were separated from the uterus and washed with 1 mL of PBS with 0.1% of sodium dodecyl-sulfate. The spermatozoa recovered in the flushing were counted in a Neubauer® hemocyte-metric chamber. The data obtained were analyzed using ANOVA, considering the dose, time and site of insemination as independent variables and the number of recovered spermatozoa from the oviducts as a dependent variable. Probabilities < 0.05 were considered significant. The results showed that, with regards to the site of insemination and its relation to the time of sperm transport, there was a trend ($p=0.070$) at 2 hours in favor of the insemination at the tip of the horn, regardless of the inseminating dose. Regarding the inseminating dose, the 400×10^6 sperm dose at 4 hours was the one in which a greater number of spermatozoa of the oviducts was recovered, this one being the one with the highest sperm transport ($p \leq 0.001$) regardless of the insemination site. In relation to dose and insemination in the uterine body independently of time, differences were found in favor of insemination with 400×10^6 , with no recovered sperm from the ipsilateral oviduct to the dominant follicle when it was inseminated with 50×10^6 of total sperm. It was concluded that the act of insemination at the tip of the horn, regardless of the dose, has a positive benefit and accelerates sperm transport at 2 hours post-insemination, easing the arrival of sperm to the oviducts ($p=0.025$). When using high doses of 400×10^6 , regardless of the place of insemination, more quantity of sperm is obtained than inseminating with low doses of 50×10^6 sperm, with no difference between inseminating in the tip or in the body ($p \geq 0.05$). When choosing low doses of insemination of 50×10^6 sperm, unlike insemination with standard doses, it is convenient to inseminate in the tip of the horn, given that greater sperm transport is achieved ($p=0.006$).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Inseminación con semen congelado en la actualidad

En los últimos 25 años se han logrado avances en los programas de inseminación artificial con semen congelado debido principalmente a que los caballos de deporte, en especial aquellos destinados a salto y polo permanecen durante todo el año en competiciones. Para cumplir con las demandas del mercado, los propietarios de los padrillos aprovechan el periodo de descanso de estos, que es solamente durante algunos meses del año para extraerles y congelarles el semen. En algunas ocasiones para reproductores muy importantes no existe ninguna posibilidad de preñar yeguas con semen fresco y o refrigerado durante toda la temporada (Sanchez, 2015).

A pesar de los avances y al contrario de lo que ocurre en bovinos, la inseminación artificial (IA) con semen congelado todavía no sustituyó la IA con semen fresco o refrigerado en la producción equina. Esto se debe a los bajos índices de preñez obtenidos con el semen congelado de algunos padrillos, a la diversidad de criterios para el procesamiento en la congelación de semen y a las diferentes técnicas y estrategias de inseminación empleadas por veterinarios y centros de reproducción equina (Love, 2012; Aurich, 2012).

Cabe destacar que, en bovinos, los toros se han ido seleccionando durante mucho tiempo en base a la habilidad del semen para soportar el estrés causado por los procedimientos de criopreservación. Esta selección ha llevado a una buena respuesta en aquellos toros elegidos para criopreservar, sin embargo, en equinos, no se ha aplicado este tipo de selección (Brinsko et al., 2011; Alonso et al., 2016; Pérez et al., 2017). En general, los padrillos que se utilizan en un programa de inseminación artificial con semen congelado no se seleccionan por su eficiencia reproductiva sino por su aptitud deportiva y o fenotipo.

1.2 Antecedentes sobre transporte espermático al utilizar semen congelado

El transporte espermático, es el proceso que ocurre posteriormente a que la yegua sea cubierta o inseminada, mediante el cual un porcentaje de espermatozoides fértiles es rápidamente transportado por medio de la influencia de contracciones uterinas hasta el lugar donde ocurre la fecundación en la trompa uterina (Katilla, 1997). Katilla et al., (2000) identificaron espermatozoides marcados radioactivamente en la punta del cuerno uterino 8 minutos posteriores a la IA. Luego de 30 minutos de la inseminación con semen fresco fueron identificados en 67 % de las yeguas la presencia de células espermáticas en las trompas uterinas (Fiala et al., 2007). El número de espermatozoides presentes en las trompas uterinas aumenta con el correr de las horas post IA, alcanzando su mayor población en aproximadamente 4 horas (Bader, 1982; Fiala et al., 2007). Esto concuerda con las bajas tasas de preñez obtenidas en yeguas a las cuales se les realizaron lavados uterinos antes de las 4 horas post inseminación artificial (Brinsko et al., 1991). A partir de ese momento, el transporte espermático aparentemente está completo.

Se cree también que el momento y el lugar de inseminación afectan al transporte espermático, y que la región del istmo caudal de la trompa uterina, como en la mayoría de las especies, es una región de selección y depósito de espermatozoides para las yeguas inseminadas antes de la ovulación (Bader, 1982; Scott et al., 1994; Scott y Liu, 1995).

1.3 Caracterización del problema

Las limitaciones más importantes que han sido reportadas con el uso de semen congelado equino, se basan en la disminución de las tasas de preñez logradas al compararlas con las obtenidas con semen fresco refrigerado, e incluso más bajas a las obtenidas en otras especies domésticas (López y Fernández et al., 2007).

Esto, es atribuido a diversos factores, entre los que se destaca: la fertilidad intrínseca de cada animal, debido a que existe una gran variabilidad entre espermatozoides de diferentes padrillos (Dowsett y Knott, 1996), principalmente en relación a su capacidad de tolerar los procesos de congelación y descongelación (Samper, 1995; Woldsdorf, 2013). Además, una vez depositado el semen congelado en el útero de la yegua, este presenta una menor longevidad si se lo compara con el semen fresco o refrigerado (Watson, 2000; Cuervo y Arango, 2015). Según Sieme et al. (2004), las bajas tasas de preñez logradas mediante la inseminación artificial con semen congelado en comparación con la inseminación con semen fresco estarían relacionadas también con la edad, y el estatus reproductivo de la reproductora.

La endometritis post inseminación con semen congelado, es otro factor muy importante. Según Le Blanc (2003), todas las yeguas experimentan una respuesta inflamatoria fisiológica en el útero luego de inseminadas, y dicha respuesta es modulada por el plasma seminal, quien amortigua la respuesta inflamatoria fisiológica de las yeguas al disminuir la migración de neutrófilos dentro del lumen uterino. La crío preservación del semen equino, involucra la remoción de la mayoría del plasma seminal, lo que podría exacerbar la respuesta inflamatoria uterina en la yegua (Troedsson et al., 1995; Leblanc, 2003).

Aunque la información es limitada, se cree que solo un 25 % de los padrillos que se utilizan para congelar semen logran índices de concepción comparables a los obtenidos tras la inseminación artificial con semen fresco, aun cuando la inseminación con semen congelado es realizada en el momento óptimo y en yeguas saludables (Samper et al., 2001).

La evidencia científica sugiere que, aunque algún semen congelado de alta calidad puede permanecer viable en el tracto reproductivo de la yegua durante 48 horas (Volkman y Zyl, 1987), la gran mayoría no dura más de 12 horas (Sieme et al., 2003) sin que se vea perjudicada su viabilidad. Esta última característica del semen congelado hace necesaria la implementación de protocolos de inseminación que requieren un manejo intensivo de las yeguas, con una mayor frecuencia de exámenes ecográficos por ciclo, incrementándose así los costos derivados de la IA con semen congelado, sin una clara mejora en los índices de fertilidad (Sieme, 2011).

Varias investigaciones sugieren una menor capacidad del semen congelado de establecer reservorios de espermatozoides en las trompas uterinas, y esto explica en parte la menor fertilidad del semen congelado, junto con la menor sobrevivencia

mencionada anteriormente, lo que explicaría la necesidad de tener que inseminar lo más cerca posible de la ovulación cuando se usa semen congelado equino (Dobrinski et al., 1995).

Además, los procedimientos de congelación y descongelación provocan una serie de efectos nocivos en las células espermáticas, lo que consecuentemente lleva a una baja en las tasas de preñez, debido a las alteraciones en la capacidad de adaptación de los espermatozoides a los extensores de crio preservación. Debido a ello, es que es recomendable que los protocolos de trabajo con semen congelado sean realizados en lugares acondicionados con la infraestructura necesaria (Samper y Hankins 2001).

Hasta el momento, se desconocen aspectos importantes en relación al transporte espermático cuando se utilizan técnicas de inseminación artificial con semen congelado en yeguas. No existen estudios controlados sobre el tiempo de entrada de los espermatozoides a las trompas uterinas luego de la IA con semen congelado, ni sobre el transporte espermático en la IA profunda con bajo volumen, la cual es ampliamente utilizada por los veterinarios de campo en las razas que esta biotecnología se encuentra permitida.

A raíz de las limitaciones ya mencionadas en el uso de inseminación con semen congelado, es que surge la presente investigación con la finalidad de contribuir a la eficiencia de la inseminación artificial con semen congelado en equinos, a través del estudio del transporte espermático. Los objetivos particulares de este experimento fueron determinar como la dosis y el sitio de inseminación afectan el transporte espermático a las 2, 4 y 12 hs luego de la IA con semen congelado

En el futuro, todo indica que la demanda de semen congelado continuará creciendo de la mano de la industria equina, es debido a ello que es importante la implementación de estudios enfocados a la mejora de las técnicas utilizadas en los protocolos de inseminación con semen congelado (Alonso et al.,2016).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anatomía del aparato reproductor de la yegua

El aparato reproductor de la yegua involucra dos grupos de órganos: por un lado están aquellas estructuras que son intrínsecas al tracto reproductivo: ovarios, trompas uterinas, cuernos uterinos, cuerpo uterino, cérvix, vagina, vestíbulo y vulva. Estos órganos, producen el ovocito, facilitan su fertilización y otorgan un ambiente adecuado para el desarrollo embrionario y fetal (Youngquist y Threlfall, 2007).

Y, por otro lado se encuentran aquellas estructuras que interactúan con los órganos ya mencionados, y que desarrollan un rol fundamental en la regulación de los eventos de la reproducción: glándula pineal, la retina, el hipotálamo y la glándula hipófisis (Brinsko et al., 2011).

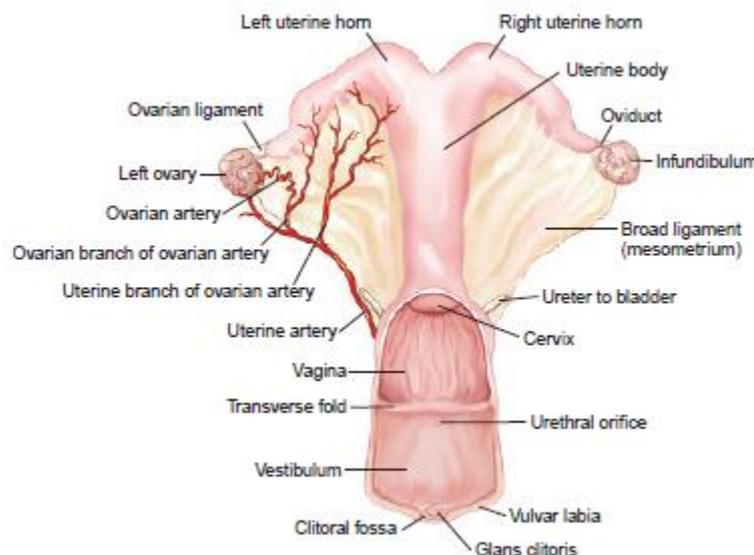


Figura 1. Vista dorsal del aparato reproductivo de la yegua, (Brinsko et al., 2011).

2.1.1 Ovarios

Al igual que en otros mamíferos, los ovarios en la yegua desarrollan una función exocrina (producción de gametos), y una función endócrina (producción hormonal).

Los ovarios en la yegua poseen un tamaño según la actividad ovárica, siendo más grandes durante la temporada reproductiva y más pequeños durante la época no reproductiva (Brinsko et al., 2011). A diferencia de la mayoría de las especies domésticas, en la yegua los ovarios presentan una zona parenquimatosa interna (corteza) y una zona vascular externa (médula) (Dyce, 2003; Youngquist y Threlfall, 2007).

2.1.2 Trompas uterinas

Las trompas uterinas o trompas de falopio, son dos estructuras, que cada una se encuentra asociada a un ovario y a un cuerno uterino. Estas estructuras son el segmento inicial del tracto tubular reproductivo de la yegua (Youngquist y Threlfall, 2007).

Se componen de tres partes: el infundíbulo (porción más cercana al ovario), la ampolla (porción media), y el istmo (segmento que conecta la ampolla con la unión útero tubárica) (Brinsko et al., 2011).

La porción proximal de los trompas uterinas proporcionan un conducto para el transporte del ovocito desde la fosa de ovulación, hacia el sitio de fecundación en la unión de la ampolla al istmo (Youngquist y Threlfall, 2007; Schnobrich, 2018).

Una particularidad de la yegua, es que una vez que el ovocito es fertilizado, y se convierte en embrión, este permanece en las trompas uterinas por aproximadamente 5 días y medio antes de entrar al lumen uterino (Weber et al., 1991; Schnobrich, 2018).

Al final de cada trompa uterina, se encuentra una pequeña papila que contiene fibras musculares, y es a través de esta estructura que se conecta el lumen del cuerno uterino con el lumen de la trompa uterina (Youngquist y Threlfall, 2007).

El espermatozoide accede a las trompas uterinas a través de la unión útero tubárica (UUT), la cual se localiza en el centro de la papila oviductal. Durante el estro, se presentan pliegues edematosos longitudinales en la unión útero tubárica, y se pueden encontrar numerosos espermatozoides alojados en estos pliegues dentro de las primeras 4 horas post cobertura. La UUT juega un rol muy importante en la selección de espermatozoides morfológicamente normales, así como también actúa como un sitio de reserva espermática previo a su transporte hacia las trompas uterinas. (Brinsko et al., 2011).

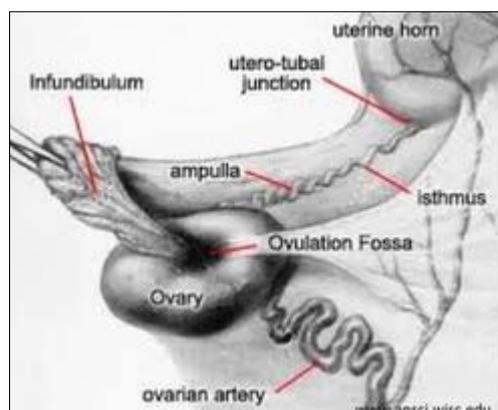


Figura 2. Anatomía de las trompas uterinas de la yegua (Schnobrich, 2018)

2.1.3 Útero

El útero es un órgano que posee dos cuernos, un cuerpo, y el cérvix.

La pared uterina se divide en perimetrio, miometrio y endometrio. El perimetrio es la capa más externa, el miometrio es la capa media, compuesta por fibras musculares dispuestas longitudinalmente, y el endometrio es la capa más interna (mucosa).

El endometrio juega un rol muy importante en la regulación de la función luteal durante el ciclo estral y preñez en la yegua (Youngquist y Threlfall, 2007).

El grosor de las paredes uterinas, y el tono del miometrio, varían con el momento de la reproducción y la edad de la yegua (Allen, 1994).

2.1.4 Cérvix

El cérvix representa la porción caudal del útero, y funciona como una barrera para evitar el pasaje de material extraño durante la preñez, y permite el pasaje del potrillo durante el parto (Youngquist y Threlfall, 2007).

El cérvix es un órgano dinámico en la yegua, cuyo epitelio refleja su función, presentando un alto número de células ciliadas y células productoras de mucus (Samper y Pycock 2007). El mucus producido por las células del epitelio del cérvix, sirve como lubricante o sellante, dependiendo de la etapa del ciclo estral o preñez (Brinsko et al., 2011).

Durante la preñez y el diestro, bajo la influencia de la progesterona, el cérvix permanece cerrado. La habilidad del cérvix para contraerse o dilatarse es crítica para el éxito reproductivo de la yegua, su preñez y parto (Youngquist y Threlfall, 2007).

El cérvix, es una importante barrera física de protección al útero, a través de su separación con la vagina. Los procesos inflamatorios en el cérvix, generalmente son asociados con una endometritis o vaginitis (Pycock, 2009).

2.1.5 Vagina

La vagina es un órgano tubular que se extiende horizontalmente entre 15 y 20 cm dentro de la cavidad pélvica, desde el orificio externo del cérvix hasta el pliegue transversal que recubre el orificio uretral externo (Brinsko et al., 2011).

2.1.6 Vestíbulo y vulva

El vestíbulo es la parte terminal del tracto genital (Dyce, 2003), se extiende desde los labios de la vulva hasta el estrechamiento vestíbulo-vaginal (Allen, 1994). Las paredes del vestíbulo y del piso vestibular están compuestas por el músculo constrictor vestibular. Se encuentra rodeado por el músculo constrictor vulvar y vaginal, minimizando así, la entrada de material extraño. El vestíbulo contiene glándulas

vestibulares ventralmente, las cuales segregan moco para otorgar lubricación del tracto tubular posterior (Brinsko et al., 2011).

2.1.7 Vulva

La vulva es la abertura externa del tracto reproductivo de la yegua. La abertura vulvar vertical normalmente comienza 5 a 7 cm directamente por debajo del ano, y tiene una longitud de aproximadamente 12 a 15 cm (Brinsko et al., 2011).

2.2 Fisiología reproductiva en la yegua y fotoperiodo

La performance reproductiva en la yegua ha sido descrita como menor en comparación con otras especies domésticas. Algunas características del ciclo de la yegua que puedan atribuirse a esa baja performance reproductiva son: patrón de ovulación estacional, ciclos estrales erráticos durante la etapa de transición y presencia de fase folicular extensa requerida para el desarrollo de un folículo ovulatorio (McKinnon, 2009).

La yegua es poliéstrica estacional de día largo, con mayor actividad ovárica durante los meses de primavera y verano (Raz and Aharonson-Raz, 2012). Su ciclo reproductivo puede ser dividido en cuatro periodos: anestro, fase transicional hacia la etapa cíclica, fase reproductiva fisiológica y fase de transición fuera de la etapa de servicios. La etapa de anestro, es caracterizada por presentar ovarios inactivos y fallas en la ovulación de la mayoría de las yeguas. Sin embargo, no es inusual encontrar yeguas durante la fase de anestro que presenten periodos de comportamiento de celo errático, lo cual esta generalmente asociado a la alimentación de la reproductora. La fase de anestro en el hemisferio sur se presenta a partir del mes de mayo hasta el mes de agosto, y es caracterizada por falta de receptividad sexual de la hembra al macho, ovarios chicos y tracto reproductivo sin signos de ciclicidad (Katila, 2011).

Diversos estudios realizados en la Universidad de Colorado comprobaron que la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) en el hipotálamo y la hormona luteinizante (LH) en la glándula pituitaria se encuentran en bajos niveles durante el anestro. Una vez que la yegua atraviesa el periodo de transición, las concentraciones de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) se ven incrementadas en el hipotálamo, no así las concentraciones de LH (Squires et al., 1986).

El aumento de horas luz durante el día es determinante para la actividad ovárica, y es un proceso conocido como fotoperiodo (Raz and Aharonson-Raz, 2012). La presencia o ausencia de luz es percibida por fotoreceptores presentes en la retina ocular, los cuales envían mensajes a la glándula pineal (Brinsko et al., 2011).

La glándula pineal es reconocida como parte del mecanismo para monitorizar eventos del fotoperiodo (McKinnon, 1992). El mecanismo por el cual la glándula pineal regula el fotoperiodo es a través de la secreción de la hormona melatonina durante la noche (McKinnon, 2009).

La melatonina actúa disminuyendo la síntesis de GnRH en el hipotálamo. Durante el invierno, la síntesis de melatonina es mayor con su consecuente disminución en las concentraciones de GnRH. El aumento del fotoperíodo luego del invierno, resulta en una disminución gradual de la síntesis de melatonina, y un aumento pulsátil en la secreción de GnRH (Youngquist y Threlfall, 2007), a partir de la cual la adenohipófisis es estimulada a generar y liberar gonadotrofinas (FSH y LH), cuyos órganos blanco son los ovarios (Morel, 2003).

Si bien el fotoperiodo es un factor muy importante en la ciclicidad, existen a su vez factores exógenos que repercuten en la actividad reproductiva estacional de la yegua tales como la edad, estado reproductivo, nutrición, condición corporal y la temperatura del medio ambiente (Aurich, 2011).

2.2.1 Ciclo estral

El ciclo estral normal de una yegua es de aproximadamente 21 días, con un promedio de entre 5 a 7 días de estro y entre 14 a 16 días de diestro.

Durante el transcurso del ciclo estral, el endometrio de la yegua presenta cambios morfológicos y funcionales, que son inducidos principalmente por la progesterona y el estradiol (Aurich, 2011; Gebhardt et al., 2012).

2.2.1.1 Estro

El estro, es un periodo que dura de 5 a 7 días, y se caracteriza por presentar niveles altos de estradiol en sangre durante el comienzo de este período. La progesterona presenta bajos niveles sanguíneos en este momento (menos de 1ng/mL).

Las yeguas, comienzan a mostrar signos de celo tales como vulva edematizada, eversión del clítoris, orina frecuente, entre otros (Youngquist y Threlfall, 2007). Mediante la palpación durante el examen ginecológico, se aprecia la vagina, el cérvix y el útero relajados. El tono uterino va aumentando una vez que la yegua pasa del estro al diestro (Morel, 2003).

Durante esta etapa, el folículo dominante bajo la acción de la LH, crece en tamaño y produce más estradiol, mientras que los folículos subordinados se vuelven atrésicos por la acción de la inhibina. El folículo dominante tiene un crecimiento de entre 3 a 5 mm por día, hasta alcanzar su tamaño preovulatorio de 40-45 mm de diámetro (Samper, 2009). El día cero corresponde al día de la ovulación, y ocurre generalmente 24-48 horas antes del fin del estro (Katilla, 2011). Generalmente, una vez que las yeguas han experimentado la ovulación inicial durante la temporada reproductiva, se vuelven normalmente cíclicas (McKinnon, 2009).

2.2.1.2 Diestro

El período de diestro tiene una duración de entre 14 y 16 días, se caracteriza por comenzar luego de la ovulación, con el consecuente desarrollo del cuerpo lúteo (Brinsko et al., 2011). Durante este período, la yegua cesa el comportamiento de celo descrito anteriormente.

La hormona reproductiva predominante durante el diestro es la progesterona, cuyos niveles plasmáticos alcanzan su máximo nivel entre el día 4 y 7 luego de la ovulación (Youngquist y Threlfall, 2007; Brinsko et al., 2011).

Al día 14 o 15 post ovulación, en ausencia de reconocimiento materno de preñez, los niveles de prostaglandina se elevan, llevando a una lisis del cuerpo lúteo y un descenso en los niveles de progesterona plasmáticos. La yegua retorna al estro entre 1 y 3 días después de la regresión del cuerpo lúteo y así comienza un nuevo ciclo estral (Youngquist y Threlfall, 2007; Brinsko et al., 2011).

2.3 Examen ginecológico

2.3.1 Palpación rectal

Existen dos principios establecidos para examinar el tracto reproductivo de una yegua, el primero de ellos es establecer la orientación anatómica normal, y el segundo es realizar el examen de forma metódica, logrando así reducir las posibilidades de error.

El examinador, deberá comenzar identificando determinadas estructuras referentes tales como el piso de la pelvis, el sacro, las alas del íleon y el borde de la pelvis. Una vez que el examinador ha logrado identificar las estructuras mencionadas anteriormente, puede continuar con el examen específico del tracto reproductor.

Tres estructuras anatómicas han sido descritas por varios referentes en el tema para localizar el aparato reproductor de la yegua: el cérvix, el borde anterior del útero y los ovarios. Todas estas estructuras tienen una posición relativamente inconstante.

El cérvix de una yegua no gestante se encuentra en la cavidad pélvica, mientras que el borde anterior del útero y los ovarios se encuentran siempre en la cavidad abdominal. El cérvix puede ser palpado en casi todo momento, pero durante el estro, este se encuentra relajado por lo que se vuelve menos perceptible (Brinsko et al., 2011).

El cuerpo uterino va hacia adelante y abajo sobre el suelo anterior de la pelvis, y abdomen caudal, en posición dorsal o dorsolateral con respecto a la vejiga. (Allen, 1994).

Los ovarios y las trompas uterinas son las estructuras que se encuentran más cranealmente del tracto reproductivo, y se pueden encontrar ventrales a la tercera y quinta vértebra lumbar, suspendidos por la porción anterolateral del ligamento ancho (el mesovario). El ovario derecho está situado típicamente más cranealmente (dos o tres centímetros) que el ovario izquierdo (Allen, 1994; Youngquist y Threlfall, 2007; Brinsko et al., 2011).

2.3.2 Ultrasonografía

Para la determinación del estado del ciclo estral de la yegua, es fundamental evaluar las características morfológicas ultrasonográficas del endometrio.

Durante el estro, debido al aumento de los niveles plasmáticos de estrógenos, se pueden apreciar los pliegues endometriales, los cuales se vuelven edematosos, otorgando una imagen ultrasonográfica heterogénea, con características de ecogenicidad en la porción central de los pliegues y anecogenicidad en la porción periférica (Samper y Pycock, 2007).

Durante el diestro en yeguas normales, el dominio plasmático es de progesterona, por lo que los pliegues endometriales no se observan, y el útero generalmente tiene una imagen ultrasonográfica homogénea (Samper y Pycock, 2007).

Para valorar el grado de edema endometrial, se utiliza una escala ultrasonográfica (subjetiva) que consiste en una clasificación de 0 a 5 grados. Siendo grado 0 la ausencia de edema con ecogeneidad homogénea (característico de diestro). Los

grados 1,2, 3 y 4, corresponden a leve, moderado, evidente y máximo edema, definido por la heterogenicidad de los pliegues. Durante el estro el grado es de 3 a 4. El grado 5 corresponde a edemas anormales, generalmente asociados a patologías y acúmulos de fluidos en el lumen uterino (Samper y Pycock, 2007).

Luego de que los estrógenos alcancen su máximo nivel, y la yegua se aproxime a la ovulación, el grado de edema comienza a disminuir unas 12 a 24 horas pre ovulación (Samper, 2009).

2.3.3. Citología endometrial

La citología endometrial ha sido desarrollada por numerosos autores con la finalidad de diagnosticar inflamación endometrial y utilizarlo como un indicador de endometritis bacteriana en yeguas (Knudsen O., 1964; Asbury AS., 1984; Riddle WT et al., 2007). La técnica fue descrita a comienzos de la década del 1960 y desde entonces se ha convertido en una práctica de rutina para veterinarios que se dedican a la reproducción (Knudsen O., 1964). Numerosos estudios han relacionado la citología y la bacteriología con índices de preñez, observando que aquellas hembras que tenían inflamación uterina evaluada por citología tuvieron menores índices de preñez, en comparación con aquellas yeguas que presentaron una citología negativa normal (Riddle WT et al., 2007).

La citología consiste en la recuperación de células de la superficie endometrial mediante un hisopo, cepillo, o lavado con bajo volumen. Siendo importante que la muestra contenga un número suficiente de células morfológicamente intactas para un eficiente diagnóstico (Walter et al., 2012; Buczkowska et al., 2014).

Una vez obtenida la muestra, el hisopo o cepillo debe rodarse enseguida de forma suave por la superficie de un porta objetos. Posteriormente, dicha muestra debe fijarse y ser teñida con una técnica adecuada. Lo ideal es realizar el frotis inmediatamente para prevenir que las células se dañen en el hisopo (Le Blanc, 2011).

La técnica de tinción más utilizada es la llamada Diff-Quick® (Baxter Health Care, Miami, FL), la cual es una modificación de la técnica de tinción Wright (Dascanio et al., 1997; McKinnon, 2011).

Los preparados de citología obtenidos de yeguas normales presentan, células epiteliales sanas, con ausencia o muy limitada cantidad de células pertenecientes a la línea blanca sanguínea, y ausencia de hongos y bacterias. En contraparte, los preparados realizados a partir de yeguas con endometritis aguda o sub aguda, contienen un número elevado de neutrófilos y células epiteliales con apariencia no saludable (Brinsko et al., 2011).

Un método simple para evaluar citología endometrial es examinar al menos cinco campos al microscopio utilizando un objetivo de 40X y obtener un número promedio de neutrófilos (polimorfonucleares) por cada campo observado. Una muestra de citología tomada a partir de una yegua reproductivamente sana debe contener menos de un polimorfonuclear por campo. Muestras que presenten de uno a dos polimorfonucleares indican una inflamación leve, de tres a cuatro una inflamación moderada y 5 o más PMN hallados en un campo al microscopio son indicativos de una inflamación endometrial severa (Brinsko et al., 2011).

La citología endometrial generalmente se limita a identificar una respuesta inflamatoria aguda o subaguda, ya que los neutrófilos son componentes predominantes de una endometritis. Sin embargo, cambios sutiles del endometrio en una endometritis crónica, no son identificados con esta técnica (Brinsko et al., 2011).

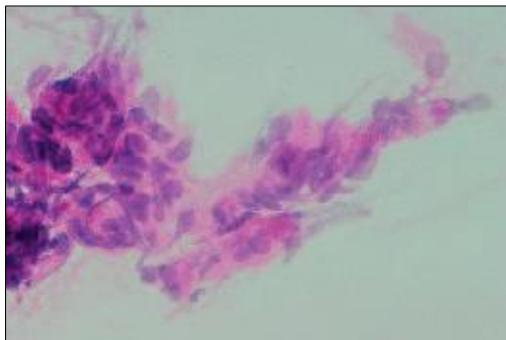


Figura 3. Imagen citológica del endometrio normal de una yegua teñido con la técnica de Panóptico Pappenheim, (Brinsko et al., 2011).

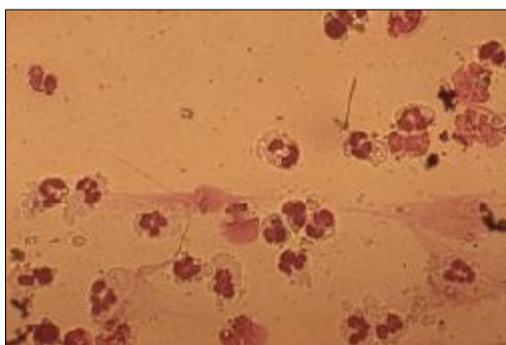


Figura 4. Imagen citológica del endometrio de una yegua con endometritis aguda teñido con la técnica de Hematoxilina eosina, (Brinsko et al., 2011).

2.3.4. Biopsia endometrial

Durante las décadas del 1960 y del 1970 la valoración clínica de la histopatología endometrial equina fue establecida firmemente luego de que se demostrara que esta estaba íntimamente relacionada con la severidad de lesiones microscópicas y por ende con los índices de preñez (Schlafer et al.2007).

La biopsia constituye el medio más eficiente de identificar la inflamación uterina y sus principales consecuencias tales como fibrosis y degeneración glandular (Love, 2011).

Varios métodos de evaluación endometrial incluyendo una categorización han sido descriptos. La idea de la categorización es poder resumir los hallazgos endometriales y relacionarlos con la potencial fertilidad de esa reproductora. Luego de la evaluación de la biopsia, y de la historia reproductiva de la yegua, esta es categorizada. La categorización I, II y III fue introducida por Kenney, basada en los grados de cambios patológicos del endometrio (Kenney, 1978). La categoría I, es considerada la de una yegua sana, siendo la categoría III la de más alto nivel de cambios patológicos, y aquellas yeguas con esta categorización tienen muy bajas probabilidades de poder

llevar una preñez a término. La categoría dos, es amplia, incluyendo aquellas yeguas cercanas a la categoría I y a la categoría III (Love, 2012).

La categorización detallada anteriormente, fue modificada posteriormente para agregar dos categorías más, IIA (cercana a I) y II (cercana a III) (Kenney, 1986; Doig et al., 1981).

2.4 Evaluación de padrillos para congelamiento de semen

Por el lado del semental, ocurre algo similar a las yeguas, ya que el criterio de selección para utilizar el semen de los reproductores como se mencionó anteriormente, no es la fertilidad que este tenga, sino más bien, el desempeño deportivo, líneas genéticas y relaciones afectivas del propietario. Existen sementales considerados buenos congeladores y otros malos congeladores (Samper y Hankins, 2001).

En líneas generales, se considera aceptable para congelar aquel eyaculado que presente las siguientes características: concentración espermática $\geq 200 \times 10^6$ spzs/ml, motilidad progresiva $> 40\%$ y $> 70\%$ de espermatozoides morfológicamente normales (Kalmar et al. 2014).

Los padrillos son catalogados como de buena o mala congelabilidad, en base a las características de su movilidad espermática post descongelación (Vidament et al., 1997; Ortega-Ferrusola et al., 2009; Hoffmann et al., 2011).

Según Losinno (2008), es de recalcar que, los médicos veterinarios deben ser quienes tomen las decisiones, basados en características reproductivas y así incrementar las probabilidades de éxito de los programas de inseminación artificial con semen congelado.

2.4.1 Valoración seminal

2.4.1.1. Evaluación macroscópica

Volumen

En primera instancia, en casos de que durante la colecta no se haya filtrado el gel, este debe ser filtrado durante el procesamiento seminal para poder extraer la fracción gel y/o algún material extraño. El filtrado se puede realizar mediante aspiración con una jeringa estéril, una cuidadosa decantación por medio de la filtración, o a través de un sistema incorporado a la vagina artificial (Dutra et al., 2013).

Una vez extraída la porción gel y los posibles contaminantes del semen, este debe colocarse en un recipiente estéril graduado para poder medir el volumen de dicha muestra. El volumen promedio producido por cada animal puede ser afectado por distintos factores, siendo uno de los factores el efecto de la estación reproductiva. Se encontraron diferencias de volumen de hasta un 50 % debido a la producción de gel, en estudios que compararon las colectas de semen durante la temporada reproductiva y no reproductiva (Estrada y Samper, 2006).

El grado de excitación sexual del padrillo y características individuales del animal, también son factores que influyen en el volumen del eyaculado (Davies Morel, 2005).

La frecuencia de las colectas, también puede afectar el volumen, aquellos reproductores a los que se les colecte muy frecuentemente van a mostrar una disminución en el volumen de la muestra. Sin embargo, no se deberían observar cambios significativos en el volumen gel-free de semen de caballos a los que se les

extrajo semen una vez con intervalo de 24 horas entre colectas (Estrada y Samper, 2006).

La edad, también afecta el volumen del eyaculado, así como condiciones patológicas tales como urospermia, piospermia y hemospermia (Estrada y Samper, 2006).

Es de particular interés destacar que, una correcta determinación del volumen es esencial para el cálculo del número total de espermatozoides eyaculados (NTE). Normalmente el volumen eyaculado por el padrillo es de 30 a 70 mL aproximadamente. Sin embargo, varía considerablemente pudiendo ser desde 20 a 250 mL (Davies Morel, 2005).

Color y apariencia

El color y la apariencia del semen se evalúan a simple vista, y normalmente es de un color blanco grisáceo y de aspecto lechoso, siendo otro tipo de colores indicadores de alteraciones. Patologías tales como vesiculitis, urospermia o hemospermia pueden ser detectadas fácilmente mediante una correcta evaluación visual macroscópica del eyaculado (Estrada y Samper, 2006).

pH

El pH óptimo del semen es 7.7 y, alteraciones de este valor afectan negativamente la motilidad espermática (Estrada y Samper, 2006).

2.4.1.2. Evaluación microscópica

Para la evaluación microscópica del semen es necesario observar la motilidad del semen puro y posteriormente diluido, para poder observar con mayor detalle los espermatozoides individualmente debido a que estos tienen tendencia a aglomerarse (Knottenbelt et al., 2003).

Motilidad

La motilidad espermática generalmente refleja la viabilidad del eyaculado (Brinsko et al., 2011).

La evaluación de la motilidad por parte de un operador, se considera subjetiva, y es por ello que existen métodos automatizados tales como el CASA (Computer Assisted Semen Analysis). Este método, consiste en una cámara de video conectada a un microscopio de contraste de fase y a una computadora que digitaliza las imágenes de los movimientos espermáticos. Este sistema, permite una evaluación objetiva de motilidad espermática y provee información sobre la motilidad progresiva y total, así como los parámetros de velocidad de las células. El movimiento de los

espermatozoides debe ser progresivo, siendo considerados anormales los movimientos oscilatorios o en círculos (Dutra et al., 2013).

Es de destacada importancia la temperatura durante la manipulación del semen, temperaturas muy bajas o muy elevadas pueden afectar la motilidad llevando a errores en la evaluación (Estrada y Samper, 2006).

Concentración

El número de espermatozoides producido por día por un padrillo normal está asociado a su tamaño testicular. La cantidad de espermatozoides producido aumenta con la edad, esto es debido a que los túbulos seminíferos se vuelven más largos y aumentan hasta un 30 % su tamaño durante la vida de un padrillo (Estrada y Samper, 2006).

En el semen equino, la concentración espermática oscila entre $30-600 \times 10^6$ espermatozoides por mililitro de semen (Davies, 2005). Para la determinación de la concentración espermática, es necesario tomar un volumen predeterminado de semen puro y mezclarlo con un volumen predeterminado de diluyente (formol salino buferado). La lectura puede ser realizada mediante un hematocitómetro (cámara de Neubauer®), espectrofotómetro, densitómetro o un método computarizado computarizado como el CASA o el Nucleocounter®.

El hematocitómetro es un método directo para el conteo de células seminales. Si bien, lleva más tiempo el análisis mediante este método, es considerado el más económico y confiable para contar espermatozoides (Estrada y Samper, 2006; Davies, 2005). Además, a diferencia del espectrofotómetro y el densitómetro los cuales evalúan la opacidad de fluido, el hematocitometro cuenta los espermatozoides directamente por lo que no nos va a dar valores anormales debido a la presencia de material no espermático (Davies, 2005).

Morfología

El examen morfológico es un método muy utilizado para la valoración de la fertilidad de un reproductor y consiste en la evaluación de los espermatozoides a partir de una muestra de eyaculado (Brinsko et al., 2011).

Se considera un padrillo con alta fertilidad, a aquel que presente eyaculados que contengan más del 60 % de sus espermatozoides normales, y menos del 5 % de anomalides de acrosoma y de pieza intermedia (Estrada y Samper, 2006).

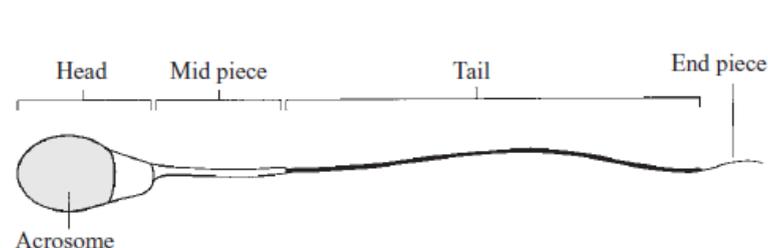


Figura 5. Estructura de un espermatozoide normal (England, 2005).

Citología

La evaluación de un frotis de semen para citología es una técnica muy útil y rápida para evaluar la presencia de polimorfonucleares (PMN) o células anormales en una muestra de semen. Un conteo de más de 6 neutrófilos por campo es indicativo de una infección (Estrada y Samper, 2006).

Evaluación de la membrana plasmática del espermatozoide

La evaluación de la membrana plasmática, se puede realizar a través de la evaluación de la funcionalidad de la misma a través de la técnica de “hypoosmotic swelling test, la cual evalúa la habilidad de los espermatozoides de adaptarse a cambios osmóticos, o a través de la evaluación de la integridad de la membrana (Estrada y Samper, 2006).

El estudio de la integridad de la membrana del espermatozoide, se ha vuelto en los últimos años de gran interés, debido a su fundamental importancia durante el proceso de fertilización. Para ello, se realizan extendidos sobre un porta objetos, y se evalúa posteriormente el porcentaje de espermatozoides vivos, a través de diferentes tinciones tales como eosina, eosina-nigrosina y tinciones fluorescentes tales como el diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), o SYBR-14 en conjunto con el yoduro de propidium (Brinsko et al., 2011).

2.5 Interacción entre los espermatozoides y el útero

Un número importante de espermatozoides mezclados con plasma seminal (PS) son eyaculados en el útero de la yegua, pero solo unos pocos alcanzan las trompas uterinas y uno solo será capaz de fecundar al ovocito. Una vez en el útero, los espermatozoides son rápidamente transportados hasta la unión útero-tubárica (UUT) en cuestión de minutos mediante contracciones uterinas miométricas. Los espermatozoides, inducen una respuesta inflamatoria uterina fisiológica, mediante la activación del complemento resultando en una poderosa señal quimiotáctica para los polimorfonucleares (PMNs), los cuales fagocitan espermatozoides y bacterias introducidos durante la inseminación artificial o monta natural. Finalmente, los espermatozoides destruidos, PMNs y subproductos de la inflamación son removidos del útero mediante el mecanismo conocido como "clearance uterino", a través del cérvix y vasos linfáticos, siendo para esto nuevamente necesarias las contracciones uterinas (Asbury et al., 1982; Watson et al., 1987; Katila, 2011; Fedorka et al., 2017).

Por lo tanto el útero tiene un doble rol, por un lado se encarga de transportar los espermatozoides de forma rápida a la UUT, pero a la vez se torna un ambiente hostil para el excesivo número de espermatozoides llevándolos a una rápida destrucción y eliminación junto a los contaminantes y mediadores de la inflamación. El procesamiento del semen para la inseminación artificial (IA) con semen refrigerado o congelado, como la dilución, centrifugación, refrigeración y o congelamiento probablemente modifique de alguna manera esta interacción entre los espermatozoides y el útero (Katila, 2011).

Los espermatozoides de mamíferos pueden fertilizar los ovocitos sólo luego de sufrir capacitación y reacción acrosomal. La capacitación es probablemente iniciada mediante el contacto de los espermatozoides con las secreciones uterinas durante su transporte espermático a través del útero. Por el contrario, factores de descapacitación presentes en el PS previenen la capacitación prematura de los espermatozoides prolongándoles la vida y esto probablemente ocurra debido a que estos factores le dan estabilidad a la membrana plasmática mediante una apropiada relación colesterol/fosfolípidos. Durante la capacitación los espermatozoides se liberan de estas moléculas que recubren su membrana plasmática, liberándose de los factores de descapacitación permitiendo que ocurra posteriormente la reacción acrosomal y fertilización del ovocito (Begley y Quinn, 1982).

Es por dicho motivo, que durante el proceso de crío preservación del semen equino, se extrae la mayoría del plasma seminal (Troedsson et al., 1995). La criopreservación pre-capacita a los espermatozoides, haciéndolos menos longevos (Alonso et al., 2016).

2.6 Transporte espermático

Una vez depositados los espermatozoides en el útero éstos son transportados por dos mecanismos, uno rápido en el cual en cuestión de minutos alcanzan la zona de la papila en la punta del cuerno uterino, el cual es debido principalmente a contracciones uterinas y otro más sostenido en el tiempo (de horas) el cual es probablemente responsable de la formación de los reservorios espermáticos tanto en el útero como en las trompas uterinas (Scott, 2000). Según Katilla (2011), es incierto si existe o no un reservorio de espermatozoides en el útero o si solo son almacenados de manera segura en la UUT y en el istmo oviductal.

A los 10 a 20 minutos luego de la IA, los espermatozoides de padrillos marcados con radioisótopos fueron detectados con una cámara de rayos gama en la punta de los cuernos uterinos (Katila et al., 2000). Es más que claro que los espermatozoides con motilidad progresiva no pueden alcanzar la punta de los cuernos por sus propios medios en ese periodo de tiempo, sin la ayuda de las contracciones uterinas. Por al menos, unos 30 minutos post IA existen contracciones uterinas constantes que mueven el semen hacia atrás y hacia adelante entre el cuerpo y los cuernos uterinos. Esto asegura una distribución uniforme de espermatozoides en todo el útero y simultáneamente comienza con el proceso de eliminación de éstos a través del cérvix por flujo retrogrado (Katila et al., 2000). En un estudio realizado por Fiala et al. (2008) las yeguas fueron sacrificadas 0,5, 1, 1,5 y 2 horas luego de la IA con 500×10^6 espermatozoides refrigerados a 4°C por 18 a 22 horas. Este trabajo determinó, que ya a los 30 minutos luego de la IA había espermatozoides en las trompas uterinas en el 67 % de las yeguas inseminadas. La tasa de yeguas con espermatozoides en sus trompas uterinas y el número de espermatozoides encontrados no varió entre los 30 minutos y las 2 horas post IA o entre la trompa uterina ipsilateral y el contralateral al folículo preovulatorio (Fiala et al., 2008). No se ha determinado, si los espermatozoides y/o el plasma seminal en el útero son los responsables de inducir las contracciones miométriales. El plasma seminal de los padrillos contiene oxitocina y prostaglandinas (Watson, 1999). De todas formas, es poco probable que los espermatozoides o el PS sean la clave en el desencadenamiento de las contracciones miométriales y parecería más un estímulo mecánico vaginal y cervical a la hora de la monta natural o de la IA. La manipulación cervical durante la IA o la presión vaginal por el pene del padrillo parecerían activar el sistema nervioso autónomo e interactuarían con los receptores adrenérgicos liberando oxitocina (Madill et al., 2000). De todas formas, parecería que estos mecanismos actúan de manera sinérgica y que tanto el semen como los estímulos mecánicos desencadenan las contracciones uterinas necesarias para un adecuado transporte espermático luego de la monta natural o de la inseminación artificial (Madill et al., 2000).

También fue demostrado que la habilidad de los espermatozoides provenientes de semen congelado de alcanzar las trompas uterinas, particularmente la región de la ampolla, es menor que la del semen fresco o refrigerado (Bader, 1982).

La eliminación de los espermatozoides del útero es rápida, comenzando a los 30 minutos luego de la IA, siendo eliminados casi la totalidad de los espermatozoides a las 4 horas post IA (Katila, 1995).

2.7 Selección espermática

Los requerimientos de entrada de los espermatozoides a las trompas uterinas son estrictos, deben presentar motilidad y morfología adecuadas y posiblemente la presencia de ciertas proteínas de superficie (Suarez y Pacey, 2006). Debido a que los espermatozoides dañados no consiguen entrar a las trompas uterinas por la selección de la UUT, su eliminación por fagocitosis no sería tan importante ya que estos serían removidos de todas formas por los mecanismos de limpieza uterinos de manera retrograda a través del cérvix (Katila, 2011). Troedsson et al. (2005) encontraron que dos proteínas presentes en el PS están relacionadas en el proceso de eliminación de los espermatozoides mediante los PMNs en caballos. Una de estas proteínas protege a los espermatozoides viables y no a los dañados de la fagocitosis de los PMNs, mientras que la otra promueve la unión y la fagocitosis de los espermatozoides muertos por parte de los PMNs (Troedsson et al., 2005).

La UUT es probablemente el mayor seleccionador y reservorio de espermatozoides en la yegua (Bader, 1994; Scott, 2000). El número de espermatozoides presentes en la UUT es claramente superior al encontrado en las demás áreas de las trompas uterinas (Bader, 1994). El contacto íntimo y la orientación de los espermatozoides con el epitelio de la UUT sugieren una especie de secuestro espermático por parte de las células de la UUT (Scott, 2000). Los espermatozoides residentes en la UUT se encuentran protegidos de los PMNs, mientras que los espermatozoides presentes en el útero se encuentran expuestos al ataque de los PMNS (Bader, 1994).

2.8 Interacción entre los espermatozoides y las trompas uterinas

La estricta selección de espermatozoides durante el transporte espermático parecería un mecanismo para reducir el riesgo de una fertilización poliespermática y para asegurar que la fertilización sea realizada por un espermatozoide de buena calidad que garantice un adecuado desarrollo embrionario posterior (Parker et al., 1975; Thomas et al., 1994; Scott et al., 2003). El estro prolongado de la yegua lleva a una adaptación de los espermatozoides a tener que sobrevivir por tiempos prolongados en el tracto genital de la hembra con intervalos rutinarios entre la cobertura y ovulación de 48 a 72 horas lográndose preñeces en algunos casos hasta 6 a 7 días post cobertura (Day, 1942).

En las yeguas, aproximadamente 4 horas post inseminación son requeridas para la creación de un adecuado reservorio de espermatozoides en las trompas uterinas que garantice buenos índices de preñez (Brinsko et al., 1991). Luego de este tiempo, en yeguas normales el lavado uterino no afecta las tasas de preñez, implicando que un buen número de espermatozoides ya alcanzó las trompas uterinas encontrándose en un ambiente seguro y formando una reserva de espermatozoides adecuada para la fertilización (Brinsko et al., 1991). En un estudio realizado por Samper (2015) donde se inseminaron 201 yeguas por inseminación profunda con semen congelado post ovulación utilizando dosis de entre 100 y 500 millones de espermatozoides en un máximo de 3 pajuelas de 0,5 ml se vió que las yeguas lavadas 1 hora post inseminación tuvieron las mismas tasas de preñez que las yeguas lavadas 4 horas post inseminación. Demostrando que la inseminación profunda aceleraría el transporte espermático, garantizando un número suficiente de espermatozoides en las trompas uterinas ya a la hora de inseminadas las yeguas (Samper, 2015).

Aunque todavía no está del todo establecido, parecería que la región del istmo y la UUT son los sitios anatómicos para el almacenamiento de espermatozoides en la yegua (Boyle et al., 1987; Scott et al., 2003). El epitelio del istmo de las trompas uterinas de las yeguas se encuentra formando pliegues longitudinales, y posee dos tipos celulares uno ciliado y otro sin cilios (Ball, 1996). La formación de los reservorios está caracterizada por la unión íntima de la cara rostral de la cabeza de los espermatozoides con las células epiteliales tanto del istmo como de la UUT (Boyle et al., 1987; Scott et al., 2003). Existen algunas evidencias que esta unión entre los espermatozoides y las células del epitelio producen cambios funcionales tanto en el espermatozoide como en la célula epitelial oviductal (CEO). La interacción sólo se da con los espermatozoides morfológicamente normales y con membrana plasmática íntegra, proceso importante para generar una elite de espermatozoides que participaran en el proceso de fertilización (Scott et al., 2003).

Parecería que la adhesión de los espermatozoides al epitelio previene la capacitación y prolonga la vida de los espermatozoides hasta el momento cercano de la ovulación (Ellington et al., 1993; Dobrnski et al., 1997). Por otro lado, esta adhesión estimula la secreción de ciertas proteínas por parte de las CEO importantes para el proceso de capacitación y reacción acrosomal necesario para una correcta fertilización del ovocito al momento de la ovulación (Thomas et al., 1995). Estas glicoproteínas parecen adherirse al espermatozoide permitiéndole la unión de éste a la membrana del ovocito. A diferencia de lo que ocurre en otras especies estas glicoproteínas no están definidas en el equino (Battut et al., 1995).

La capacidad de unión de los espermatozoides a las CEO parecía ser una diferencia que existe entre los padrillos fértiles y los subfértiles. En el caballo, como en otras especies, se detectaron ciertas proteínas del PS que están relacionadas con la fertilidad del padrillo y sobre todo con la capacidad de los espermatozoides de unirse a las CEO y formar el reservorio espermático oviductal. Varios estudios sugieren una menor capacidad del semen congelado de establecer reservorios de espermatozoides en las trompas uterinas, y esto explica en parte la menor fertilidad del semen congelado, junto con una menor sobrevivencia que explicaría la necesidad de tener que inseminar lo más cerca posible de la ovulación cuando se usa semen congelado equino (Dobrinski et al., 1995).

Con el objetivo de aumentar el número de espermatozoides de la reserva espermática algunos autores sugieren aumentar el número de servicios o de inseminaciones por ciclo antes de la ovulación para aumentar las tasas de preñez de aquellos padrillos subfértiles. En padrillos de la raza pura sangre de carrera (PSC) se demostró un efecto benéfico en las tasas de preñez de padrillos subfértiles cuando se comparó dos montas vs una monta por ciclo (Allen et al., 2007). Por otro lado, no se llegó a la misma conclusión en el uso de semen congelado existiendo trabajos con diversos resultados (Sieme et al., 2003). Claramente diversos factores influyen en estos resultados como ser el tipo y manejo de la inseminación o monta natural, efecto padrillo individual, tiempo del servicio o IA en relación a la ovulación, tipos de diluyentes, dosis utilizadas y fertilidad de las yeguas. De todas formas, algunas técnicas como acortar el periodo inseminación - ovulación, usar inseminaciones múltiples por ciclo probablemente sean estrategias útiles para el manejo de ciertos padrillos subfértiles (Allen et al., 2007).

2.9 Inseminación artificial en equinos

La inseminación artificial (IA) es una técnica que mejora notablemente la eficiencia reproductiva en la producción equina (Brinsko et al., 2011). Se puede realizar con semen fresco, refrigerado o congelado. Obteniéndose tanto para semen fresco como refrigerado las mismas tasas de preñez por ciclo (50-80 %), mientras que para el semen congelado las tasas son algo más bajas (30-50 %) (Love, C. 2012).

2.9.1 Historia

Los primeros relatos del uso de inseminación artificial en equinos datan del siglo XIV (Perry, 1968). Durante el año 1780, Spallanzani, reportó y documentó el éxito de esta técnica, siendo primero utilizada en caninos, para luego extenderse a los equinos. Durante el año 1799, Hunter en Estados Unidos y en 1885 Repiquet en Francia, habían realizado inseminaciones en yeguas (Morel, 1999),

En 1909, fueron inseminadas la primeras yeguas en Rusia, y en el año 1938, el Instituto Central de Inseminación Artificial de Moscú ya registraba 138.000 yeguas inseminadas artificialmente (Morel, 1999).

En el año 1957, Barker y Gandier, reportaron el nacimiento del primer potrillo a través de IA con semen congelado. Sin embargo, no fue hasta comienzos de este siglo que la IA comenzó a considerarse como una técnica de gran proyección en la producción equina. Una de las razones por las cuales en equinos no se ha logrado tal desarrollo, es debido a la conducta conservadora de muchos criadores, quizás influenciados por la política de una de las razas más difundidas y económicamente importante en el mundo, la Sangre Pura de Carrera (SPC), que prohíbe hasta el día de hoy, el uso de la IA y de la transferencia de embriones (Squires, 2009).

Actualmente existe una gran variedad de razas a nivel mundial que han sido mejoradas genéticamente a través de la inseminación artificial (Aurich, 2006). Dentro de las razas en las cuales se permite la aplicación de biotecnologías como la IA, se destaca la raza Cuarto de Milla, debido al alto número de potrillos concebidos a partir del uso de semen congelado, y que permite el uso de la técnica desde el año 2000 (Loomis y Squires 2005). Sin embargo, las yeguas inseminadas con semen congelado no superan el 10 %, situación distinta a lo que ocurre con el semen fresco y refrigerado, que se utiliza en un 40 y 50 % de las yeguas madres, (Squires, 2009).

En Uruguay, además de la razas cuarto de Milla, otras razas como Appaloosa, Paint Horse, Caballo Deportivo Uruguayo, Akhal-Teke, Percherón, Shetland Pony, la sociedad de criadores de caballos criollos (SCCC) y la sociedad de criadores de caballos árabes (SCCA), admiten actualmente y registran productos obtenidos a través de la inseminación artificial (Dutra et al., 2013).

2.9.2 Inseminación artificial con semen congelado

Los porcentajes de preñez promedio por ciclo para yeguas inseminadas con semen congelado son del 30 al 40 %. Algunos padrillos pueden tener porcentajes de preñez por ciclo del 50 al 70 %, mientras que con el semen congelado de otros padrillos no se logra obtener una preñez. Por lo que el rango de preñez puede oscilar entre 0 y 70 % de preñez por ciclo, encontrándose la mayoría de los padrillos entre el 30 y el 50 % de tasa de preñez por ciclo (Alonso et al., 2016).

2.9.2.1. Ventajas

El uso de semen congelado para la inseminación de yeguas ofrece ciertas ventajas al veterinario y propietario comparado con el semen refrigerado tales como:

- Los padrillos se pueden colectar en cualquier época del año, sin necesidad de ajustarla a las demandas del ciclo reproductivo de la yegua, permitiéndoles así utilizar los potros simultáneamente en reproducción y en competición (Schober et al., 2007).
- Resulta más económico, práctico y seguro el transportar un termo con nitrógeno líquido con grandes cantidades de dosis que permiten inseminar cientos de yeguas, que trasladar un padrillo (Losinno y Aguilar, 2002).
- La criopreservación del semen permite seguir utilizando padrillos después de haberse lesionado, o incluso después de muertos (Alonso et al., 2016).
- Es más fácil organizar los pedidos de semen, ya que se puede mantener durante un tiempo indefinido en el haras, además de permitir la importación de semen de padrillos de diferentes continentes (Alonso et al., 2016).
- Siempre hay semen disponible cuando la yegua está en el momento óptimo de fertilidad.
- Se desperdicia menos semen ya que todo el eyaculado puede ser procesado en forma de dosis inseminantes (Alonso et al., 2016).
- Se maximiza el uso de reproductores de elite y se reducen los riesgos de transmitir enfermedades venéreas (Miller 2008; Amann y Pickett 1984; Peña et al., 2011).

2.9.2.2. Frecuencia de inseminaciones por estro

Es difícil evaluar el efecto exacto del número de inseminaciones por estro sobre las tasas de preñez, ya que no es fácil separar este factor de otros “de confusión” como son el momento de la última IA relativa a la ovulación o el número de espermatozoides totales que se han introducido en la yegua en el mismo ciclo.

La evidencia científica, sugiere que no hay un efecto de mejora en las tasas de preñez por inseminar más de una vez en el mismo estro en comparación con una única

inseminación, siempre y cuando la última o única inseminación se haga durante la ventana de tiempo de 12 h antes y 12 h después de la ovulación y la dosis tenga un número adecuado de espermatozoides móviles. De esta forma las tasas de preñez no fueron diferentes en yeguas inseminadas dos veces (129/280; 46 %) 24 y 40 h post-hCG o una sola vez (120/255; 47 %) 6 h post-ovulación (Barbacini et al. 2005), con 800×10^6 espermatozoides totales por inseminación.

Del mismo modo, Sieme et al. (2003) observaron que la tasa de preñez fue igual en yeguas inseminadas dos veces (31/62; 50 %) o una sola vez dentro de las 12 h después de ovular (24/48; 50 %). En el grupo de yeguas inseminadas dos veces, la última IA al menos ocurrió entre 12 h antes y 12 h después de la ovulación.

Por otro lado, una frecuencia excesiva (por ejemplo más de dos inseminaciones) en el mismo estro puede ser perjudicial para las tasas de preñez (Clément et al., 2005).

Es probable que la reducción en la fertilidad en yeguas inseminadas múltiples veces sea debido a la mayor reacción inflamatoria uterina por la continua estimulación del semen. De este modo, sería recomendable inseminar solo una vez a las yeguas que tienen problemas de evacuación uterina (Clément et al., 2005).

2.9.2.3. Elección del momento de la inseminación

Respecto al momento de la IA relativo a la ovulación, existen estudios que describen y comparan si el inseminar a tiempo fijo a las 24 y 40 horas posteriores a la inducción de la ovulación tiene mejores tasas de gestación que inseminar una sola vez dentro de 12 horas antes o después de la ovulación (Watson, 2000; Barbaccini et al., 2005).

Los protocolos de inseminación con semen congelado con una única dosis por estro utilizan inseminaciones 6 a 12 horas post-ovulación, debido en parte a la baja viabilidad del semen congelado (aproximadamente 12 h) en el tracto genital de la yegua y/o a la existencia de un número de dosis limitado o muy caro, siendo este tipo de protocolo el único que asegura que el semen es depositado una vez se haya confirmado la ovulación y asumido la liberación del ovocito.

El manejo y el control de la yegua debe ser más exhaustivo en estos casos llegándose a ecografiar la yegua cada 6 a 8 horas, logrando tasas de gestación comparables con la inseminación 12 horas previo a la ovulación (Sieme et al., 2003). Sin embargo, cuando se trabaja de forma ambulatoria con distancias largas, no es fácil ecografiar a una yegua cada 6 a 8 horas.

Se considera conveniente inducir ovulación cuando la yegua presenta conducta de celo, edema uterino visible por ecografía, cérvix abierto a la palpación y un folículo mayor o igual a 35 mm.

Las hormonas empleadas para la inducción de ovulación pueden ser Gonadotrofina Coriónica humana (hCG) (1800 a 2500 UI EV), o análogos de GnRH (Factor liberador de gonadotropinas hipotalámico) como la deslorelina biorelease® (1ml IM) y análogos del Factor liberador hipotalámico de LH como la histrelina (0,5-1 mg IM). En la yegua, la hCG tiene acción principalmente LH e induce ovulación dentro de las 48 hs, más frecuentemente entre las 36 y 42 horas post-aplicación. La deslorelina y la histrelina inducen ovulación entre las 40 y 44 hs (Alonso et al., 2016).

A pesar de la evidencia científica que demuestra que el ovocito de la yegua puede permanecer viable durante 12-15 h post-ovulación (Koskinen et al., 1990) sin que haya realmente un aumento significativo en la tasa de muerte embrionaria respecto a las que hay en inseminaciones pre-ovulatorias (Newcombe y Cuervo-Arango, 2011; Newcombe et al., 2011), la mayoría de veterinarios clínicos alrededor del mundo que realizan IA post-ovulatoria utilizan un protocolo en el que el objetivo final de la IA con semen congelado es inseminar a la yegua lo antes posible después de ovular, generalmente 3-4 h después y en ningún caso más tarde de las 6 h post-ovulación (Newcombe y Cuervo-Arango, 2011; Newcombe et al., 2011).

La evidencia científica sugiere que la tasa de preñez y la de muerte embrionaria no son diferentes en yeguas inseminadas de 0 a 6 h y de 6 a 12 h tras la ovulación (Barbacini et al., 1999), por lo que se puede concluir que no se obtiene ninguna ventaja aparente al aumentar la frecuencia de exámenes ecográficos diarios más allá de dos veces al día (por ejemplo cada 12 h) con el fin de inseminar a una yegua con semen congelado en el periodo post-ovulatorio inmediato (por ejemplo < 4-6 h post-ovulación).

Cabe destacar que, en yeguas susceptibles a la endometritis post servicio con problemas de evacuación uterina (generalmente yeguas añosas con acumulo de fluido intrauterino), el retraso en la inseminación con respecto a la ovulación podría perjudicar sus ya comprometidas defensas uterinas. Por dicho motivo, es recomendable utilizar un tratamiento post coital rutinario más agresivo que el que se suele hacer en inseminaciones pre ovulatorias, aun cuando se inseminen yeguas reproductivamente sanas (Cuervo-Arango, 2015).

2.9.2.4 Efecto del lugar de inseminación

Las técnicas de inseminación con baja dosis en la yegua han sido desarrolladas para poder reducir el número de espermatozoides requeridos para lograr preñez y así lograr un uso más eficiente del semen congelado y del padrillo. La primera técnica fue descripta por primera vez en el año 1998 por Vázquez et al.

Se han reportado tres métodos para inseminación con baja dosis de espermatozoides: (1) transferencia intrafalopiana de gametos (GIFT), (2) inseminación profunda histeroscópica y (3) inseminación profunda en la punta del cuerno uterino utilizando una pipeta flexible. Este último método mencionado, reporta buenos resultados y permite prescindir de un equipo costoso como es el endoscopio y de la necesidad de hacer cirugía como en el caso de la GIFT (Alonso et al., 2016).

Aunque es muy difícil comparar resultados de preñez entre los diferentes estudios, debido a potenciales diferentes de fertilidad de las yeguas, padrillos, experiencia profesional, todo hace indicar que la deposición del semen cerca de la UUT tiene resultados similares que la canulación de la UUT por medio de un catéter a través de un endoscopio. Las dos técnicas permiten reducir drásticamente las dosis inseminantes sin afectar las tasas de preñez. Se puede alcanzar tasas aceptable de preñez con dosis de semen fresco que van de 1 a 25×10^6 de espermatozoides con motilidad progresiva en volúmenes de 20 a 1000 μ l. Estudios controlados que compararon estas dos técnicas utilizando la misma población de yeguas y de padrillos demostraron que no hay diferencias en la tasa de preñez cuando se inseminan con 5×10^6 espermatozoides con motilidad progresiva con (MP) refrigerados por 24 horas (Brinsko et al., 2003). Si la dosis inseminante baja a 1×10^6 espermatozoides con MP la

tasa de preñez parecería ser más alta con un histeroscópio que con la inseminación profunda con pipeta flexible guiada tranrectalmente (Morris et al., 2000).

Si la dosis inseminante es $> 100 \times 10^6$ espermatozoides con MP, es poco probable que las técnicas de inseminación con baja dosis mejoren la tasa de preñez comparada con la inseminación en el cuerpo del útero. Sin embargo, si la dosis inseminante contiene $< 50 \times 10^6$ espermatozoides con MP en bajo volúmenes entonces si parecería haber una ventaja en las técnicas de inseminación profunda sobre la inseminación tradicional en el cuerpo del útero en lo que a tasa de preñez se refiere (Lyle y Ferrer, 2005). Varias circunstancias demandan la utilización de un bajo número de espermatozoides por inseminación como ser pocas dosis disponibles de semen congelado, precios altos por dosis inseminante de semen congelado y la industria del semen sexado.

Otras áreas donde tiene relevancia la utilización de estas técnicas son en la utilización de padrillos oligospermicos, yeguas con problemas de evacuación uterina y utilización de semen proveniente de colas de epidídimos.

2.9.2.5 Efecto de la dosis (número de espermatozoides) de la IA en las tasas de preñez

La determinación de la motilidad espermática es el parámetro más utilizado en la práctica veterinaria como indicador de fertilidad, sin embargo, no siempre es correcto, ya que en este tema existen muchas otras características de los espermatozoides que juegan un rol importante al momento de la fecundación como la integridad del ADN, integridad acrosomal, integridad y funcionalidad de la membrana plasmática, estado mitocondrial, moléculas presentes en la membrana plasmática y acrosomal, entre otras (Varner, 2008).

No existe una dosis estándar de IA para semen congelado recomendada que se haya evaluado críticamente en el caballo, en parte debido a la falta de estandarización de criterios en la bibliografía publicada al respecto para reportar la dosis de semen utilizada; algunos estudios aportan datos del número total de espermatozoides sin el porcentaje de motilidad progresiva y otros el número de espermatozoides móviles progresivos por IA. Estas razones, sumado a que la mayoría de los estudios científicos no suelen controlar el efecto de otros factores “de confusión” (método de procesamiento, factor yegua, factor padrillo, etc.), sobre todo en aquellos que tienen un tamaño de muestra considerable, hace difícil una comparación crítica de los mismos.

En un esfuerzo para uniformizar el número total de espermatozoides por dosis, la Federación Mundial para la Cría de Caballos de Deporte (www.wbfs.org) ha establecido un estándar para dosis de semen congelado entre países miembros que implica el uso de una dosis de inseminación con un mínimo de 250×10^6 espermatozoides móviles progresivos, con un porcentaje de motilidad progresiva después de la descongelación de por lo menos 35 %. Sin embargo, se sabe que en muchos casos esta dosis excede con creces el número mínimo de espermatozoides requeridos para llegar a la máxima fertilidad propia de cada padrillo, que por otro lado es una buena práctica de actuación, siempre y cuando la disponibilidad del semen no sea un factor limitante. Por ejemplo, un estudio (Sieme et al., 2004) no mostró diferencia significativa en las tasas de preñez por ciclo en yeguas inseminadas en el

cuerpo uterino con 100×10^6 (55/123, 45 %) u 800×10^6 (9/21; 43 %) espermatozoides totales con más de 35% motilidad progresiva a partir de 17 padrillos diferentes, distribuidos de forma uniforme entre ambos grupos. Sin embargo, estudios posteriores sí demostraron una diferencia significativa en las tasas de preñez entre yeguas inseminadas en el cuerpo uterino con 50×10^6 (11/39, 26 %) o 400×10^6 (19/39; 46 %) de espermatozoides totales a partir de 4 padrillos diferentes (Clément et al., 2005), o entre inseminaciones con 137×10^6 (14/35; 40 %) o 27×10^6 (5/35; 14 %) de espermatozoides móviles progresivos en el cuerpo uterino (Govaere et al., 2014).

Estas diferencias entre estudios demuestran la existencia de un umbral mínimo de espermatozoides totales por debajo del cual la fertilidad se ve comprometida, pero también sugieren que ese umbral no es igual para todos los padrillos y por tanto no se puede generalizar, ya que es probable que haya variaciones individuales. De este modo, Morris et al. (2003) demostraron que es posible obtener tasas de preñez aceptables (63 %) después de inseminar yeguas en el cuerpo uterino con tan solo 14×10^6 espermatozoides móviles progresivos de dos padrillos de alta fertilidad. En estos padrillos, el umbral de la dosis de espermatozoides se observó muy por debajo de lo esperado, ya que la fertilidad no bajó al 15 % por ciclo, hasta reducir la dosis de inseminación a 3×10^6 espermatozoides móviles progresivos (Morris et al., 2003)

2.9.3 Procedimientos post inseminación artificial con semen congelado

La evaluación post inseminación debe realizarse dentro de las primeras doce horas de haberse depositado el semen en la reproductora (Samper et al., 2001). Los manejos post inseminación, involucran un monitoreo ultrasonográfico y tratamientos uterinos, que son fundamentales cuando se utiliza semen congelado, para confirmar que la reproductora haya ovulado y confirmar que no esté acumulando fluidos (Samper et al., 2001), ya que algunas yeguas pueden presentar una excesiva respuesta inflamatoria uterina, provocando una disminución de los índices de preñez o fallas en el desarrollo embrionario (Dell' Aqua et al., 2006).

Este monitoreo es particularmente importante en yeguas añosas, con clearance uterino retardado, y en yeguas susceptibles a endometritis (Samper et al., 2001). Los tratamientos apropiados en estos casos son: lavados uterinos con solución fisiológica o suero ringer lactato, infusiones intrauterinas con antibióticos, asociados con la administración de fármacos ecbólicos como la oxitocina y cirugía de Caslick. Siendo aplicado cada uno de ellos, dependiendo del grado de inflamación que se presente (Miller 2008, Samper et al., 2001, Hurtgen 2006, Liu y Troedsson, 2008).

Según Samper y Hankins (2001), no es necesaria la aplicación de terapias de forma generalizada en todas aquellas yeguas post inseminación artificial con semen congelado, sino que las reproductoras deberían ser tratadas según sus signos clínicos y su historia reproductiva.

Los tratamientos uterinos se pueden utilizar sin problemas desde cuatro horas post inseminación convencional en el cuerpo uterino, tiempo en el cual la migración de los espermatozoides a las trompas uterinas ha ocurrido (Brinsko et al., 1991).

3. HIPÓTESIS

La inseminación profunda disminuye el tiempo de transporte espermático, asegurando una colonización máxima de las trompas uterinas en un tiempo reducido.

4.OBJETIVOS

4.1 General

Contribuir al conocimiento y a la eficiencia de la inseminación artificial con semen congelado en equinos, a través del estudio del transporte espermático.

4.2 Específicos

Los objetivos específicos de este experimento fueron determinar como la dosis y el sitio de inseminación afectan el transporte espermático a las 2, 4 y 12 hs luego de la IA con semen congelado

5.5.MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar y momento donde se realizó la investigación

El experimento fue llevado a cabo en el frigorífico equino SAREL SRL ubicado en el departamento de Canelones, Uruguay (34°S, 56°O), en el periodo de tiempo comprendido entre el mes de octubre de 2014 y marzo de 2017. Se trabajó durante tres temporadas reproductivas (2014-2015; 2015-2016; 2016-2017).

5.2 Animales utilizados en la investigación

Fueron utilizadas 89 yeguas cíclicas de una población destinada a faena, con condición corporal mínima de 3 (Hennecke et al., 1983, modificada por Malschitzky, 1998), clínicamente saludables y con ausencia de neutrófilos a la citología endometrial (Mattos et al., 1984). Comportamiento de celo, tono uterino y cérvix compatible con estro, útero con edema y folículo preovulatorio de más de 35 mm de diámetro.

Para la obtención de semen para congelamiento e IA con semen congelado se utilizó un padrillo de raza pura sangre de carrera, comprobadamente fértil, de 8 años de edad, saludable y con buena condición corporal. La selección de dicho padrillo se basó en que presentaba buena congelabilidad (motilidad progresiva post descongelado > 40 %), y buenas tasas de preñez con semen congelado (Vidament, 2005; Sieme, 2011).

5.3 Examen ginecológico

Todas las yeguas utilizadas en el experimento fueron sometidas a un examen ginecológico previo a su inclusión en los grupos experimentales (Mattos et al., 1984).

El día previo a la faena, las yeguas fueron sometidas a palpación rectal y ecografía, donde fueron considerados el tono y eco textura del útero y cérvix, contenido uterino y actividad ovárica (Curnow., 1991). Las yeguas cíclicas que tenían ausencia de contenido uterino y que presentaron imagen ecográfica uterina compatible con celo, tono uterino y de cérvix compatible con celo, ausencia de cuerpo lúteo funcional y folículos igual o superior a 35 mm de diámetro fueron seleccionadas para el experimento.

El examen citológico del lumen uterino fue realizado luego de una limpieza del área perineal con agua potable y detergente neutro (mínimo tres veces), seguido de una limpieza con una solución jabonosa líquida a base de clorhexidina al 2 %. Posteriormente, se enjuagó de manera profusa la región anteriormente lavada y se secó con un papel de cocina con extremo cuidado para evitar la entrada de agua a la vagina.

Una vez higienizada la región perineal se procedía a tomar las muestras de citología uterina mediante el uso de cepillos citológicos (Citobrush®), Juvaquez, España), utilizando el dispositivo para toma de muestras citológicas de Botupharma (San Pablo,

Brasil), evitando la contaminación de las mismas por el ambiente vaginal y cervical (Mattos et al, 1984).

Luego de colectadas las muestras, se hacía rodar el cepillo citológico suavemente sobre la superficie de un porta objeto, se dejaba sacar y se coloreaba con la tinción de Panóptico Pappenheim (Diff Quik®, Baxter Health Care, Miami, FL) para posteriormente evaluarlo microscópicamente en búsqueda de neutrófilos. Se incluyeron en este estudio solo aquellas reproductoras que no presentaron neutrófilos al momento del examen citológico.

5.4 Colecta y procesamiento de semen

El semen fue colectado con vagina artificial modelo Hannover (Götze1949; Klug, 1982). Luego de la colecta los eyaculados fueron diluidos y evaluados en cuanto a motilidad, concentración y morfología espermática. Aquellos eyaculados que reunieron las características aceptables, concentración espermática $\geq 200 \times 10^6$ spzs/ml, motilidad progresiva $> 40 \%$ y $> 70 \%$ de espermatozoides morfológicamente normales fueron procesados para su congelamiento (Kalmar et al. 2014). El semen fue congelado en pajuelas de 0,5 mL a una concentración de 100×10^6 espermatozoides por mililitro (50 millones por pajueta) utilizando un diluyente comercial (Botucrío®, Botufarma, Brasil). El congelamiento fue realizado respetando las indicaciones del fabricante de dicho diluyente y según lo descrito por Papa et al. 2008. Solo se utilizaron en este proyecto aquellos eyaculados que tuvieron $>40\%$ de motilidad progresiva post descongelado al CASA (Androvision, Minitub, Brasil). Las muestras para inseminación fueron descongeladas en baño maría a 37°C por 30 segundos y solo se utilizaron aquellas muestras que tenían $>$ de 40% de espermatozoides con motilidad progresiva post descongelamiento. Las muestras descongeladas fueron evaluadas subjetivamente con un microscopio de luz con contraste de fase y platina térmica a 37°C cada vez que se inseminaba una yegua.

5.5 Diseño experimental

Las yeguas seleccionadas fueron aleatoriamente inseminadas en el cuerpo del útero (B) o en la punta del cuerno ipsilateral al folículo dominante (T) con una pajueta de 0,5 mL (50×10^6 espermatozoides totales) o con ocho pajuelas de 0,5mL (400×10^6 espermatozoides totales). Una vez inseminadas las yeguas fueron humanitariamente sacrificadas a las 2, 4 y 12 horas post inseminación conformando los siguientes grupos experimentales: B50 (2h, n=6; 4h, n=6; 12h, n=7); T50 (2h, n=12; 4h, n=9; 12h, n=8); B400 (2h, n=8; 4h, n=6; 12h, n=6) y T400 (2h, n=7; 4h, n=7; 12h, n=7)

A continuación, se presenta el diseño experimental realizado en la presente investigación.

Tratamiento Lugar de la IA	NTE (X10 ⁶)	Vol. (mL)	N° Pajuelas	Spzs/pajuela (x 10 ⁶)	Yeguas		
					2h	4h	12h
B	50	0.5	1	50	6	6	7
T	50	0.5	1	50	12	9	8
B	400	4	8	50	8	6	6
T	400	4	8	50	7	7	7
Total de yeguas					89		
Total de pajuelas	-	-	376	-	-		
NTE	18800	-	-	-	-		

*B = cuerpo uterino; T = punta del cuerno ipsilateral al folículo dominante; NTE = número total de espermatozoides; SPZS = espermatozoides; IA = inseminación artificial.

5.6 Faena

Las yeguas sometidas a los diferentes tratamientos fueron abatidas de forma humanitaria a las 2, 4 y 12 horas post inseminación artificial con semen congelado.

5.7 Colecta y procesamiento de muestras

Luego del sacrificio, los órganos reproductivos completos (cérvix, útero, trompas uterinas y ovarios) fueron recuperados e identificados al momento de retirada de las vísceras, en la línea de faena. Las trompas uterinas ipsilateral al folículo dominante fueron separados del útero y lavados con 1 mL de solución buffer fosfato (PBS) con 0,1% de sodium dodecyl sulfate a partir del infundíbulo hacia la unión útero tubárica.

El lavado se realizó introduciendo un catéter corto 18G acoplado a una jeringa a través del infundíbulo. Luego se escurría el líquido manualmente hasta ser recuperado en su totalidad en tubos eppendorf para su posterior análisis.

Una vez obtenido el contenido del lavado oviductal, se tomó una muestra representativa del mismo para su evaluación en una cámara de Neubauer® con el fin de obtener el conteo de espermatozoides presentes en el lavado.

5.8 Registro de datos de las yeguas

Se realizó una planilla de datos para cada yegua conteniendo la identificación de la yegua, la fecha de faena, peso corporal, examen ginecológico y datos sobre la dosis y el lugar de inseminación.

5.9 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando ANOVA, considerándose la dosis, el tiempo y el lugar de inseminación como variables independientes y el número de espermatozoides recuperados de las trompas uterinas como variable dependiente. Probabilidades < 0.05 fueron consideradas como significativas.

6.RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la presente investigación mostraron que, el número medio de espermatozoides recuperados de las trompas uterinas ipsilateral al folículo dominante se vio influenciado por el lugar de inseminación y por el número total de espermatozoides inseminados.

6.1 Relación entre el lugar de inseminación y el número de espermatozoides encontrados en las trompas uterinas a las 2, 4 y 12 horas post inseminación

La figura 6 (A), nos muestra que existió una tendencia ($P=0,070$), a favor de la inseminación en la punta del cuerno a las 2 horas post inseminación y que un mayor número de espermatozoides alcanzaron las trompas uterinas si se lo compara con la inseminación en el cuerpo uterino independientemente de la dosis inseminante ($p=0,025$). Sin embargo, el número promedio de espermatozoides recuperados de las trompas uterinas ipsilateral al folículo dominante fue similar en todas las horas evaluadas independientemente de la dosis ($p=0,175$) y sitio ($p=0,230$) de inseminación (Fig. 6A y 6B).

6.2 Relación entre la dosis inseminante y el número de espermatozoides encontrados en las trompas uterinas ipsilateral al folículo dominante a las 2, 4 y 12 horas post inseminación

La figura 6 (B), nos presenta que independientemente del lugar de inseminación, la dosis inseminante de 400×10^6 espermatozoides ($p < 0,001$) tuvo un mayor número de espermatozoides recuperados de las trompas uterinas (mayor transporte espermático). Siendo esta diferencia evidente a las 4 y 12 horas post inseminación, en comparación con la dosis de 50×10^6 espermatozoides. Si bien a las 2 horas también hubo un mayor transporte espermático cuando se inseminó con la dosis mayor, la diferencia no fue significativa ($p \geq 0,05$).

6.3 Efecto del sitio y dosis de inseminación sobre el transporte espermático independientemente del tiempo post inseminación

En la figura 6 (C), se aprecia que hay diferencias significativas en el transporte espermático hasta las 12 horas post inseminación cuando se compara la dosis inseminante, siendo mayor cuando se insemina con 400 millones que cuando se inseminó con 50 millones ($p < 0,001$), independientemente del lugar de inseminación y del tiempo post inseminación. También, muestra que cuando inseminamos con dosis bajas de 50 millones de espermatozoides hay diferencias en el transporte espermático cuando se compara el sitio de la inseminación. Siendo mayor cuando inseminamos en la punta del cuerno que cuando inseminamos en el cuerpo uterino ($p = 0,006$). No se recuperaron espermatozoides de los lavados de las trompas

uterinas cuando se inseminó con 50 millones en la mitad del cuerpo uterino. Mientras que no se observó diferencia en el transporte espermático al inseminar en la punta del cuerno o en el cuerpo uterino cuando se utilizaron dosis de 400 millones de espermatozoides totales ($p > 0,05$).

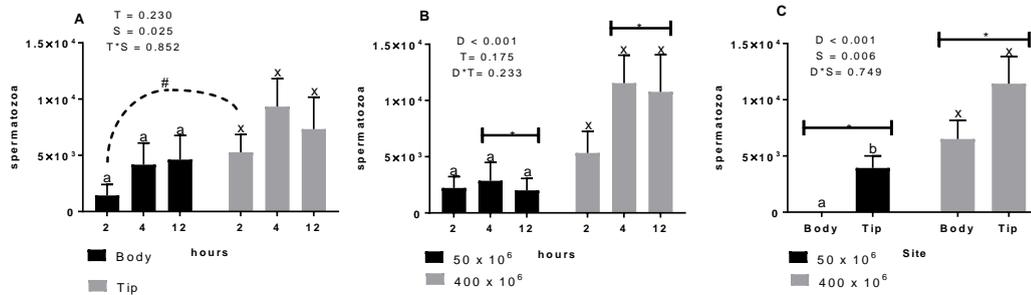


Figura 6. Media de espermatozoides \pm D.S. relacionado al (A) Sitio de inseminación y tiempo; (B) Dosis inseminante y tiempo; (C) Dosis inseminante y sitio. (*) Representa diferencias ($P < 0.05$) entre los grupos (a,b) y (x,y) representa diferencias $P < 0.05$ dentro de los grupos, (#) representa una tendencia entre grupos ($P = 0.070$). T= tiempo, S= sitio, D= dosis.

7.DISCUSIÓN

Cuando evaluamos el efecto tiempo en relación al transporte espermático con semen congelado podemos decir que está prácticamente completo a las 4 horas post inseminación cuando se insemina en la punta del cuerno. Cuando la inseminación es en el cuerpo del útero, sobre todo con dosis y volúmenes bajos como los utilizados en este experimento el transporte espermático es algo más lento llevándole más tiempo el completarse. Esto se puede apreciar en la figura 6 (A) cuando inseminamos en el cuerpo del útero donde el promedio del número de espermatozoides recuperados fue aumentando de las 2 a las 12 horas post inseminación, no encontrándose diferencias significativas entre las distintas horas de evaluación.

También, pudimos observar que hay diferencias en la dosis y en el lugar de inseminación en lo que al transporte espermático se refiere. Cuando utilizamos dosis altas (400×10^6), el lugar de la inseminación no fue importante, ya que no obtuvimos diferencias en el número de espermatozoides recuperados de las trompas uterinas de las yeguas inseminadas en la punta del cuerno o en el cuerpo del útero ($p > 0,05$), dentro de las primeras 12 horas post inseminación (Fig. 6, C). Mientras que cuando usamos dosis bajas (50×10^6), sí importó el lugar de la inseminación, habiendo diferencias significativas en el número de espermatozoides recuperados de las trompas uterinas entre las yeguas inseminadas en la punta del cuerno y las inseminadas en el cuerpo del útero ($p = 0,009$) dentro de las primeras 12 horas post inseminación (Fig. 6 C). Inseminando con 50×10^6 en la punta del cuerno se tuvieron mayor número de espermatozoides de las trompas uterinas que en las yeguas inseminadas con 50×10^6 en el cuerpo del útero en las cuales no se pudo recuperar ningún espermatozoide en ninguna de las horas evaluadas (Fig. 6, C). Mientras que inseminaciones con dosis estándar de 250 a 350×10^6 de espermatozoides con motilidad progresiva en el cuerpo del útero y en la punta del cuerno resultaron en una misma cantidad de espermatozoides recuperados de la trompa uterina ipsilateral al folículo dominante 1 a 2 horas post inseminación (FÊO et al., 1992). Esto concuerda también con lo expuesto por Leão et al., (2006) quienes demostraron que la inseminación en la extremidad del cuerno uterino fue más eficiente que la inseminación en el cuerpo del útero con la utilización de un número reducido de espermatozoides equinos.

El efecto dosis fue el que tuvo mayor impacto en el transporte espermático si lo comparamos con el lugar de la inseminación. Se encontró mayor cantidad de espermatozoides en las trompas uterinas cuando inseminamos con dosis mayores (400×10^6), que cuando inseminamos con dosis menores (50×10^6) tanto en el cuerpo ($P = 0,006$) como en la punta del cuerno ($p = 0,025$) sobre todo a las 4 y 12 horas post inseminación (Fig. 6, B y C). Esto concuerda con lo encontrado por Fiala et al. (2007) quienes concluyeron que el transporte espermático hasta las 4 horas no está influenciado por la concentración o el un número total de espermatozoides de la dosis inseminante y si por las contracciones uterinas encargadas del transporte rápido de los espermatozoides hacia la unión útero tubárica.

Por otra parte, la inseminación artificial profunda demostró tener mejores tasas de preñez que la inseminación artificial convencional en el cuerpo uterino solo cuando se usaron dosis bajas de espermatozoides (Squires 2002; Morris et al., 2002; Morris et al., 2003; Leão et al., 2006). Mientras que inseminaciones con dosis $> 250 \times 10^6$ de

espermatozoides con motilidad progresiva en el cuerpo del útero y en la punta del cuerno resultaron en tasas de preñez similares (Sieme et al., 2004). Esto se confirma con los datos obtenidos en este trabajo, donde se recuperaron mayor número de espermatozoides de las trompas uterinas de las yeguas inseminadas con 50×10^6 (dosis baja) en la punta del cuerno que cuando se inseminó con la misma dosis en el cuerpo del útero, mientras que esta diferencia no fue observada cuando se utilizó una dosis mayor de 400×10^6 en el cuerpo del útero o en la punta del cuerno (Fig. 6, C). Por lo que el lugar de la inseminación no sería un factor crítico cuando utilizamos dosis estándar de $> 400 \times 10^6$ espermatozoides totales en lo que concierne al transporte espermático.

Al igual que Rigby et al. (2000) y Leão et al. (2006), también vimos que un mayor número de espermatozoides pasan a través de la unión utero-tubárica ipsilateral al folículo dominante cuando el semen es depositado en la punta del cuerno que cuando es depositado en el cuerpo del útero (Fig. 6, A y C).

Otro punto importante, es que la inseminación artificial profunda acelera el transporte espermático y aumenta el número de espermatozoides morfológicamente normales que alcanzan las trompas uterinas en un menor período de tiempo. Esto, está demostrado en la figura 6 (A) donde la diferencia es más apreciable a las 2 horas post inseminación que a las 4 y 12 horas post inseminación. Esto reafirma lo hallado por Samper (2015), que demostró que cuando las yeguas son inseminadas post ovulación a través de inseminación profunda las tasas de preñez no se vieron afectadas cuando se realiza un lavado uterino tan pronto como 1 hora post ovulación. Esto permitiría realizar lavajes tempranos que permitan reducir el tiempo de contacto de los espermatozoides con el útero, y por lo tanto reducir el periodo de tiempo para que la yegua genere una reacción inflamatoria sin afectar las tasas de preñez. Esto es importante al inseminar yeguas subfértiles que tengan comprometida la contractilidad uterina que es la encargada del transporte rápido de los espermatozoides hacia la unión útero-tubárica en las primeras 2 horas post inseminación. Sobre todo en las yeguas que se inseminan con más de 4 horas post ovulación donde además de tener comprometido el transporte espermático y la limpieza uterina se le suma el cerramiento del cérvix por los efectos de la progesterona. Vale la pena mencionar que, en el presente estudio sólo se utilizaron yeguar reproductivamente sanas y que estos resultados no se podrían transpolar a yeguas con problemas reproductivos. Scott y Liu (1995 y 2000), encontraron un número menor de espermatozoides en las trompas uterinas de yeguas susceptibles a endometritis crónica comparado con yeguas reproductivamente normales 4 horas luego de la inseminación artificial. Mientras que Rigby et al. (2000), no encontraron diferencias en el transporte espermático entre yeguas con problemas de evacuación uterina y yeguas normales a las 18 horas post inseminación. Es posible que las yeguas susceptibles a la endometritis post servicio requieran más tiempo para transportar los espermatozoides hasta la unión útero tubárica que lo requerido por las yeguas sin problemas reproductivos debido probablemente a una menor capacidad de contractilidad uterina en las yeguas con problemas reproductivos. En yeguas normales fuertes y frecuentes contracciones miométricas son provocadas 8 a 30 minutos post inseminación, siendo estas contracciones las encargadas del transporte rápido de los espermatozoides a las trompas uterinas (Katila et al., 2000). Este sistema rápido de transporte espermático seguramente este comprometido en yeguas con problemas de evacuación uterina u otros problemas reproductivos.

En conclusión, la inseminación artificial profunda viabiliza la utilización de un número bajo de espermatozoides por inseminación, posibilitando a la industria del semen congelado maximizar su uso, pudiendo preñar más yeguas por eyaculado congelado. Por otra parte, se vio que dosis bajas de semen congelado menores a 50×10^6 espermatozoides totales no son recomendadas para su utilización en el cuerpo del útero ya que un número insuficiente de espermatozoides alcanzan la trompa uterina ipsilateral al folículo dominante en las primeras 12 horas post inseminación.

8.CONCLUSIONES

El número medio de espermatozoides recuperados de las trompas uterinas ipsilateral al folículo dominante se vio influenciado por el lugar de inseminación y por el número total de espermatozoides inseminados.

1. La inseminación artificial en la punta del cuerno ipsilateral al folículo dominante resultó en un mayor porcentaje de espermatozoides recuperados de la trompa uterina ipsilateral al folículo dominante si lo comparamos con la inseminación artificial tradicional en el cuerpo del útero.
2. La inseminación artificial en la punta del cuerno uterino fue más eficiente que la inseminación en el cuerpo del útero cuando se inseminó con un número reducido de espermatozoides. Cuando se utilizan dosis tradicionales de 400×10^6 espermatozoides totales el lugar de la inseminación no parecería ser crítico pero si cuando se utilizan dosis bajas de 50×10^6 espermatozoides totales.
3. La inseminación artificial en la punta del cuerno acelera el transporte espermático.
4. La dosis inseminante si afectó el transporte espermático. No se recomienda la inseminación artificial en el cuerpo del útero con $< 50 \times 10^6$ (baja dosis) ya que no se alcanza un número suficiente de espermatozoides en las trompas uterinas en las primeras 12 horas post inseminación.
5. Existe una correlación positiva entre el número de espermatozoides inseminados y el número de espermatozoides recuperados de la trompa uterina ipsilateral al folículo dominante. El mejor resultado fue obtenido con la inseminación profunda de 400×10^6 en la punta del cuerno y el peor resultado fue inseminar con 50×10^6 en el cuerpo del útero.
6. La inseminación artificial con 400 millones de espermatozoides resultó en el mayor porcentaje de espermatozoides recuperados de la trompa uterina ipsilateral al folículo dominante (mayor transporte espermático) independientemente del sitio de la inseminación.

Estos resultados fueron obtenidos de yeguas clínicamente y reproductivamente sanas enviadas al frigorífico sin historia reproductiva previa.

9.ANEXO

Journal of Equine Veterinary Science

Volume 66, July 2018, Pages 109-110

Insemination dose and site with frozen semen affects the sperm transport and inflammatory response in mares?

N. Cazales^{a,b,d*}, S.M. Fiala-Rechsteiner^c, G.H.Z. Winter^a, D. Cavestany^b, R.C. Mattos^a

^a REPROLAB – Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre - RS, Brazil.

^b Facultad de Veterinaria – UDELAR, Montevideo, Uruguay.

^c Historep - Instituto de Biologia, UFPEL, Pelotas - RS, Brazil

^d Bolsista CAPES/UDELAR

1. Introduction

Post-breeding inflammation is a physiological process that is elicited in the uterus of mares in response to the presence of spermatozoa [1]. The duration and severity of this inflammatory reaction is a critical factor in determining the ability of the mare to become and stay pregnant. Sperm were found in the oviducts as soon as 30 minutes after insemination [2]. However, pregnancy rate was lowered when mares' uterus were flushed within 2h after artificial insemination (AI), while the uterine lavage performed at 4h post insemination had no adverse effect on fertility [3].

A retrospective study in 2002 [4] demonstrated that 85.4% of the doses used in more than 2000 inseminations had between 400 and 500 million sperm frozen in 0.5 straws, and the insemination site was the uterine body. However, in the last years insemination in the tip of the uterine horn ipsilateral to the pre-ovulatory follicle gained popularity when using frozen semen [5] but, neither insemination site nor the AI dose (300 or 50 millions) had a significant effect on the fertility rate [6].

We hypothesize that AI with 400 million sperm in the tip of the uterine horn will have higher sperm transport than mares inseminate with 50 million into uterine body. Nevertheless, the inflammatory reaction will be stronger after AI with 400 million sperm into uterine body than with 50 million sperm in the tip of the uterine horn. The objective of this experiment was to determine how the sperm dose and the site of insemination affect the sperm transport and the uterine inflammatory reaction at 2, 4 and 12h after insemination with frozen semen.

2. Materials and methods

Semen from a fertile stallion was cryopreserved with a commercial extender in 0.5 mL straws containing 100 million sperm/mL. Only semen with at least 40% progressive motility after thawing was used.

Eighty-nine mixed-breed mares in estrus (follicle \geq 35 mm and uterus edema) were selected from a population of horses sent to a commercial abattoir in Uruguay (34°S, 56°W). Only clinically normal mares with negative endometrial cytology, i.e. absence of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) were used in this study.

Mares were randomly inseminated in the mid-uterine body (B) or in the tip of the uterine horn (T) ipsilateral to the dominant follicle with one straw - 50 million sperm (50) or eight straws - 400 million sperm (400). The mares were humanely slaughtered 2, 4 and 12h post AI forming the following groups:

B50 (2h, n=6; 4h, n=6; 12h, n=7); T50 (2h, n=12; 4h, n=9; 12h, n=8); B400 (2h, n=8; 4h, n=6; 12h, n=6) and T400 (2h, n=7; 4h, n=7; 12h, n=7).

Internal reproductive tracts were recovered; the uterus separated from the oviducts and flushed with 50 mL phosphate-Buffered saline (PBS) using a Foley catheter. A sample of the uterine flush was placed in a hemocytometer for PMN counts. Complete ipsilateral oviductal flushes were performed using 1 mL of PBS containing 0.1% sodium dodecyl sulfate. The flushing was stirred and the sperm was counted in a hemocytometer.

Data were analyzed using analysis of variance. Insemination time (2, 4, 12h), site (tip or body) and dose (400 or 50) were considered as independent variables; number of sperm cells and PMNs in flushes were considered as dependent variables. Probabilities < 0.05 were considered significant.

3. Results

The mean number of oviductal sperm cells recovered was influenced by the insemination site and insemination dose. Deep horn insemination allows higher ($P = 0.025$) sperm transport at 2h than uterine body insemination (Fig. 1A). However, oviductal sperm recovered was similar at all observation time regardless of site and dose of insemination ($P > 0.175$) (Fig 1A, 1B). The number of sperm recovered from the ipsilateral oviduct was higher using 400 million sperm ($P < 0.001$) regardless of the artificial insemination site (Fig. 1C). No oviductal sperm was recovered with the uterine body insemination with 50 million sperm cells.

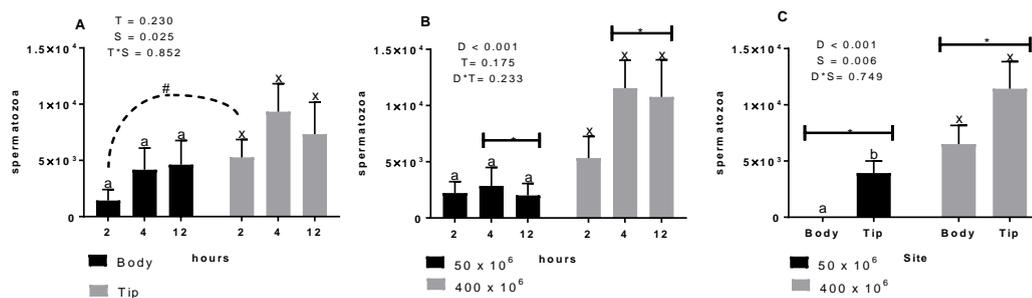


Fig. 1 Mean of spermatozoa \pm S.E.D related to (A) insemination site and time; (B) insemination dose and time and (C) insemination dose and site. (*) represent difference ($P < 0.05$) between sets; (a, b) and (x, y) represent difference $P < 0.05$ into the set; (#) represent a trend between sets ($P = 0.070$). T = time; S = site; D = dose.

Deep uterine horn insemination result in a lower ($P = 0.001$) presence of PMNs than uterine body insemination (Fig. 2A). PMNs number was influenced by site, dose and time of insemination ($P < 0.024$) (Fig. 2A, 2B). A higher presence of PMNs was observed 4h after the uterine body insemination and in mares inseminated with 400 million sperm cells. Nevertheless, an interaction of dose by time ($P < 0.001$) was observed. In mares inseminated with 50 million sperm the inflammatory process increase with time, while, decreased in mares inseminated with 400 million sperm at 12h post AI (Fig. 2B). AI with 400 million sperm resulted in a higher PMN reaction than the use of 50 million sperm (Fig. 2C). Interestingly, the use of low dose in the uterine body insemination provoked a higher ($P < 0.001$) PMN presence than AI in the tip of the uterine horn.

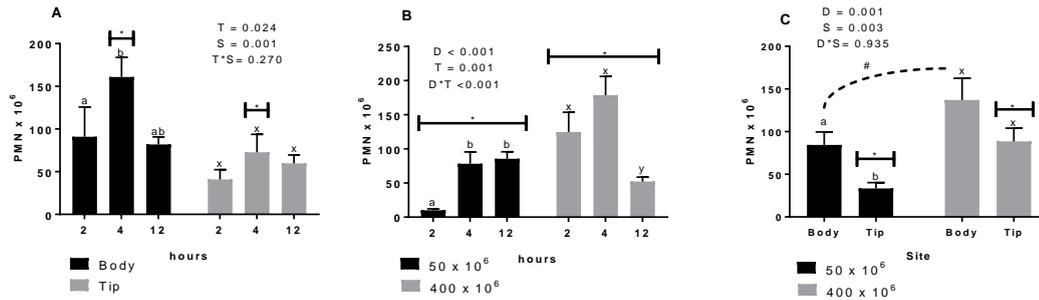


Fig. 2 Mean of PMNs \pm S.E.D related to (A) insemination site and time; (B) insemination dose and time and (C) insemination dose and site. (*) represent difference ($P < 0.05$) between sets; (a, b) and (x, y) represent difference $P < 0.05$ into the set; (#) represent a trend between sets ($P = 0.086$). T = time; S = site; D = dose.

4. Discussion

The present study demonstrates that the high AI dose produced better sperm transport regardless of the insemination site and time post-insemination. Insemination in the tip of the uterine horn increased the number of oviductal sperm recovered from the ipsilateral oviduct to the dominant follicle, which was more evident in mares inseminated with a low dose at 2h post insemination. These results agree with previous studies in which mares were inseminated in the tip of the uterine horn with frozen semen immediately post-ovulation and reported that uterine flushes performed 1h after AI did not decrease pregnancy rates in normal mares and increased pregnancy rates in sub-fertile mares [7].

The insemination dose provoked a uterine inflammatory response, which was more rapid and intense as total sperm numbers increased in agreement with previous studies [1]. However, the greater the intensity of inflammation, the faster the solution; mares inseminated with 400 million sperm produced a lower inflammatory response than mares inseminated with 50 million sperm at 12h after AI. In conclusion, AI in the tip of the uterine horn caused less inflammatory reaction than AI in the uterine body, this effect being more evident with low dose insemination and that the use of a dose of 400 million sperm resulted in a greater percentage of oviductal sperm recovered from the ipsilateral oviduct regardless of the AI site and a higher inflammatory reaction with a quicker resolution than AI with 50 million sperm.

References

- [1] Fiala SM, Pimentel CA, Mattos ALG, Mattos RC. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. *Theriogenology* 2007;67:556–62.
- [2] Fiala SM, Cruz LA, Rodrigues RF, Jobim MIM, Gregory RM, Mattos RC. Sperm cells in the reproductive tract of the mare: where can we find them? *Pferdeheilkunde* 2010;26:19-21.
- [3] Brinsko SP, Varner DD, Blanchard TL. The effect of uterine lavage performed four hours post insemination on pregnancy rate in mares. *Theriogenology* 1991;35:1111-9.
- [4] Samper JC, Vidament M, Katila T, Newcombe J, Estrada A, Sargeant J. Analysis of some factors associated with pregnancy rates with frozen semen. *Theriogenology* 2002;58:647-650.
- [5] Martin U, Danziger U. Experiences on transrectally guided deep intracornual insemination in stud farm practice. *Animal Reproduction Science* 2005;89:330-0.
- [6] Sieme H, Bonk A, Hammann H, Klug E, Katila T. Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology* 2004;62:915-28.
- [7] Samper JC. Post-breeding inflammation and its effect on fertility. In: *Proceeding of I Jornada Biotecnologias Reproductivas en Equinos-SATE*,

10.BIBLIOGRAFÍA

- 1- Alonso A, Baca CC, Pinto M, Caldevilla M, Ferrante A, Miragaya M (2016). Uso de semen congelado en programas de inseminación artificial en equinos. *Spermova* 6 (2): 107-109.
- 2- Allen WR, Brown L, Wright M, Wilsher S (2007). Reproductive efficiency of Flatrace and National Hunt Thoroughbred mares and stallions in England. *Equine Vet J*; 39:438–445.
- 3- Allen W.E (1994). Fertilidad y obstetricia equina. Zaragoza. Acridibia. 248 p.
- 4- Asbury AC, Schultz KT, Klesius PH, Foster AW, Washburn SM (1982). Factors affecting phagocytosis of bacteria by neutrophils in the mares's uterus. *J. Reprod. Fertil* 32 (supply): 151–159.
- 5- Asbury AC (1984). Endometritis diagnosis in the mare. *Equine Vet Data*, p 166.
- 6- Aurich C (2011). Reproductive cycles of horses. *Anim. Reprod. Sci.* 124:220-228.
- 7- Aurich C (2012). Artificial Insemination in Horses: More than a Century of Practice and Research. *J Equine Vet Sci.* 32 (8), 458 - 463.
- 8- Bader H (1982). An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. *J. Reprod. Fertil.*, 32 :59-64.
- 9- Ball Ba (1996). Scanning electron microscopy of the equine oviduct and observations on ciliary currents in vitro at day 2 after ovulation. *Theriogenology* 46:1305–11.
- 10-Barbacini S, Marchi V, Zavaglia G (1999). Equine frozen semen: results obtained in Italy during the 1994-1997 period. *Equine Vet Educ*, 11 (2): 109-112.
- 11- Barbacini S, Loomis P, Squires EL (2005). The effect of sperm number and frequency of insemination on pregnancy rates of mares inseminated with frozen-thawed spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 89: 203-205.
- 12-Battut I, Palmer E, Driancourt MA (1995). Proteins synthesized by equine oviducts: Characterization, variations, and interactions with spermatozoa. *Biol Reprod Monogr* 1:131–40.
- 13-Begley Aj, Quinn P (1982). Decapacitation factors in semen. *Clin Reprod Fertil* 1:167–75.
- 14-Boyle MS, Cran DG, Allen WR, Hunter RHF (1987). Distribution of spermatozoa in the mare's oviduct. *J Reprod Fertil (Suppl)* 35:79–86.

- 15-Brinsko SP, Varner DD, Blanchard TL (1991). The effect of uterine lavage performed four hours post insemination of pregnancy rate in mares. *Theriogenology*; 35 (6): 1111- 1119.
- 16-Brinsko SP, Blanchard TL, Rigby SL, Love CC, Varner DD (2003). Effects of dead spermatozoa on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-stored equine semen. *Theriogenology* 59 (34): 735-42.
- 17-Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, Hartman D (2011). *Manual of equine reproduction*. Missouri, Elsevier, 332 p.
- 18-Buczowska J, Kozdrowski R, Nowak M, Raś A, Staroniewicz Z, Siemieniuch M (2014). Comparison of the biopsy and cytobrush techniques for diagnosis of subclinical endometritis in mares. *Reprod Biol Endocrinol* 12: 27.
- 19-Clement F, Duchamp G, Larry JL, Vidament M (2005). Effects of frequency of insemination, number of spermatozoa and insemination site on fertility of equine frozen semen. *Animal Reproduction Science 4th International Symposium on Stallion Reproduction*. Hannover, Allemagne. 89 1-4, Abstract 5 p: 208-210
- 20-Coutinho da Silva A, Alvarenga Marco (2011) Fungal Endometritis. En: McKinnon A, Squires E, Vaala E, Varner. *Equine Reproduction*, 2^a ed. Chichester, Wiley-Blackwell, p. 2643 - 2651.
- 21-Cuervo-Arango J (2015). Inseminación artificial con semen congelado: dosis, frecuencia y momento óptimo de la IA. *Primer Encuentro Internacional de Reproducción Equina, Fundación Tronador, Chile*, pp 49 - 57.
- 22-Curnow EM (1991). Ultrasonography of the mare`s uterus. *Eq. Vet. Educ.* 3 (4):190-193.
- 23-Dascanio J, Ley WB, Bowen JM, (1997). How to Perform and Interpret Uterine Cytology. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP. Amer Assoc Eq Pract* 43: 182 – 186.
- 24-Davies Morel Mina CG (2005) Inseminación Artificial, Fisiología de la reproducción de los équidos, cría y manejo 2^a. Zaragoza, Ed Acribia, pp.335-351.
- 25-Day FT (1942). Survival of spermatozoa in the genital tract of the mare. *J Agric Sci* 32:108–11.
- 26-Dell'Aqua Jr JA, Papa Fo, Lopes Md, Alvarenga Ma, Macedo L, Melo Cm (2006). Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen. *Anim Reprod Sci* 94:270–3.
- 27-Dyce KM (2003). *Anatomía Veterinaria*. México, Mc. Graw-Hill Interamericana, 956 p.

- 28-Doig PA, Mckinght JD, Miller RB (1981). The use of endometrial biopsy in the infertile mare. *Can. Vet. J.* 22: 72-76.
- 29-Dobrinski I, Thomas Pga, Ball Ba (1995). Cryopreservation reduces the ability of equine spermatozoa to attach to oviductal epithelial cells and zona pellucida in vitro. *J Androl*; 16:536–42.
- 30-Dowsett KF, Knott LM (1996). The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology* 46 (3): 397-412.
- 31-Dutra C, Graglia F, Martínez MN (2013). Diluyentes de semen equino para su uso fresco y refrigerado por 14 y 48 horas. Comparación entre leche descremada UHT y un diluyente comercial (Equipro™). Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, 52 p.
- 32-Ellington JE, Varner DD, Burghardt RC, Meyers-wallen VN, Barhoumi R, Brinsko SP, Ball BA (1993). Cell-to-cell communication of equine uterine tube (oviduct) cells as determined by anchored cell analysis and sorting in culture. *Anim Reprod Sci*; 30:313–24.
- 33-Ellington JE, Ball BA, Blue BJ, Wilker CE (1993). Capacitation like membrane changes and prolonged viability in vitro of equine spermatozoa cultured with uterine tube epithelial cells. *Am J Vet Res*; 54:1505–10.
- 34-Ellington JE, Ball BA, Yang X (1993). Binding of stallion spermatozoa to the equine zonapellucida after coculture with oviductal epithelial cells. *J Reprod Fertil*; 98:203–8.
- 35-Ellington JE, Ignatz GG, Varner DD, Marcuciors, Mathison P, Ball BA (1993). In vitro interaction between oviduct epithelia and equine sperm. *Arch Androl*; 31:79–86.
- 36-England GCW (2005). *Fertility and Obstetrics in the horse*. 3a ed. Oxford, Blackwell, 306 p.
- 37-Fedorka CE, Scoggin KE, Woodward EM, Squires EL, Ball BA, Troedsson M (2017). The effect of select seminal plasma proteins on endometrial mRNA cytokine expression in mares susceptible to persistent mating-induced endometritis. *Reprod Domest Anim* 52(1): 89-96.
- 38-Fiala SM, Pimentel CA, Mattos, ALG, Gregory RM, Mattos RC (2007). Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. *Theriogenology*, 67: 556-562.
- 39-Fiala SM, Jobim MIM, Katila T, Gregory RM, Mattos RC. Sperm distribution in the oviduct and uterus of mares within two hours after artificial insemination. *Pferdeheilkunde*; 24: 96–8.

- 40-Gebhardt S, Merkl M, Herbach N, Wanke R, Handler J, Bauersachs S (2012). Exploration of Global Gene Expression Changes During the Estrous cycle in Equine Endometrium. *Biol. Reprod.*: 87 (6):136, 1-13.
- 41-Götze, R (1949). *Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere*. Hannover, Schaper, 613 p.
- 42-Hennecke DR, Potter GD, Kreifer JL, Yeates BF (1983). Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Eq. Vet. J.* 15 (4): 371-372.
- 43-Hoffmann N, Oldenhof H, Morandini C, Rohn K, Sieme HC (2011). Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Anim Reprod Sci* 125: 112-118.
- 44-Hurtgen JP (2006). Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: a review. *Theriogenology* 66: 560-566.
- 45-Kalmar JJ, Ball BA, Troedsson MHT, McQuerry KJ, Baumber-Skaife J, Loomis PR, Squires EL (2014). Effect of number of mounts and pre-freeze concentration on stallion seminal parameters. *J Equine Vet Sci* 34:30.
- 46-Katila T (1995). Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biol Reprod* 52: 515–17.
- 47-Katila T (1997). Interactions of the uterus and semen. *Pferdeheilkunde*, 13 (5) : 508-511.
- 48-Katila T, Sankari S, Makela O (2000). Transport of spermatozoa in the reproductive tracts of mares. *J Reprod Fertil (Suppl 56)*:571–8.
- 49-Katila T (2011) Sperm – Uterine Interactions. En: McKinnon A, Squires E, Vaala E, Varner. *Equine Reproduction*, 2^a ed. Chichester, Wiley-Blackwell, p 1092:1098.
- 50-Kenney RM (1978). Cyclic and pathological changes of the mare endometrium as detected by biopsy with a note on early embryonic death. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 172, : 241-262.
- 51-Klug E, Deegen E, Lazarz B, Rojem I, Merkt M (1982). Effect of adrenergic neurotransmitters upon the ejaculatory process in the stallion. *J Reprod Fertil Suppl*; 32:31–4.
- 52-Knottenbelt D, Le Blanc M, Lopate C, Pascoe R (2003). *Equine Stud Farm Medicine and Surgery*. Edinburgh, Saunders, 402 p.
- 53-Knudsen P (1964). Endometrial cytology as a diagnostic aid in mares. *Cornell Vet*; 54:415-22.

- 54-Koskinen E, Lindeberg H, Kuntsi H, Ruotsalainen L, Katila T(1990). Fertility of mares after postovulatory insemination. *Zentralbl Veterinarmed A*. 37(1):77-80.
- 55-Leão KM (2006). Evaluación de diferentes técnicas de inseminación artificial en yeguas utilizando un bajo número de espermatozoides. Tesis de grado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, 150 p.
- 56-Le Blanc M. M (2011) Uterine Citology. En: McKinnon A, Squires E, Vaala E, Varner. *Equine Reproduction*, 2^a ed. Chichester, Wiley, p 1922 - 1928.
- 57-Liu IK, Troedsson MH (2008). The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: yesterday and today. *Theriogenology* 70 (3):415-20.
- 58-Lyle SK, Ferrer MS (2005). Low-dose insemination: why, when and how. *Theriogenology* 64 (3): 572-9.
- 59-Loomis PR, EL Squires (2005). Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology* 64: 480-491.
- 60-López-Fernández C, Crespo F, Arroyo F, Fernández J L, Arana P, Johnston S D, Gosálvez, J (2007). Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology*, 68(9):1240-50.
- 61-Losinno L, Aguilar J (2002). Reproducción y biotecnologías en la producción equina, 4p.
- 62-Losinno L (2008). Control de factores que afectan la eficiencia en programas comerciales de transferencia de embriones. I Seminario Internacional de Biotecnología Reproductiva Equina.
- 63-Love (2011) Endometrial Biopsy. En: McKinnon A, Squires E, Vaala E, Varner. *Equine Reproduction*, 2^a ed. Chichester, Wiley-Blackwell, p 1929:1939.
- 64-Love C (2012). Measurement of Concentration and Viability in Stallion Sperm. *J Equine Vet Sci*. 32 (8): 464-466.
- 65-Madill S, Troedssonmht, Alexander SL, Shandn, Santschi EM, Irvine CHG (2000). Simultaneous recording of pituitary oxytocin secretion and myometrial activity in oestrous mares exposed to various breeding stimuli. *J Reprod Fertil Suppl*; 56:351–61.
- 66-Malschitzky E (1998). Efeito de diferentes tratamentos pós-cobertura na fertilidade de éguas Puro Sangue de Corrida. Tesis. Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, 90 p.
- 67-Mattos RC, Mattos ALG, Klug E, G Unzel (1984). Citologia endometrial na égua como Método diagnóstico auxiliar e complementar. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 8 (2) : 83-90.

- 68-McKinnon, A (2009) Hormonal Control of Equine Reproduction. Proceedings of the 11th Annual Resort Symposium of the American Association of Equine Practitioners AAEP, Gold Coast, Australia, January 25 - 28, p 138.
- 69-McKinnon A, Squires E, Vaala E, Varner D (2011). Equine Reproduction, 2^a ed. Chichester, Wiley-Blackwell, 3288 p.
- 70-Miller CD (2008) Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. Theriogenology 70:463-468.
- 71-Morel D (1999). Historical Development and Present Use of Artificial Insemination. En: Davies Morel. Equine artificial insemination. Aberystwyth University, UK, CAB, p. 9-25.
- 72-Morel MCGD (2003). Equine Reproductive Physiology, Breeding, and Stud Management. Wallingford, Cabi, 417 p.
- 73-Morris L.H.A, Hunter R.H.F and Allen W.R. (2000). Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. Journal of Reproduction and Fertility 118: 95–100.
- 74-Morris LHA, Tiplady C, Allen WR (2003). Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa into the uterotubal junction. Equine Vet J. 35 (2): 197-201.
- 75-Newcombe JR, Paccamonti D, Cuervo-Arango J (2011). Reducing the examination interval to detect ovulation below 12h does not improve pregnancy rates after postovulatory insemination with frozen/thawed semen in mares. Anim Reprod Sci; 123(1-2):60-3.
- 76-Newcombe JR, Cuervo-Arango J (2011). The effect of time of insemination with fresh cooled transported semen and natural mating relative to ovulation on pregnancy and embryo loss rates in the mare. Reprod Domest Anim; 46(4): 678-81.
- 77-Newcombe JR , Peters AR (2014). The Buserelin Enigma: How Does Treatment with this GnRH Analogue Decrease Embryo Mortality? J Vet Sci Technol: 1-7.
- 78-Ortega-Ferrusola C, Garcia B, Gallardo-Bolanos J, Gonzalez Fernandez L, Rodriguez-Martinez H, Tapia J, Peña F (2009). Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. Anim Reprod Sci: 114 (4): 393 - 403.
- 79-Palm F, Walter I, Budik S, Aurich C (2006). Influence of different semen extenders and seminal plasma on the inflammatory response of the endometrium in oestrous mares. Anim Reprod Sci; 94:286–9.
- 80-Parker WG, Sullivan JJ, First NL (1975). Sperm transport and distribution in the mare. J Reprod Fertil Suppl;23:63–6.

- 81-Pérez D, Acosta M, Restrepo G, Camacho C, Pérez J (2017). Congelación de Semen Equino Bajo Dos Esquemas de Adición de Dimetilformamida. *Rev Inv Vet Perú*; 28(4): 918-92.
- 82-Perry, E.J. (1968). *The Artificial Insemination of farm animals*. 4a ed. New Brunswick, Rutgers University Press, 473 p.
- 83-Pycock JF (2009). Complicaciones de la gestación avanzada en la yegua. Congreso Argentino de Reproducción Equina, Buenos Aires, Argentina, p. 37 - 43.
- 84-Raz T, Aharonson-Raz K (2012). Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in the mare. *Isr. J. Vet. Med.* 67: 11-18.
- 85-Riddle WT, Le Blanc MM, Stromberg AJ (2007). Relationships between uterine culcure, cytology and pregnancy rates in a thoroughbred practice. *Theriogenology* 68:395-402.
- 86-Rigby S, Derczo S, Brinsko S, Blanchard T, Taylor T, Forrest DW, Varner D, (2000). Oviductal sperm numbers following proximal uterine horn or uterine body insemination. *Proceedings of the 46th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, pp. 332–4.
- 87-Samper JC (1995). Stallion semen cryopreservation: Male factors affecting pregnancy rates. *Proceedings. Soc Theriogenology*, pp160 –165.
- 88-Samper JC (2001). Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Anim Reprod Sci.*68:219-228.
- 89-Samper JC y Hankins K (2001). Breeding mares whit frozen. *Practice/ Proceedings of American Association of Equine Practitioners*; 47: 314-318.
- 90-Samper JC, Pycock JF, Mc Kinnon AO (2007). *Current therapy in equine reproduction*. Missouri, Elsevier, 492p.
- 91-Samper JC (2009). *Equine Breeding Managment and Artificial Insemination*. Missouri, Elsevier, 336 p.
- 92-Samper JC (2015). Post-breeding inflammation and its effect on fertility. I *Jornada Biotecnologias Reproductivas en Equinos*. Buenos Aires, Argentina, 43-45.
- 93-Sanchez R (2015). Resultados de un programa commercial de transferencia de embriones de gran escala con inseminación artificial profunda. I *Jornada Biotecnologias Reproductivas en Equinos*. Buenos Aires, Argentina, p 49-53.
- 94-Schlafer D (2007). Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopatology and application of new diagnostic techniques.*Theriogenology* 68:416-422.

- 95-Schober D, Aurich C, Noh H, H Gille, (2014). Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equines permatzoa. *Theriogenology*, 68(5):745-54, 2007.
- 96-Schnobrich, (2018). Disponible en: <https://thehorse.com/159141/oviductal-problems-in-the-mare-diagnosis-and-management/> Fecha de consulta: 15/10/2018.
- 97-Scott MA, Liu IKM, Robertson KR, Hanrath M, Overstreet JW, Drobnis EZ, 1994. Acrossosomal status and movement characteristics of sperm in the oviducts of normal mares. *International Symposium on Equine Reproduction*, 6, Caxambu, MG, Brasil. *Proceedings Caxambu: ISER*. p.173-174.
- 98-Scott MA, Liu IKM, Overstreet JW (1995). Sperm transport to the oviducts: Abnormalities and their clinical implications. *Proceedings of the 41st Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, pp. 1–2.
- 99-Scott MA (2000). A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Anim Reprod Sci*; 60–61: 337–48.
- 100-Scott MA, Varner DD, Liu IKM, Enders AC (2002). Presumptive evidence of a preovulatory sperm reservoir in the mare: morphological investigations using scanning electron microscopy. *Theriogenology*; 58: 639-642.
- 101-Scott MA, Liu IKM, Overstreet JW, Enders AC (2003). The structural morphology and epithelial association of spermatozoa at the uterotubal junction: A descriptive study of equine spermatozoa in situ using scanning electron microscopy. *J Reprod Fertil Suppl*; 56:415–21.
- 102-Sieme H, Schafer T, Stout TAE, Klug E, Waberski D (2003) . The effects of different insemination regimes on fertility in mares. *Theriogenology*; 60:1153–64.
- 103-Sieme H, Bonk A, Hammann H, Klug E, Katila T (2004). Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology*; 62: 915 – 928.
- 104-Sieme H (2011). Freezing semen. En: McKinnon A, Squires E, Vaala E, Varner. *Equine Reproduction*, 2^a ed. Chichester, Wiley-Blackwell, p. 2972- 2982.
- 105-Squires EL, Reger HP, Maclellan LJ, Bruemmer JE (2002). Effect of time of insemination and site of insemination on pregnancy rates with frozen semen. *Theriogenology*; 58: 655 - 658.
- 106-Squires EL (2009). Changes in equine reproduction: have been good o bad for de horse industry?. *J Equine Vet Sci* 29 (5): 268-273.
- 107-Suarez SS, Pacey AA (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update*; 12:23–37.

- 108-Troedsson MHT, Crabo BG, Ibrahim NM, Scott M, Ing M (1995). Mating-induced endometritis: mechanisms, clinical importance, and consequences. *Proc Am Assoc Equine Pract*; 41: 11-12.
- 109-Troedsson MHT, Desvougges A, Alghamdi AS, Dahmbs B, Cow CA, Hayna J, Valesco R, Callahan PT, Macpherson ML, Pozor M, Buhi WC, (2005). Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim Reprod Sci*; 89:171–86.
- 110-Thomas PGA, Ball BA, Miller PG, Brinsko SP, Southwoo (1994) L. A subpopulation of morphologically normal, motile spermatozoa attach to equine oviduct epithelial cells in vitro. *Biol Reprod*; 51:303–9.
- 111-Thomas PGA, Ignatz GG, Ball BA, Currie WB (1995). Effect of coculture with stallion spermatozoa on de novo protein synthesis and secretion by equine oviduct epithelial cells. *Am J Vet Res* 1995; 56:1657–62.
- 112-Varner DD, Love CC, Brinsko SP, Blanchard TL, Hartman DL, Bliss SB. y col. (2008). Semen processing for the subfertile stallion. *J Equine Vet Sci*, 28(11): 677-685.
- 113-Vazquez JJ, Medina V, Liu I.K., Ball B.A., Scott M.A, (1998). Nonsurgical utero-tubal insemination in the mare. *Proceedings of Annual Meeting Society for Theriogenology*, Baltimore, MD, pp. 82–83.
- 114-Vidament M, Dupere AM, Julienne P, Evain A, Noue P, Palmer E (1997). Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology* 48:907–17.
- 115-Vidament M (2005) French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim Reprod Sci* 89 (1-4):115-36.
- 116-Volkman DH, Van Zyl D (1987). Fertility of stallion semen frozen in 0.5ml straws. *J Reprod Fertil (Suppl 35)*:143–148.
- 117-Walter J, Neubergh KP, Failing K, Wehrendb (2012) Cytological diagnosis of endometritis in the mare: Investigations of sampling techniques and relation to bacteriological results. *Anim Reprod Sci*, 132 (3–4): 178-186.
- 118-Watson ED, Stokes CR, Bourne FJ. (1987) Cellular and humoral defence mechanisms in mares susceptible and resistant to persistent endometritis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 16: 107-121
- 119-Watson ED, Nikolakopoulos E, Gilbert C, Goode J (1999). Oxytocin in the semen and gonads of the stallion. *Theriogenology*; 51:855 - 865.
- 120-Watson PF (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61: 481-492.

- 121-Weber JA, Freeman DA, Vanderwall K, Woods GL (1991). Prostaglandin E2 Hastens Oviductal Transport of Equine Embryos. Biol Reprod; 45: 544 – 546.
- 122-Woldsdorf (2013). Manejo y fertilidad en yeguas inseminadas con semen congelado. Proceeding of I reproducción equina III. Resúmenes de conferencias del III Congreso Argentino de Reproducción Equina, Buenos Aires, Argentina.
- 123-Youngquist RS, Threlfall WR (2007). Current Therapy In Large Animal Theriogenology. 2a ed. Inglaterra, Elsevier, 1088 p.