UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

"EFECTO DEL SITIO, DOSIS Y TIEMPO DE INSEMINACIÓN CON SEMEN CONGELADO SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA ENDOMETRIAL DE LA YEGUA"

POR

Nicolás IRRAZÁBAL FAGNONI

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias.

Orientación: Medicina Veterinaria.

Modalidad: Ensayo experimental

Montevideo
Uruguay

2020

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa:

Dr. Rafael Aragunde

Segundo Miembro (Tutor):

Dr. Nicolas Cazales

Tercer Miembro:

Dra. Ana Laura Camacho

Cuarto Miembro (Cotutor):

Dra. María José Estradé

Fecha: 18 de Junio de 2020

Autor:

Nicolás Irrazábal Fagnoni

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutor, el Dr. Nicolas Cazales por haberme hecho participe de su proyecto de investigación, por haberme brindado su conocimiento, guiarme y apoyarme en la elaboración de mi tesis de grado.

Un agradecimiento especial para la Dra. María José Estradé, por haberme apoyado no solo en la redacción de la tesis, sino que a lo largo de toda la carrera.

Agradezco al personal del Frigorífico, por hacer posible la realización de este proyecto.

A la catedra de Genética de la Facultad de Veterinaria, por permitirme usar sus instalaciones para la lectura de las muestras.

Al personal de biblioteca por haberme ayudado en la búsqueda y obtención de material, y orientarme con los formatos requeridos para la tesis.

Agradezco especialmente a la Facultad de Veterinaria de la UdelaR y a todos sus integrantes.

A los integrantes de Veterinaria La Cuadra por acompañarme en esta última etapa.

Por ultimo pero no menos importante, quiero agradecer a toda mi familia, a Belén y su familia por su apoyo incondicional y confianza en todo momento.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN 8
ABSTRACT 9
1. INTRODUCCIÓN 10
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 12
2.1 Inseminación Artificial en la especie equina. 12
2.1.1 Historia de IA 12
2.1.2 Inseminación con Semen Congelado en la especie equina 13
2.1.2.1 Ventajas 13
2.1.2.2 Problemas que presenta el semen congelado 13
2.1.2.2.1 Formación de cristales de hielo y el efecto solución 14
2.1.2.2.2 Estrés por agregado de Crioprotectores 14
2.1.2.2.3 Factor padrillo 15
2.2 Características Reproductivas de la Yegua 15
2.2.1 Anatomía del aparato reproductor de la yegua 15
2.2.1.1 Ovarios 15
2.2.1.2 Trompas Uterinas 16
2.2.1.3 Útero 16
2.2.1.4 Cérvix 16
2.2.1.5 Vagina 17
2.2.1.6 Vestíbulo 17
2.2.1.7 Vulva 17
2.2.2 Histología endometrial 18
2.2.3 Fisiología Reproductiva en la yegua 21
2.2.3.1 Fotoperiodo 21
2.2.4 Examen reproductivo de la yegua 22
2.2.4.1 Conformación perineal 22
2.2.4.2 Vaginoscopía 23
2.2.4.3 Palpación rectal 23
2.2.4.4 Ultrasonografía 24
2.2.4.5 Citología Endometrial 24

2.2.4.6 Biopsia endometrial 25
2.3 Inflamación endometrial post cobertura 27
2.3.1 Efecto de los espermatozoides en el útero 27
2.3.2 Efecto del plasma seminal en el útero 28
2.3.3 Efecto del número de espermatozoides en el útero 28
2.3.4 Efecto de la técnica y sitio de inseminación en el útero 29
3. HIPÓTESIS 30
4. OBJETIVOS 31
4.1 General 31
4.2 Específicos 31
5. MATERIALES Y MÉTODOS 32
5.1 Lugar y duración 32
5.2 Animales 32
5.3 Colecta y congelamiento del semen 32
5.4 Examen Ginecológico 33
5.5 Diseño Experimental 33
5.6 Colecta y procesamiento de las muestras 34
5.7 Histología Endometrial 34
5.8 Análisis Estadístico 35
6. RESULTADOS 36
6.1 Lavados Uterinos 36
6.2 Estrato Compacto 37
6.3 Estrato Esponjoso 39
7. DISCUSIÓN 41
8. CONCLUSIONES 43
9. BIBLIOGRAFÍA 44

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Media (± EE) de motilidad espermática total y progresiva del semen congelado-descongelado evaluado por CASA 33

Tabla 2 Diseño experimental 34

Tabla 3. Media (± EE) de PMNs ($x10^6$) en los lavados uterinos de las yeguas control y de las yeguas inseminadas en la punta del cuerno (Tip) y en el cuerpo del útero (Body) con $50x10^6$ y $400x10^6$ de espermatozoides a las 2, 4 y 12 horas posinseminación..... 36

Tabla 4. Media (± EE) de PMNs/campo observados en el estrato compacto de las yeguas del grupo control y de las yeguas inseminadas en la punta del cuerno (Tip) y en el cuerpo del útero (Body) con $50x10^6$ (50) y $400x10^6$ (400) de espermatozoides a las 2, 4 y 12 horas posinseminación..... 38

Tabla 5. Media (± EE) de PMNs/campo observados en el estrato esponjoso de las yeguas del grupo control y de las yeguas inseminadas en la punta del cuerno (Tip) y en el cuerpo del útero (Body) con $50x10^6$ (50) y $400x10^6$ (400) de espermatozoides a las 2, 4 y 12 horas posinseminación. 39

Figura 1. Esquema representativo de un corte del endometrio, miometrio y perimetrio (Kenney 1978)..... 18

Figura 2. Biopsia endometrial que exhibe un moderado infiltrado de PMNs (Neutrófilos (flecha)) en el estrato compacto y escasa densidad glandular. H&E. Aumento 200x (Muestra del cuerpo uterino, de la yegua número 693 del actual trabajo experimental). 19

Figura 3. Biopsia endometrial que exhibe un moderado infiltrado de linfocitos y neutrófilos en el estrato compacto. H&E. (Snider y col., 2011) 19

Figura 4. Biopsia endometrial que exhibe un infiltrado de PMNs (Neutrófilos (flecha)) en el estrato compacto. H&E. (Snider y col., 2011)..... 19

Figura 5. Biopsia endometrial que exhibe una disminución en la densidad glandular y un nido glandular en el estrato esponjoso. H&E. (Snider y col., 2011) 20

Figura 6. Biopsia endometrial que muestra fibrosis y dilatación glandular. H&E. Aumento 200x (Muestra del cuerno contralateral, de la yegua número 635 del actual trabajo experimental)..... 20

Figura 7. Biopsia endometrial de estrato compacto con fibrosis y baja densidad glandular. H&E. Aumento 200x (Muestra del cuerno ipsilateral, de la yegua número 701 del actual trabajo experimental). 20

Figura 8. Esquema simplificado de la regulación hormonal del ciclo estral de la yegua. 22

Figura 9. Patrón hormonal y evolución folicular durante el ciclo estral de la yegua. (McKinnon y col., 2011)..... 22

Figura 10 Útero categoría I..... 26

Figura 11. Útero categoría IIB 26

Figura 12. Útero categoría III..... 26

Figura 13 Media de PMNs (± EE) recuperados en los lavados uterinos con relación al (A) Tiempo y Sitio de inseminación; (B) Tiempo y Dosis de inseminación y (C) Dosis y Sitio de inseminación.. 37

Figura 14. Media de PMNs/campo (± EE) observados en el estrato compacto (SC) del endometrio con relación al (A) Tiempo y Sitio de inseminación; (B) Tiempo y Dosis de inseminación y (C) Dosis y Sitio de inseminación.. 39

Figura 15. Media de PMNs/campo (± EE) observados en el estrato esponjoso del endometrio con relación al (A) Tiempo y Sitio de inseminación; (B) Tiempo y Dosis de inseminación y (C) Dosis y Sitio de inseminación. 40

RESUMEN

La industria equina ha tenido un crecimiento exponencial a nivel mundial en los últimos años y nuestro país no fue la excepción. Esto intensificó el uso de biotecnologías reproductivas y la inseminación artificial (IA) con semen congelado se transformó en una técnica popular y de suma utilidad. Sin embargo, la falta de protocolos y estandarización del proceso han llevado a bajos índices de preñez frenando el uso masivo de la técnica. El objetivo de este estudio fue evaluar la reacción inflamatoria del endometrio a las 2, 4 y 12 h post IA, al utilizar diferentes dosis de semen congelado y diferentes sitios de IA. Se utilizaron 105 yeguas destinadas a faena, saludables y en celo, con folículos dominantes mayores a 33mm de diámetro, edema uterino y citología endometrial negativa (ausencia de polimorfonucleares). Se utilizó semen congelado proveniente de un solo padrillo, con una motilidad progresiva >35% post descongelado. Las yeguas fueron inseminadas con pajuelas de 0,5 mL con $50x10^6$ espermatozoides, en la mitad del cuerpo uterino (Body) o en la punta del cuerno (Tip) ipsilateral al folículo dominante, con una dosis de $50x10^6$ espermatozoides (50) o $400x10^6$ espermatozoides (400). Las yeguas se sacrificaron de manera humanitaria a las 2, 4 y 12 h posteriores a la IA, conformándose aleatoriamente los siguientes grupos experimentales: Body 50 (n=19) (2, 4 y 12 h); Tip 50 (n=29) (2, 4 y 12 h); Body 400 (n=20) (2, 4 y 12 h); Tip 400 (n=21) (2, 4 y 12 h) y Control (n = 16) las cuales no fueron inseminadas. Se recuperaron los úteros, se lavaron y se contaron los polimorfonucleares (PMNs) presentes en los lavados. Luego se obtuvieron muestras de biopsia del endometrio de cada cuerno y del cuerpo del útero para evaluar el grado de inflamación. Los datos obtenidos se analizaron mediante ANOVA, considerándose el sitio, la dosis y el tiempo como variables independientes y el número de PMNs como variables dependientes. Utilizando la dosis alta ($400x10^6$), no hubo diferencia en la reacción inflamatoria al inseminar profundo en la punta del cuerno o en el cuerpo del útero. Mientras que con la dosis baja ($50x10^6$), la IA profunda causó menor reacción inflamatoria que la IA en el cuerpo del útero. La dosis de IA alta, provocó una reacción inflamatoria más intensa, pero de resolución más rápida que la dosis baja. En conclusión, la IA profunda es una técnica segura para utilizar en la yegua y la reacción inflamatoria se vio influenciada por el sitio, la dosis y el tiempo posinseminación.

ABSTRACT

In the last years, the equine industry has shown an exponential growth worldwide, and our country was not the exception. This situation intensified the use of reproductive biotechnologies and artificial insemination (AI) with frozen-thawed semen became a popular and useful technique. However, the lack of standard protocols and standardization of the process has led to low pregnancies rates, avoiding the massive use of the technique. The aim of this study was to determine whether insemination site and dose affect the intensity of endometrial inflammatory response 2, 4 y 12 h after the insemination of reproductively normal mares with different doses of frozen semen and in different sites. For this study, 105 estrous mares intended for slaughter, with dominant follicles greater than 33 mm in diameter, uterine edema and negative endometrial cytology (absence of polymorphonuclears). Frozen semen from a single stallion with a progressive motility >35% after thawing was used. The mares were inseminated with 0.5mL straws with $50x10^6$ sperm, in the mid-uterine body (Body) or in the tip of the uterine horn (Tip) with one ($50x10^6$ total sperm) or eight straws ($400x10^6$ total sperm). Mares were humanely slaughtered 2, 4 and 12 h after Artificial Insemination (AI) and randomly assigned to the following groups: Body 50 (n = 19) (2, 4 and 12 h); Tip 50 (n = 29) (2, 4, and 12 h); Body 400 (n = 20) (2, 4 and 12 h); Tip 400 (n = 21) (2, 4, and 12 h). A Control group (n = 16) was not inseminated. After slaughter, the uteri were flushed with phosphate-buffered saline (PBS). After flushing, an endometrial sample was collected from the ipsilateral and contralateral horns and mid-uterus body for further histopathological examination. A sample of each uterine flushing was examined for polymorphonuclears (PMNs) count. Data were analyzed using ANOVA. Insemination site, dose and time were considered as independent variables and sperm and PMNs number as dependent variables. In those mares where a high AI dose was utilized, the AI in the tip of the uterine horn did not cause greater inflammatory reaction than AI in the uterine body. Whereas low dose AI in the tip of the uterine horn caused less inflammatory response than low dose AI in the uterine body. The higher the insemination dose, the higher the uterine inflammatory reaction, with a quicker resolution. In conclusion, deep AI is a safe technique to use in mares and the inflammatory reaction was influenced by site, dose, and time after insemination.

1. INTRODUCCIÓN

En Uruguay en los últimos años, la industria equina ha tenido un crecimiento exponencial, gracias al gran desarrollo que han tenido disciplinas como enduro ecuestre, equitación, polo, raid y turf (Ferrari, 2012). Para garantizar la sustentabilidad y la continua evolución del sector, es necesario que varios aspectos que lo conforman funcionen a la perfección. Entre ellos la reproducción equina es un pilar fundamental. La gran demanda de padrillos ha provocado que se comiencen a utilizar otras alternativas a la monta natural, como lo es la inseminación artificial (IA) (Camargo y col., 2018). La utilización de esta técnica, y en especial el uso de semen congelado ha brindado ciertas ventajas a los productores ya que evita problemas en la coordinación de envíos que exige tanto el semen fresco como refrigerado, se reducen los gastos de traslados de animales, se evita adaptar y sobrecargar al padrillo a la estacionalidad reproductiva de la yegua, entre otras (Graham, 1996; Loomis, 2001).

A pesar de las ventajas que brinda el uso de semen congelado en la IA, todavía no ha sustituido a la IA con semen fresco o refrigerado en la producción equina. La amplia variedad de protocolos de congelación, la falta de estandarización del proceso y las diversas técnicas y estrategias de IA empleadas por los veterinarios, ha llevado a obtener bajos índices de preñez y no ha permitido la utilización masiva de esta técnica (Jasko, 1992; Aurich, 2012).

Luego de la monta natural o IA, ocurre una reacción inflamatoria fisiológica en la yegua, con concentración de polimorfonucleares (PMNs) en la luz y endometrio uterino (Kotilainen y col., 1994). Esta respuesta que ocurre tanto al utilizar semen fresco, refrigerado o congelado, es controlada y transitoria en yeguas reproductivamente sanas y no susceptibles a la endometritis persistente post servicio (Troedsson y col., 1995). Este evento es un mecanismo de defensa, que junto con contracciones uterinas, limpian el útero eliminando el exceso de espermatozoides, detritos y bacterias, creando así un ambiente propicio para recibir al embrión al día 5 o 6 post ovulación (Troedsson y col., 1995).

Normalmente las yeguas sanas y resistentes son capaces de controlar la contaminación y resolver la inflamación dentro de las 24 a 48 h post servicio o IA (Blanchard y col., 2003). Las yeguas que no logran resolver la endometritis post servicio a las 48 o 72 h, desarrollan una endometritis persistente (Blanchard y col., 2003). La duración y severidad de la reacción inflamatoria, caracterizada por un aumento de edema uterino y/o presencia de líquido libre intrauterino post servicio o IA, es un factor crítico para la habilidad de la yegua de concebir o mantener una preñez (Samper , 2015; Samper y col., 2016). La disminución de la fertilidad está asociada a una inflamación endometrial persistente, resultando en luteólisis prematura y perdidas embrionarias tempranas, a causa de un aumento de la concentración de $PGF_2\alpha$ secretadas por el endometrio (Troedsson, 1999).

En una población normal, aproximadamente el 15% son yeguas susceptibles de desarrollar endometritis persistente (Troedsson, 1999; Blanchard y col., 2003). La sub-fertilidad en yeguas es uno de los obstáculos más importantes para la producción equina,

siendo la endometritis la causa más frecuente de disminución de la fertilidad, y es la tercera patología más frecuente en los equinos luego de cólico y problemas respiratorios (Troedsson, 1999; Hemberg y col., 2005).

Muchos autores indican que el principal componente del semen, que desencadena la reacción inflamatoria son los espermatozoides (Tyler, 1977; Cohen, 1984, Kotilainen y col., 1994). Por lo que concentraciones altas de espermatozoides desarrollarían inflamaciones más severas que dosis bajas de espermatozoides (Fiala y col., 2007 y Cazales y col., 2018).

La IA con semen congelado causaría una mayor respuesta inflamatoria que el semen refrigerado o fresco, atribuido a la poca cantidad de plasma seminal, a la alta concentración espermática y a un mayor porcentaje de espermatozoides muertos que posee el semen congelado (Kotilainen y col., 1994, Troedsson y col., 1999). Esto sumado a la variable capacidad de los padrillos de que sus espermatozoides toleren el proceso de congelación, que acorta la vida media de los espermatozoides comparado con el semen fresco o refrigerado, resulta en una baja tasa de preñez del semen congelado comparado con el semen fresco o refrigerado (Reilas 2001; Sieme y col. 2003).

Algunos trabajos demostraron que la IA profunda, en la punta del cuerno ipsilateral al folículo dominante, aumenta el número de espermatozoides que llegan a la trompa uterina ipsilateral al folículo dominante (Rigby y col., 2000; Cazales y col., 2018; García, 2018). Esto permitiría utilizar un bajo número de espermatozoides, reduciendo la inflamación posinseminación sin perjudicar los índices de preñez (Gomes y col 2019). Estos datos toman aún mayor importancia cuando se trata de inseminaciones en yeguas susceptibles a la endometritis post servicio pudiéndose mejorar las tasas de preñez en esta categoría de yeguas. El objetivo de este trabajo es determinar si la dosis y el sitio de inseminación influyen en la reacción inflamatoria a las 2, 4 y 12 horas post IA con semen congelado en yeguas reproductivamente sanas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Inseminación Artificial en la especie equina.

2.1.1 Historia de IA

Los primeros relatos de la práctica de inseminación artificial (IA) en equinos datan de 1322 en Medio Oriente, realizadas por un jeque árabe. A partir de 1780, Spallanzani, un naturalista italiano apasionado por la investigación, comenzó a estudiar la importancia del semen en la fertilización y a documentar resultados sobre IA, primero en caninos y luego en equinos (McKinnon, 2011). Las primeras grandes investigaciones y aportes a esta técnica en la especie equina fueron realizadas por Ivanovich Ivanov en el año 1909 en San Petersburgo y aunque los resultados iniciales fueron malos, continuó esforzándose en mejorar la técnica (McKinnon, 2011).

Luego de la primera Guerra Mundial, la IA comenzó a extenderse a otros continentes. En la Unión Soviética y en varios países de Europa se registraron entre 300.000 y 500.000 inseminaciones artificiales en yeguas. En 1959 se registraron 750.000 inseminaciones en Asia, principalmente en China (Boyle, 1992).

El desarrollo de esta técnica en equinos se vio enlentecida, pues la amplia mayoría de los criadores, con una actitud conservadora, no permitían la implementación de la IA, ni registraban animales producto del uso de esta biotecnología. A partir del año 2001, la Asociación Americana de Caballos Cuarto de Milla y la Asociación Americana de Caballos Paint permitieron la IA con semen congelado (Loomis, 2001). Por el contrario, la Asociación de Criadores de Caballos Pura Sangre de Carrera, raza predominante en la industria hípica, sigue hasta el día de hoy sin permitir la IA ni registra productos obtenidos de ella (International Federation of Horseracing Authorities 2014).

El uso de biotecnologías en la reproducción ha aumentado exponencialmente en los últimos años a nivel mundial, en especial la IA. Su implementación ha permitido maximizar el uso del padrillo, pues con una eyaculación se pueden inseminar varias yeguas. Esta técnica además ofrece ciertas ventajas sanitarias, pues disminuye la contaminación del tracto reproductivo de la yegua y evita la transmisión de algunas enfermedades venéreas (Camargo y col., 2018). Cuando la técnica de IA se emplea de forma adecuada, se han igualado los indicies de preñez obtenidos mediante monta natural y es una alternativa para utilizar en yeguas problema (Yates y Whitacre, 1993; Sieme y col., 2004).

Actualmente la IA es una técnica muy utilizada, especialmente en animales deportivos y destinados a reproducción (Kowalczyk y col., 2019). Para la aplicación de esta técnica reproductiva, se utilizan tres tipos de semen: fresco, refrigerado y congelado. Si bien el semen fresco es el más utilizado y el que obtiene mejores índices de preñez (50-80%), se está intentando perfeccionar la técnica del semen congelado, ya que tiene ciertas ventajas sobre el semen fresco y refrigerado (Jasko, 1992; Love, 2012; Govaere y col.,2014; Haadem y col., 2015).

2.1.2 Inseminación con Semen Congelado en la especie equina

El uso de semen congelado ha aumentado su popularidad en los últimos años. La amplia variedad de protocolos de congelación y la falta de estandarización del proceso, entre otros factores, ha provocado que las tasas de preñez aún disten de las obtenidas con semen fresco o refrigerado (Jasko, 1992).

En promedio las tasas de preñez por ciclo utilizando semen congelado oscilan entre 30% y 60%, pudiendo mejorarse ese porcentaje hasta 75% a lo largo de la temporada reproductiva. (Graham, 1996; Alonso y col., 2016).

2.1.2.1 Ventajas

El uso de semen congelado en IA, ofrece algunas ventajas en el manejo con respecto al uso de semen fresco o refrigerado:

- Por su durabilidad, el semen congelado permite una distribución internacional (Loomis, 2001).
- Para la colecta, no es necesario adaptarse a la estacionalidad de la yegua. Se puede colectar semen en cualquier momento del año, congelarse y utilizarse en la temporada de reproducción (Alonso y col., 2016).
- La coordinación de envíos es más fácil, pudiéndose almacenar en el establecimiento, hasta el momento óptimo de inseminación (Loomis, 2001).
- Se reducen los costos de traslado de animales, así como el estrés de la yegua y del padrillo durante el transporte (Graham, 1996).
- Se desperdicia menos semen, todo el eyaculado puede ser utilizado como dosis inseminante. Mientras que con semen refrigerado, lo que no se utiliza debe ser desechado (Loomis, 2001).
- Se reduce la presentación de enfermedades de transmisión sexual (Graham, 1996).
- El almacenamiento de semen congelado permite seguir utilizando la genética de los padrillos incluso después de lesiones, enfermedades, de que hayan sido castrados o hayan muerto (Graham, 1996, Alonso y col, 2016).

2.1.2.2 Problemas que presenta el semen congelado

Cuando se utiliza semen fresco o refrigerado, la sobrevida de los espermatozoides en el útero es de 24 horas a 7 días, estando muy influenciada por el factor padrillo (Watson y Nikolakopoulos, 1996), mientras que la sobrevida del semen congelado es mucho menor (12h horas en promedio) (Sieme y col., 2003). Esto es aceptado como una consecuencia

de la criopreservación (Watson, 2000) y afecta considerablemente la fertilidad y los porcentajes de preñez (Sieme y col., 2003). Para compensar la corta sobrevida de los espermatozoides en el semen congelado, se intenta realizar la inseminación lo más próximo posible a la ovulación.

La congelación del semen somete a los espermatozoides a daños por estrés. Uno de estos factores que pueden dañar el espermatozoide es el cambio de temperatura. El descenso debe ser controlado, principalmente entre los 20°C y los 8°C, un punto crítico en el proceso. Si bien hay muchos protocolos para realizar el descenso de temperatura que dañe lo menos posible las células, es inevitable que algunas células sufran shock por frío y su membrana se dañe, disminuyendo así la fertilidad del semen (Watson, 2000).

2.1.2.2.1 Formación de cristales de hielo y el efecto solución

La formación de cristales de hielo también afecta a los espermatozoides. Un descenso muy rápido de temperatura no permite la salida necesaria de agua para igualar las concentraciones osmóticas. Se forman cristales de hielo intracelulares que dañan la membrana y estructuras de los espermatozoides, disminuyendo así la cantidad de células con posibilidad de fertilizar (Watson, 2000, McKinnon y col., 2011).

Por otra parte, un descenso muy lento de temperatura también produce daños en la célula. Las expone a un medio hipertónico por mucho tiempo, produciendo una excesiva deshidratación osmótica, dañando el citoesqueleto de los espermatozoides (McKinnon y col., 2011).

2.1.2.2.2 Estrés por agregado de Crioprotectores

Los crioprotectores son sustancias que se utilizan para mejorar la resistencia y sobrevivencia de los espermatozoides luego de la congelación y descongelación. Existen principalmente dos tipos de crioprotectores: los no penetrantes, que no ingresan al medio intracelular y los penetrantes, que ejercen su función desde el interior de la célula (Arifiantini y col., 2010). Los más utilizados actualmente son los penetrantes, principalmente el glicerol. Otra alternativa es el dimetilsulfóxido (DMSO) o las amidas (dimetilformamida) que actualmente han sido muy aceptadas. La dimetilformamida ha demostrado ser una excelente alternativa para padrillos que no toleran el glicerol, aumenta la movilidad post descongelación y disminuye los daños a la membrana plasmática de los espermatozoides de algunos padrillos (Mesa y col., 2012, Pérez y col., 2017).

El crioprotector es favorable porque deshidrata las células y evita la formación de cristales de hielo intracelulares, pero el agregado y remoción de este, somete a los espermatozoides a presiones osmóticas que pueden dañar su membrana. También, luego del descongelado cuando el semen entra en contacto con otras sustancias, hay intercambio de fluidos que vuelven a ejercer estrés osmótico sobre los espermatozoides (Watson 2000, Loomis y Graham, 2008).

2.1.2.2.3 Factor padrillo

La variabilidad de padrillos capaces de soportar la congelación de semen, es quizás la mayor limitante que se enfrentan los profesionales a la hora de utilizar este método de preservación. Aproximadamente solo el 20% de los padrillos son capaces de soportar el proceso y mantener su fertilidad original (Katila, 2001, Loomis y Graham, 2008). Otros autores, lograron un 39% de padrillos que congelaban de buena forma (Vidament y col 1997). La motilidad espermática, el acrosoma y la membrana de los espermatozoides se ven afectadas durante el proceso de congelación y descongelación del semen. Esto no afecta a todos los padrillos por igual, por lo que existe una diferencia entre padrillos e inclusive entre eyaculados de cada padrillo (Katila, 2001).

2.2 Características Reproductivas de la Yegua

2.2.1 Anatomía del aparato reproductor de la yegua

El sistema reproductivo de la yegua está compuesto principalmente por dos grupos de órganos, por un lado está el aparato reproductivo propiamente dicho, compuesto por ovarios, trompas uterinas, útero (cuernos y cuerpo), cérvix, vagina, vestíbulo vaginal y vulva. Estos órganos se encargan de producir los gametos y aportar el lugar y ambiente propicio para que se produzca la fertilización y gestación (Blanchard y col., 2003). Por otra parte, están los órganos que se encarga de la parte hormonal y control de los eventos reproductivos (glándula pineal, retina, hipotálamo e hipófisis) (Blanchard y col., 2003).

2.2.1.1 Ovarios

Los ovarios se encuentran suspendidos por el ligamento ancho en la cavidad abdominal, contra la pared dorsal a nivel de la quinta vértebra lumbar. Si bien varía a lo largo del ciclo, su tamaño promedio los 6 a 8 cm (McKinnon y col., 2011). Las yeguas presentan ovarios particularmente distintos a otras especies, la médula (vascular) está organizada superficialmente y la corteza (contiene los folículos) se encuentra en el interior. Por esta razón, la ovulación se produce a través de una fosa ovulatoria, único lugar en donde la corteza llega a la superficie del ovario (Blanchard y col., 2003).

Estos órganos cumplen una función exocrina (producción de gametos) y otra endocrina (producción de hormonas) (Cunninham, 2014).

2.2.1.2 Trompas Uterinas

Las trompas uterinas (trompas de Falopio), son dos órganos tubulares de aproximadamente 20-30cm. Cada tuba uterina está en relación con un ovario que lo conecta al cuerno uterino ipsilateral. Se divide en tres porciones: infundíbulo (la más próxima al ovario), la ampolla y el istmo (Blanchard y col., 2003).

En la última porción de la trompa uterina se encuentra la papila oviductal, estructura mediante la que se comunican la trompa uterina con el cuerno uterino. (Youngquist y Threlfall 2007). Esta estructura no solo comunica dos porciones del aparato reproductivo de la yegua, sino que oficia de reservorio para los espermatozoides previo al transporte a las trompas uterinas y además selecciona los espermatozoides morfológicamente normales, evitando el pasaje de los anormales (Blanchard y col., 2003).

El oocito es captado por la primer parte de las trompas de Falopio y transportado hacia la porción ampolla-istmo. Los espermatozoides llegan hasta la papila e ingresan a las trompas uterinas y se alojan en la unión ampolla istmo a la espera de un óvulo para realizar la fertilización (Youngquist y Threlfall, 2007).

En la yegua, los oocitos que no son fertilizados no llegan al útero, son retenidos en las trompas uterinas durante varios ciclos estrales. El oocito fertilizado, permanece en la trompa uterina durante el desarrollo embrionario inicial y luego de 6 días es transportado al útero (Youngquist y Threlfall, 2007).

2.2.1.3 Útero

El útero es el órgano que facilita el transporte espermático hacia el lugar de fecundación y brinda el lugar y el ambiente propicio para la recepción del embrión y gestación del feto. Está compuesto por dos cuernos que se unen mediante el ligamento intercornual, un cuerpo y un cuello (cérvix) (Youngquist y Threlfall, 2007).

La pared uterina, está formada por tres capas: el perimetrio, miometrio y endometrio. El perimetrio es la más externa, formada por una serosa. El miometrio, está formado por dos gruesas capas musculares (circular y longitudinal), separadas por una capa vascular. El endometrio es el estrato más interno, glandular y secretorio, que está en contacto con la luz uterina (Blanchard y col., 2003).

2.2.1.4 Cérvix

El cérvix es la porción más caudal del útero, cumple varias funciones durante el ciclo reproductivo. Mide aproximadamente 5 a 7,5 cm de largo y 2 a 4 cm de diámetro, aunque varía según la etapa del ciclo estral (Blanchard y col., 2003).

Su gruesa pared muscular permite su contracción, oficiando como una barrera física contra contaminantes externos y expansión para permitir el pasaje del pene del padrillo durante la cópula o del feto en el parto (Youngquist y Threlfall, 2007).

Internamente está tapizado por epitelio luminal con células secretoras. Estas producen moco durante el estro, que oficia como lubricante. Durante el diestro o preñez, el moco producido es mucho más espeso, para evitar el ingreso de bacterias o material extraño (Blanchard y col., 2003).

2.2.1.5 Vagina

La vagina es la parte más caudal del tracto reproductivo interno de la yegua. Se extiende horizontalmente en la cavidad pelviana y comunica el cuello uterino con el exterior (Youngquist y Threlfall, 2007).

Normalmente la luz vaginal está colapsada, excepto durante el pasaje del pene en la cópula y del potrillo en la parición. Su gran elasticidad hace que estos eventos puedan ocurrir sin que la mucosa se lesione (Blanchard y col., 2003).

2.2.1.6 Vestíbulo

El vestíbulo comienza en el estrechamiento vestíbulo vaginal, a nivel del orificio uretral externo y se extiende hasta los labios vulvares. Tiene una longitud aproximada de 10-12 cm (McKinnon y col., 2011).

Posee tanto en sus paredes como en el piso, fuertes músculos constrictores. Estas fibras de músculo estriado circular y longitudinal minimiza la entrada de material extraño y aire a partes craneales del tracto reproductivo (Youngquist y Threlfall, 2007). Además, posee glándulas secretoras de mucus, que lubrican la parte posterior del trato (Blanchard y col., 2003).

2.2.1.7 Vulva

La vulva se compone de dos labios y del clítoris (McKinnon y col. 2011). Es la abertura externa del tracto reproductivo de la hembra. Tiene una disposición vertical de unos 12-15 cm que comienza unos 5cm por debajo del orificio anal (Blanchard y col., 2003).

2.2.2 Histología endometrial

Como anteriormente fue mencionado, el útero está compuesto por perimetrio, miometrio y endometrio. En esta sección nos vamos a centrar en la histología endometrial. El endometrio está constituido por dos capas, el epitelio luminal y la lámina propia. El epitelio luminal está compuesto por células cuboides y columnares altas sobre una membrana basal, estas varían su altura de acuerdo al ciclo estral. La lamina propia se divide en un estrato compacto y otro esponjoso (Kenney, 1978). El estrato compacto (SC) se caracteriza por poseer una gran densidad de células ovaladas estromales. Estas células son irregulares, de gran tamaño y escaso citoplasma. Esta porción presenta además ductos glandulares que se abren a la luz uterina (Kenney, 1978). El estrato esponjoso (SS) posee una baja densidad de células unidas por fibras reticulares que le dan el aspecto esponjoso que le atribuye el nombre. En este estrato, también se aloja un gran número de capilares, arteriolas, vénulas y alguna pequeña arteria. También presenta un gran número de glándulas uterinas ramificadas que se conectan con la luz uterina a través de ductos que atraviesan el SS, el SC y el epitelio luminal (Barros y Masuda, 2009).

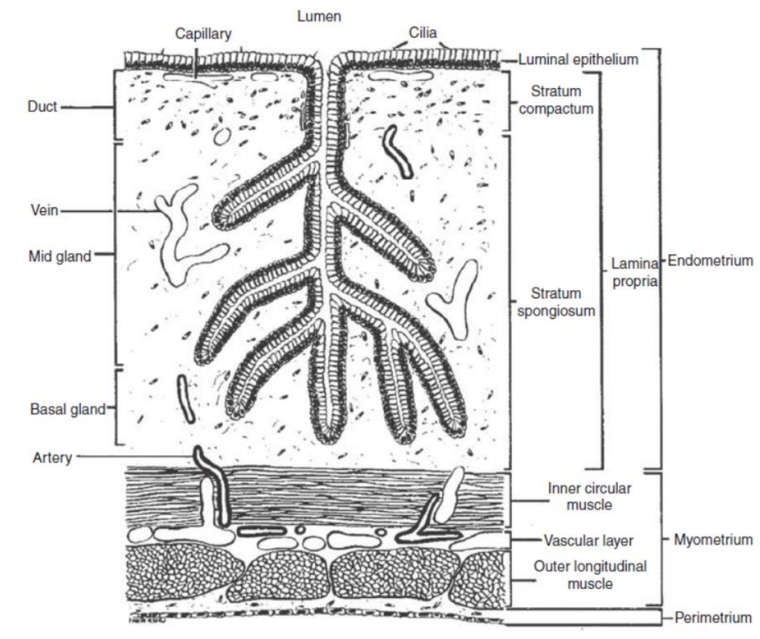

Figura 1. Esquema representativo de un corte del endometrio, miometrio y perimetrio (Kenney 1978).

Las alteraciones del endometrio pueden ser diversas: inflamaciones y sus secuelas, dilataciones glandulares, lagunas linfáticas, quistes glandulares, alteraciones causadas por traumatismos o abortos. Las inflamaciones endometriales y sus secuelas son las patologías más comúnmente encontradas en las biopsias (Barros y Masuda, 2009).

Las inflamaciones agudas se caracterizar por presentar un infiltrado intenso constituido principalmente por polimorfonucleares (PMNs) en la lámina propia. También se pueden encontrar PMNs en la luz glandular (Barros y Masuda, 2009).

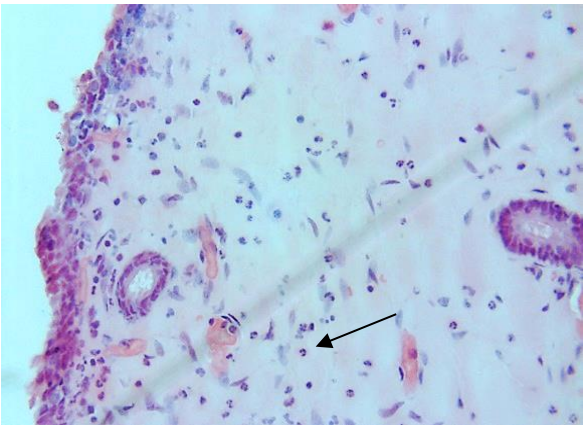

Figura 2. *Biopsia endometrial que exhibe un moderado infiltrado de PMNs (Neutrófilos (flecha)) en el estrato compacto y escasa densidad glandular. H&E. Aumento 200x (Muestra del cuerpo uterino, de la yegua número 693 del actual trabajo experimental).*

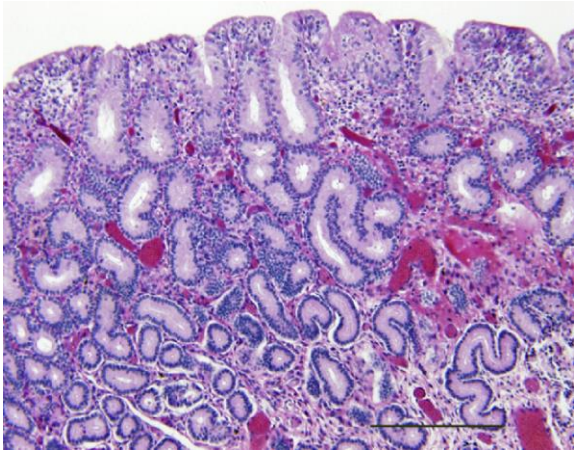

Figura 3. Biopsia endometrial que exhibe un moderado infiltrado de linfocitos y neutrófilos en el estrato compacto. H&E. (Snider y col., 2011)

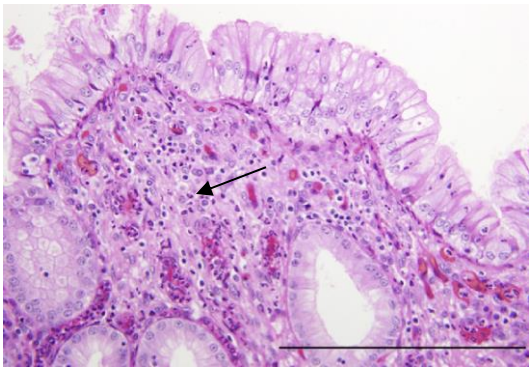

Figura 4. Biopsia endometrial que exhibe un infiltrado de PMNs (Neutrófilos (flecha)) en el estrato compacto. H&E. (Snider y col., 2011)

La inflamación crónica se caracteriza por presentar células inflamatorias mononucleares (linfocitos, plasmocitos, mastocitos y macrófagos), tanto en el SC como en el SS. Las inflamaciones crónicas también pueden presentar PMNs si estas se reagudizan.

La principal secuela que presenta la inflamación aguda que se hace crónica es la fibrosis endometrial. Esta puede ser: peri glandular abarcando solamente algunas glándulas aisladas, puede englobar a varias glándulas cercanas formando nidos, o extenderse por grandes áreas del endometrio disminuyendo la densidad glandular (Barros y Masuda, 2009)

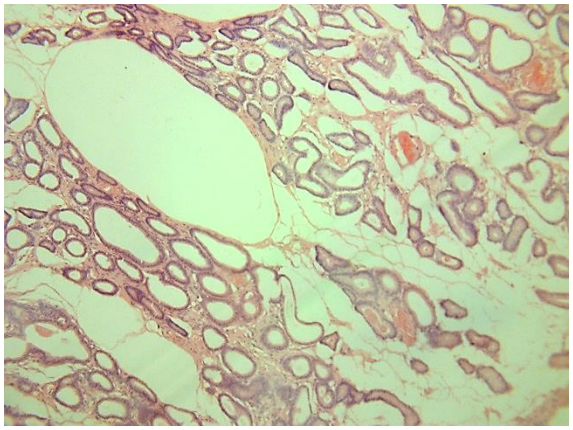

Figura 6. Biopsia endometrial que muestra fibrosis y dilatación glandular. H&E. Aumento 200x (Muestra del cuerno contralateral, de la yegua número 635 del actual trabajo experimental).

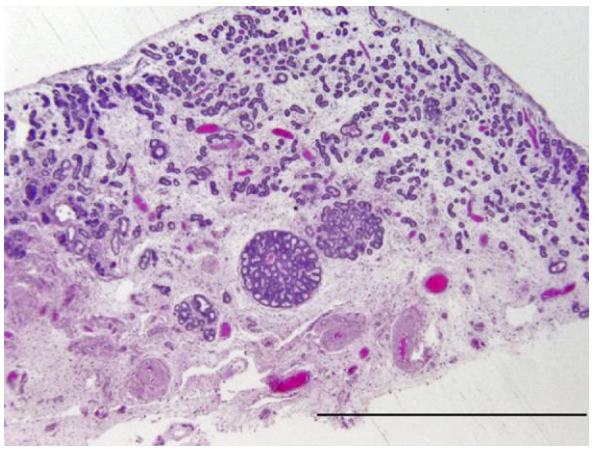

Figura 5. Biopsia endometrial que exhibe una disminución en la densidad glandular y un nido glandular en el estrato esponjoso. H&E. (Snider y col., 2011)

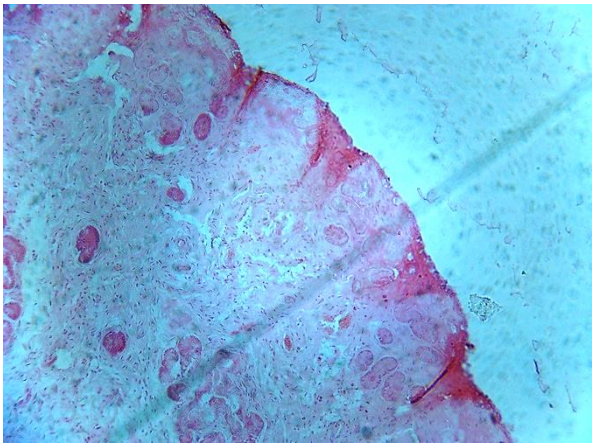

Figura 7. Biopsia endometrial de estrato compacto con fibrosis y baja densidad glandular. H&E. Aumento 200x (Muestra del cuerno ipsilateral, de la yegua número 701 del actual trabajo experimental).

2.2.3 Fisiología Reproductiva en la yegua

La reproducción en los equinos, como en las otras especies, está controlada por el sistema endocrino, más precisamente por el eje Hipotálamo-hipofisario-gonadal. La yegua presenta un ciclo reproductivo estral, poliéstrico estacional de día largo (primavera-verano) (Blanchard y col., 2003). El fotoperiodo es quien regula la estacionalidad reproductiva de esta especie, haciendo que sus partos se den en el momento más favorable para la supervivencia de su descendencia (Cortés y col., 2018).

El ciclo estral se define como el periodo entre una ovulación y la consecutiva. Se puede dividir en una fase folicular, en la que la yegua se vuelve receptiva al padrillo, ocurre la ovulación y su tracto reproductivo se prepara para la cópula y transporte espermático para que suceda la fertilización. La otra fase, luteal o diestro, el aparato reproductivo se prepara para recibir un embrión y gestar el feto (Blanchard y col., 2003). El ciclo en promedio dura 21 días, el estro normalmente tiene una extensión de 5-7 días y el periodo inter estral 14-16 días (Youngquist y Threlfall, 2007). El ciclo estral, está regulado por un delicado balance hormonal, dirigidos por la glándula pineal, hipotálamo, hipófisis, ovarios y endometrio (Blanchard y col., 2003).

2.2.3.1 Fotoperiodo

Como se expresó anteriormente, el ciclo reproductivo de esta especie está regulado por el fotoperiodo. Las yeguas perciben cambios en la duración diaria de luz, que a través de la glándula pineal lo transforman en señales endocrinas, interactuando con los principales órganos reguladores del ciclo (López y col., 2010). La glándula pineal responde a estímulos lumínicos captados por fotorreceptores ubicados en la retina con la producción de melatonina. Durante el otoño e invierno, la concentración de melatonina induce a una baja actividad del hipotálamo en la secreción de Hormona Liberadora de Gonadotrofina (GnRH), manteniendo al animal en un estado de anestro estacional (McKinnon y col., 2011). A medida que aumenta el fotoperiodo con la finalización del invierno, la secreción de melatonina comienza a disminuir, liberando al hipotálamo a un aumento en la secreción pulsátil de GnRH (Youngquist y Threlfall, 2007).

La GnRH estimula la síntesis y secreción a nivel hipofisario de hormonas gonadotróficas (hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH)). Estas dos hormonas producidas por la glándula (Blanchard y col., 2003) pituitaria, se vuelcan al torrente sanguíneo para dirigirse al órgano diana, los ovarios (McKinnon y col., 2011).

La FSH se encarga principalmente del reclutamiento folicular, mientras que la LH es responsable de la maduración del folículo, producción de estrógenos, la ovulación y la luteinización del cuerpo lúteo (Blanchard y col., 2003).

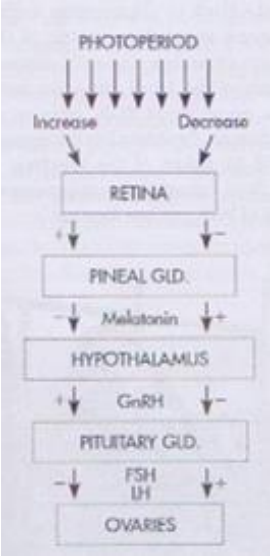

Figura 8. Esquema simplificado de la regulación hormonal del ciclo estral de la yegua.

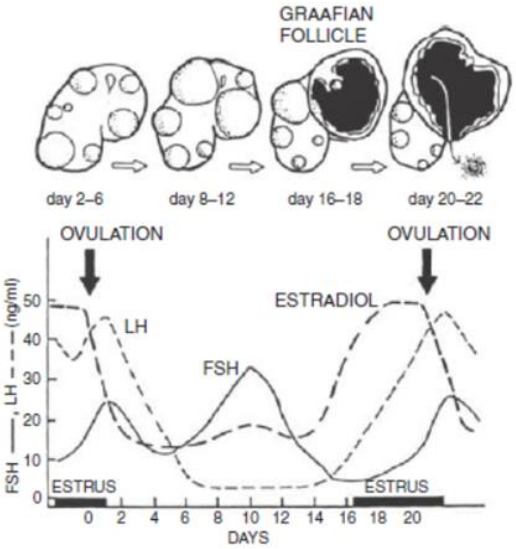

Figura 9. Patrón hormonal y evolución folicular durante el ciclo estral de la yegua. (McKinnon y col., 2011).

2.2.4 Examen reproductivo de la yegua

Para acercarse al éxito reproductivo, además del examen ginecológico es necesario realizar una evaluación general del animal. La edad, estado nutricional, conformación corporal y estado de salud en general, son importantes para determinar la aptitud como reproductora (McKinnon y col. 2011). El examen reproductivo propiamente dicho es crucial para garantizar el éxito.

2.2.4.1 Conformación perineal

La vulva y la vagina componen la primera barrera física contra microorganismos y materiales extraños. Evaluar su conformación es muy importante, para determinar la predisposición a infecciones uterinas (Tibary y Ruiz, 2018). La posición del ano, integridad del esfínter anal y la coaptación de los labios vulvares, pueden predisponer a aspiración de aire y materia fecal a la vagina. Muchos de los defectos de conformación se pueden resolver o beneficiar de la vulvoplastia mediante la realización de un Caslick (Youngquist y Threlfall, 2007).

2.2.4.2 Vaginoscopía

La vaginoscopía es una parte muy importante del examen rutinario del aparato reproductivo de la yegua. Realizado de buena manera aporta información útil de presencia de anormalidades y etapa fisiológica del ciclo estral (McKinnon y col., 2011).

La examinación interna mediante vaginoscopía permite evaluar la integridad del vestíbulo vaginal, vagina y orificio cervical externo. Permite detectar anormalidades como inflamaciones, fístulas recto-vaginales o laceraciones tanto de cérvix como vaginales, frecuentemente producidas durante el parto (Youngquist y Threlfall, 2007). Se pueden visualizar acumulaciones de moco, material purulento u orina (urovagina) y defectos como himen persistente, cervicitis, vaginitis y adhesiones, que comprometen la fertilidad (Blanchard y col., 2003).

2.2.4.3 Palpación rectal

La examinación interna del aparato reproductivo aporta información relevante tanto anatómica como de la etapa reproductiva en la que se encuentra. Para ello es necesario tener habilidad y destreza para la palpación y metodicidad a la hora examinar el aparato reproductivo (Youngquist y Threlfall, 2007).

Mediante la palpación de los ovarios se obtiene información de su tamaño, presencia y tamaño de folículos, cuerpos hemorrágicos y si los hubiese tumores y/o quistes (Youngquist y Threlfall, 2007). Durante el anestro invernal, los ovarios se palpan pequeños, firmes, con poca o nula actividad folicular. En la etapa de transición, los ovarios van aumentando la actividad y perdiendo firmeza (McKinnon y col., 2011).

El útero se localiza en la parte craneal del piso de la pelvis, y cae hacia la parte caudal de la cavidad abdominal (McKinnon y col., 2011). El útero no gestante, normalmente permite recorrerlo completamente, permitiendo estimar su tamaño y simetría (Blanchard y col., 2003). A lo largo del ciclo estral el útero va adquiriendo diferente tono y consistencia. Se correlaciona con la etapa del ciclo y con el desarrollo folicular en los ovarios. Esto junto con los datos obtenidos de la palpación de los ovarios, permite estimar la proximidad de la ovulación. El cérvix puede ser palpado durante prácticamente todo el ciclo. Al estar muy influenciado por la progesterona, los bajos niveles de progesterona durante el estro hacen que esté relajado y edematoso, haciendo difícil su palpación (Youngquist y Threlfall, 2007). Por el contrario, durante la gestación temprana el mismo se contrae haciéndose muy notorio al recorrer el piso de la pelvis (McKinnon y col., 2011).

2.2.4.4 Ultrasonografía

La ultrasonografía es una herramienta de mucha utilidad y proporciona ventajas al examen reproductivo, pero no suplanta la palpación rectal (McKinnon y col., 2011). Permite evaluar objetivamente el contenido, tamaño, edema del útero y el desarrollo folicular (Tibary y Ruiz, 2018).

Facilita el control folicular, pudiendo medir objetivamente el tamaño folicular, identificar folículos preovulatorios y estimar el momento de la ovulación, así como también diagnosticar la ovulación o fallas en la ovulación (McKinnon y col., 2011).

El control folicular, predicción del momento ovulatorio y diagnóstico de ovulación son puntos claves tanto para monta guiada o inseminación artificial. En inseminación artificial con semen congelado, el momento de la ovulación es crucial. Para lograr la fecundación se recomienda inseminar dentro de las 6 horas anteriores o posteriores a la ovulación (Samper y col., 2007).

La mayoría de los cambios en el tracto reproductivo de la hembra durante el ciclo son provocados por hormonas ováricas, principalmente estrógeno y progesterona. La ecografía transrectal permite detectar estos cambios en la morfología del tejido uterino (Samper y col., 2007).

La habilidad en la predicción de la ovulación, se mejora si además del tamaño folicular, se utiliza el edema endometrial. Para medir el edema endometrial se puede utilizar un score subjetivo que va de 0 a 5. El 0 se considera un útero sin edema, con una eco textura homogénea característica del diestro, en el lado opuesto un score 4 es el edema máximo normal. La puntuación 5 se utiliza para categorizar edemas excesivos y anormales, característicos de patologías (Samper y col., 2007).

2.2.4.5 Citología Endometrial

La endometritis persistente o crónica es una de las causas más importantes de reducción en la fertilidad y una de las patologías más frecuentes en la clínica equina (Troedsson, 1999). La citología endometrial es una técnica que se emplea con el fin de diagnosticar inflamación endometrial. Hoy en día es una práctica casi rutinaria entre los profesionales que se dedican a la reproducción equina, permite detectar yeguas que presentan endometritis y rápidamente tomar decisiones en el manejo (McKinnon y col., 2011)

Para realizar este procedimiento, se prepara a la yegua tal como se hace para realizar una IA. El uso de ropa, instrumental y técnica adecuada son necesarias para evitar la contaminación de la muestra. Existen dos formas de realizar el procedimiento, con un hisopo o cepillo y mediante lavados uterinos de bajo volumen (Card, 2005). La técnica del hisopo es la más utilizada, consiste en introducir un hisopo con una cobertura (para evitar la contaminación) en el tracto reproductivo de la hembra, una vez atravesado el cérvix se rompe la cobertura y se colecta la muestra pasando el hisopo por diferentes

zonas de la pared uterina (Card, 2005). Luego se pasa el hisopo sobre un portaobjetos para sembrar la muestra, se deja secar y se tiñe con una tinción rápida de Panóptico, la más utilizada por varios autores es Diff-Quik® (Blanchard y col., 2003; Card, 2005).

La técnica del lavado uterino de bajo volumen consiste en con una pipeta estéril de inseminación, difundir un volumen bajo (60ml) de solución salina bufferada dentro del útero. Luego masajeando el útero aspirar con la pipeta y recuperar parte de la solución difundida junto con células. Se coloca el líquido recuperado en un tubo vacío de 10ml y se centrifuga. Luego el sobrenadante se desecha, y el sedimento se resuspende en 1ml de solución bufferada y se coloca en portaobjetos. Se dejan secar y se tiñen utilizando la misma técnica anteriormente mencionada (Card, 2005; Cocchia y col.,2012).

El porcentaje de neutrófilos presente en la muestra de la citología endometrial, es utilizado para determinar el grado de inflamación. Un porcentaje menor a 5% se lo clasifica como no inflamatorio,5-15% inflamación media, 15-30% inflamación moderada y mayor a 30% inflamación severa (Card, 2005).

2.2.4.6 Biopsia endometrial

Es una herramienta diagnóstica muy valiosa para problemas reproductivos. Si bien es más invasiva que la citología endometrial, aporta mejor y más información (Gordon y Sartin 1978). Actualmente es la única herramienta que evalúa la integridad estructural del endometrio, considerando infiltrados inflamatorios, fibrosis y dilataciones de las glándulas endometriales (McKinnon y col., 2011).

Kenney, uno de los autores que dedicó mucho tiempo a la ciencia de la reproducción, y especialmente al estudio de la anatomía histológica del endometrio, propuso una clasificación según el grado de inflamación y cambios fibróticos del endometrio. Esto no solo facilitó la comunicación entre profesionales, sino que también ayudó a estimar la fertilidad de las yeguas. Kenney estableció 3 categorías, basados en la extensión y severidad de los cambios patológicos del endometrio (Kenney, 1978). La categoría I engloba a las yeguas que presentan un útero sano y sin inflamación. Se considera que los cambios histológicos de este grupo, no interfieren con la habilidad de llevar un feto a término. En el otro extremo, la clasificación III se considera a las yeguas cuyos endometrios presentan grandes cambios, con muy baja o nula capacidad de soportar una preñez y con muy poca respuesta a tratamientos (Kenney, 1978).

Para la categoría II, Doig y colaboradores propusieron agregar dos subcategorías IIA y IIB, para describir con mayor precisión los cambios histológicos que se encontraban entre la categoría I y III (Doig y col., 1981).

En otro estudio de Kenney, recolectó datos de 285 establecimientos que utilizaron la categorización anteriormente descrita, y lo relacionó con la tasa de parición, encontrando diferencias significativas entre las categorías. Para la categoría I 70-92% categoría II 50-67% y categoría III 4-10% (Kenney, 1978).

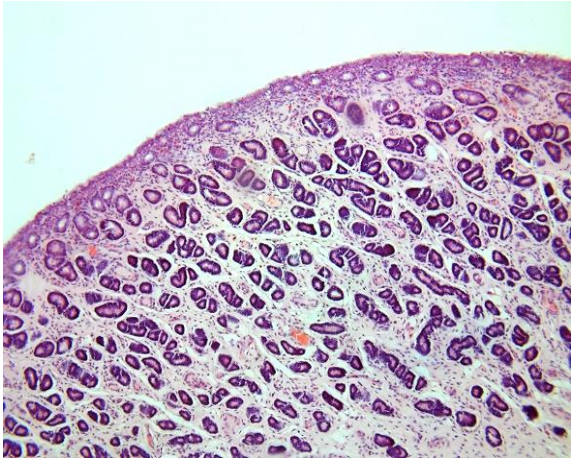

Figura 10 Útero categoría I (Muestra 777 del actual trabajo) Aumento 200x

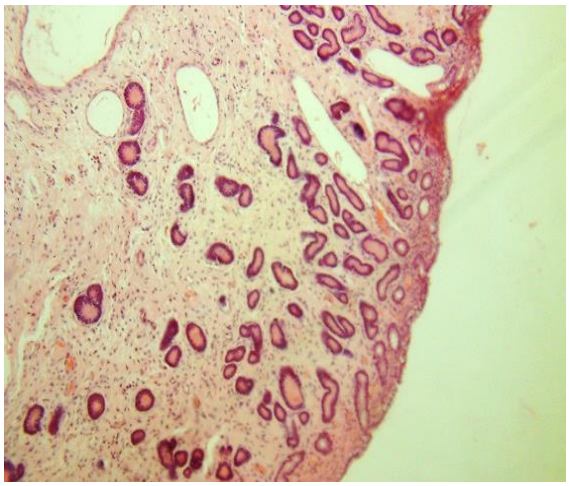

Figura 11. Útero categoría IIB(Muestra 701 del actual trabajo) Aumento 200x

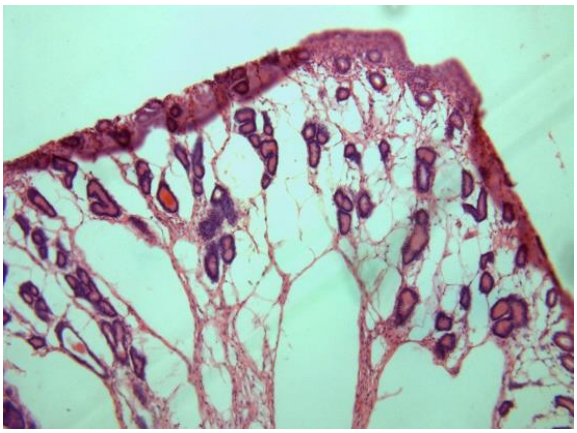

Figura 12. Útero categoría III (Muestra 728 del actual trabajo) Aumento 200x

2.3 Inflamación endometrial post cobertura

Tanto la monta natural como la IA, producen una inflamación y concentración de PMNs en el endometrio de la yegua (Troedsson y col 1995). La mayoría de los autores sostienen que son los espermatozoides y componentes del semen, quienes desencadenan la activación del complemento y atraen a los PMNs (Kotilainen y col., 1994, Troedsson y col., 1995). El pico de inflamación se produce entre las 8 y 24hs post cobertura, ya a los 30 minutos se pueden encontrar los primeros neutrófilos (Katila, 1995).

Las bacterias que se encuentran en la vagina, vestíbulo y fosa del clítoris, también contribuyen al desarrollo, exacerbación y permanencia de la inflamación, principalmente en yeguas susceptibles (Kotilainen y col., 1994). La presión negativa del útero hace que durante la monta, ingresen junto con el semen bacterias. En yeguas sanas (resistentes) la contaminación se resuelve a las 24hs (Troedsson, 1999), pero ya a las 6hs la contaminación bacteriana es mínima (Kotilainen y col., 1994). Las yeguas susceptibles, que tienen dificultad para realizar una correcta limpieza, no logran resolver la contaminación hasta las 96hs, quedando demasiado próximo a la entrada del embrión al útero (5 a 6 día post ovulación), poniendo en riesgo la sobrevida de este.

Los hallazgos de Troedsson y colaboradores, demostraron que los espermatozoides y el semen, son quienes desarrollan la reacción inflamatoria más que la contaminación bacteriana. Esto lo lograron mediante inseminaciones con semen libre de bacterias y plasma seminal, en la que igualmente encontraron células inflamatorias en los lavados uterinos (Troedsson y col., 1995). Esta reacción inflamatoria la asociaron a un mecanismo de defensa del útero, que junto con contracciones uterinas inducidas por oxitocina y prostaglandinas, intentan limpiar el útero de espermatozoides infértiles o no viables, plasma seminal y una posible contaminación bacteriana (Troedsson y col., 1995, Fiala 2017).

2.3.1 Efecto de los espermatozoides en el útero

Varios autores atribuyen la reacción inflamatoria del útero a la presencia de espermatozoides en él. Tyler y Cohen en diferentes especies, inseminaron con semen entero, obteniendo posteriormente una reacción inflamatoria, mientras que con semen libre de espermatozoides no hubo inflamación significativa (Tyler,1977, Cohen, 1984)

La introducción de espermatozoides durante la monta natural o inseminación artificial produce una respuesta inflamatoria en el útero de la yegua (Kotilainen y col., 1994). Esta es una respuesta transitoria contra los espermatozoides, para eliminar los muertos, dañados o no motiles (Katila, 2001), cesando 24-48 h posinseminación en yeguas no susceptibles (Katila, 1995).

La concentración de espermatozoides tiene efecto en el grado de inflamación que provoca. Inseminaciones con pequeño volumen y alta concentración de

espermatozoides provoca una mayor inflamación, tanto con semen fresco o congelado (Kotilainen y col., 1994).

El semen congelado produce una mayor respuesta inflamatoria que el semen fresco (Kotilainen y col., 1994). Reilas sugiere que la mayor reacción inflamatoria que provoca la IA con semen congelado podría disminuir las tasas de preñez (Reilas, 2001). Por otro lado Kotilainen sostienen que la leucocitosis inducida por los espermatozoides en yeguas normales no tiene efecto en la tasa de preñez (Kotilainen y col., 1994). Además, el mismo autor, alude a la idea de que inseminaciones repetidas cada 24hs con semen congelado no tienen un efecto negativo en la tasa de concepción (Kotilainen y col., 1994).

2.3.2 Efecto del plasma seminal en el útero

Algunos estudios demuestran que el plasma seminal no produciría una neutrofilia en el endometrio (Cohen, 1984). A pesar de esto, otros autores si obtuvieron un recuento considerable de neutrófilos en el útero, y lo atribuyen a un mal centrifugado y presencia de espermatozoides en el plasma seminal (Kotilainen y col., 1994). A los hallazgos de Kotilainen y col (1994), se le suman los resultados obtenidos por Fiala y col (2007), que si encontraron presencia de PMNs en la luz uterina luego de la infusión de plasma seminal.

Si bien el plasma seminal produce cierta concentración de PMNs en la luz uterina, Troedsson y col (1999) sugieren que modula y reduce la reacción inflamatoria producida por los espermatozoides (Troedsson y col., 1999). Otros estudios revelan que el plasma seminal suprime marcadamente la opsonización e inhibe la activación de la cascada del complemento. Esto evita temporalmente la actividad fagocítica de los PMNs hacia los espermatozoides (Dahms y Troedsson, 2002).

2.3.3 Efecto del número de espermatozoides en el útero

El número de espermatozoides también afecta el grado de inflamación que se produce. Autores como Fiala y col. (2007) y Kotilainen y col. (1994), en sus respectivos estudios obtuvieron mayores reacciones inflamatorias en el endometrio, cuando inseminaron con altas concentraciones y bajo volumen. Kotilainen utilizó diferentes dosis de semen fresco y congelado, provocando siempre una reacción inflamatoria de mayor grado al utilizar concentraciones más altas de espermatozoides. Por el otro lado, Fiala, inseminó con semen refrigerado con diferentes números totales de espermatozoides ($100x10^6$ spz, $500x10^6$ spz y $1000x10^6$ spz), y obtuvo resultados similares a Kotilainen (Kotilainen y col., 1994 y Fiala y col., 2007).

Gomes y colaboradores en su estudio, encontraron al igual que otros autores, una relación directa entre la cantidad de PMNs presente en el endometrio de la yegua y el número de células espermáticas inseminadas. En este caso, utilizaron semen congelado a concentraciones de $800x10^6$ y $40x10^6$ espermatozoides (Gomes y col., 2019).

2.3.4 Efecto de la técnica y sitio de inseminación en el útero

Existen varias técnicas de inseminación artificial. La estándar en el cuerpo del útero, profunda en la punta del cuerno ipsilateral al folículo dominante o mediante histeroscopia depositando el semen en la papila uterotubárica ispilateral al folículo dominante (Youngquist y Threlfall, 2007).

La inseminación profunda en el cuerno produce una menor reacción inflamatoria que la IA en el cuerpo del útero, siendo este efecto más notorio al disminuir la dosis inseminante (Guvenc y col., 2005; Samper y Plough, 2010; Cazales y col., 2018).

La acumulación de fluido intrauterino es un indicador de endometritis postcobertura, dificultando la preñez. Yeguas inseminadas en la punta del cuerno con una dosis baja de semen congelado ($20x10^6$), acumulan menos fluido intrauterino que otros grupos de yeguas inseminados con mayores dosis y en el cuerpo del útero (Guvenc y col., 2005).

Gomes realizó un estudio similar, pero comparando la inseminación mediante histeroscopia. Obtuvieron mayores reacciones inflamatorias en la inseminación histeroscópica, aun cuando utilizaron dosis bajas de espermatozoides. Esto lo asociaron a la manipulación durante la histeroscopia y no tanto al lugar en donde depositaron el semen (Gomes y col., 2019).

Sieme y col. (2004) estudiaron las diferencias en las tasas de preñez de yeguas sanas y yeguas problemas utilizando diferentes técnicas de inseminación artificial. Al usar semen fresco, las yeguas problemas demostraron un descenso en la tasa de preñez con la inseminación mediante histeroscopia, comparado con la técnica tradicional en el cuerpo del útero. Sin embargo en la yeguas sanas ocurrió exactamente lo contrario. Al utilizar la técnica profunda guiada transrectalmente en yeguas problemas, también obtuvieron tasas de preñez menores que las obtenidas con la técnica tradicional (Sieme y col., 2004).

3. HIPÓTESIS

La reacción inflamatoria resultante de la inseminación artificial con semen congelado, es dependiente del sitio de inseminación, de la dosis de inseminación y del tiempo post-inseminación.

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 de la reacción inflamatoria endometrial utilizando diferentes dosis y sitio de inseminación.

4.2 Específicos

Verificar si el número total de espermatozoides inseminados (dosis) y el sitio de inseminación afectan la cantidad de PMNs presentes en la luz uterina a las 2, 4 y 12 h posinseminación con semen congelado.

Verificar si el número total de espermatozoides inseminados (dosis) y el sitio de inseminación afectan la cantidad de PMNs presentes en el estrato compacto y esponjoso del endometrio uterino a las 2, 4 y 12 h posinseminación con semen congelado.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

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

5.1 Lugar y duración

El proyecto de investigación fue realizado en un Frigorífico Equino (34°S, 56°O) de la República Oriental del Uruguay, en el departamento de Canelones. Se llevo a cabo durante los meses de octubre a marzo, de tres temporadas consecutivas, comprendidas entre los años 2014 y 2017.

5.2 Animales

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

Se utilizaron 105 yeguas mestizas, cíclicas con destino a faena. Tenían una condición corporal mínima de 3 (Hennecke y col., 1983, modificada por Malshitzky, 1998) y estaban clínicamente saludables. El rango de edad fue de 3 a 25 años (media de 10,5 años) y el peso varió entre 340 y 560kg (media de 452kg).

5.3 Colecta y congelamiento del semen

El semen fue colectado con vagina artificial modelo Hannover. Luego de la colecta los eyaculados fueron diluidos y evaluada su motilidad, concentración y morfología espermática. Aquellos eyaculados que reunieron características aceptables, concentración espermática ≥ $200x10^6$ espermatozoides/mL, motilidad progresiva >50% y más de 70% de espermatozoides morfológicamente normales fueron procesados para su congelamiento (Kalmar et al. 2014). El semen fue congelado en pajuelas de 0,5 mL a una concentración de $100x10^6$ espermatozoides/mL ($50x10^6$ espermatozoides totales por pajuela) utilizando un diluyente comercial (Botucrio®, Botupharma, Botucatú, Brasil) según las indicaciones del fabricante. Por cada eyaculado congelado, tres pajuelas fueron descongeladas en baño maría a 37°C por 30 segundos y analizadas por sistema computarizado CASA (AndroVision®, Minitüb, Tiefenbach, Alemania). Solo se utilizaron las muestras que tuvieron más de 35% de espermatozoides con motilidad progresiva posdescongelado. El padrillo presentó congelabilidad superior al 90%.

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

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

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

5.4 Examen Ginecológico

Todas las yeguas utilizadas en el experimento fueron sometidas a un examen ginecológico (Mattos et al., 1984), antes de ser incluidas en los grupos experimentales. El día previo a la faena las yeguas fueron sometidas a palpación y ecografía transrectal (Curnow, 1991). Las yeguas cíclicas con buena conformación vulvar, comportamiento de celo, sin contenido uterino, que presentaran imagen ecográfica uterina compatible con estro, tono uterino y cérvix compatible con celo, ausencia de cuerpo lúteo funcional y folículos ≥ 33 mm de diámetro fueron seleccionadas para el experimento.

Las yeguas seleccionadas fueron sometidas a un examen citológico del lumen uterino luego de una cuidadosa limpieza del área perineal con agua potable y detergente neutro, finalizando la limpieza con una solución jabonosa liquida con clorhexidina al 2%, se enjuagó y se secó con papel de cocina.

Luego de higienizada la región perineal se procedió a tomar la muestra de citología endometrial mediante el uso de cepillos ginecológicos estériles (Cito-Brush®, Juvaquez, España), utilizando dispositivo para toma de muestras citológicas (Botupharma, Botucatú, Brasil), evitando la contaminación por el ambiente vestibular, vaginal y cervical (Mattos et al, 1984). Una vez tomada la muestra, el cepillo fue rodado suavemente sobre la superficie de un portaobjeto, se dejó secar al aire y se coloreó con tinción de Panóptico Pappenheim (Diff-Quik®, Baxter Health Care, Miami, USA) para posteriormente ser evaluado microscópicamente en búsqueda de PMNs. Sólo fueron utilizadas en el experimento yeguas sin presencia de PMNs al examen citológico.

5.5 Diseño Experimental

Las yeguas seleccionadas fueron aleatoriamente inseminadas en el cuerpo del útero (Body) o en la punta del cuerno ipsilateral al folículo dominante (Tip) con una pajuela de 0,5mL ($50x10^6$ espermatozoides totales) o con ocho pajuelas de 0,5mL ($400x10^6$ espermatozoides totales). La inseminación en la punta del cuerno se realizó de manera transvaginal, pasando el cérvix con una pipeta flexible atraumática de 75cm de largo

(Minitüb, Tiefenbuch, Alemania) que fue guiada transrectalmente hasta la punta del cuerno uterino, mientras que la inseminación convencional en el cuerpo del útero se realizó de manera transcervical con una pipeta de inseminación flexible atraumática de 57cm de largo (Minitüb, Tiefenbuch, Alemania), corroborando transrectalmente la ubicación de la punta de la pipeta en la mitad del cuerpo uterino. Una vez realizada la inseminación, las yeguas fueron humanitariamente sacrificadas a las 2, 4 y 12 h posinseminación, quedando conformados los siguientes grupos: **BODY 50** – Inseminación en el cuerpo del útero con una dosis de $50x10^6$ espermatozoide **2 h** (n=6), **4 h** (n=6) y **12 h** (n=7); **TIP 50** – Inseminación en la punta del cuerno con una dosis de $50x10^6$ espermatozoide **2 h** (n=12), **4 h** (n=9) y **12 h** (n=8); **BODY 400** – Inseminación en el cuerpo del útero con una dosis de $400x10^6$ espermatozoide **2 h** (n=8), **4 h** (n=6) y **12 h** (n=6) y **TIP 400** – Inseminación en la punta del cuerno con una dosis de $400x10^6$ espermatozoide **2 h** (n=7), **4 h** (n=7) y **12 h** (n=7). Se utilizó un grupo control (n=16) de yeguas que no fueron inseminadas (Tabla 2).

Tabla 2 Diseño experimental.

Lugar de la IA	NTE ($X10^6$)	N° Pajuelas	Vol (mL)	Yeguas		
				2h	4h	12h
BODY	50	1	0.5	6	6	7
BODY	400	8	4	8	6	6
TIP	50	1	0.5	12	9	8
TIP	400	8	4	7	7	7
Grupo control	0	0	0	16		
Total	-	-	-	105		

BODY = Cuerpo uterino; **TIP** = Punta del cuerno uterino; **NTE** = Número total de espermatozoides; **IA** = Inseminación artificial; **N°** = número; **Vol** = volumen; **h** = horas posinseminación.

5.6 Colecta y procesamiento de las muestras

Una vez realizado el sacrificio, al momento de la retirada de vísceras en la línea de faena, se recuperaron los órganos reproductivos (cérvix, útero, trompas uterinas y ovarios) y se identificó a que yegua y grupo experimental pertenecía. Los úteros se lavaron con 50mL de PBS (solución salina fosfatada tamponada) 0,1 M pH 7,4, introduciendo una sonda Foley (24 FR) por la punta del cuerno derecho, estando obliteradas las aberturas de cérvix y punta del cuerno izquierdo con pinzas hemostáticas. Se recuperó una alícuota del líquido del lavado previamente homogeneizado, para el posterior contaje de PMNs en la cámara de Neubauer®. Cada PMN contado en la cámara de Neubauer® corresponde a $10x10^3$ PMNs/mL.

5.7 Histología Endometrial

Se tomaron tres muestras endometriales de $1cm^2$ de cada útero con la ayuda de una tijera de cirugía (Kenney, 1978). Una muestra del cuerpo del útero y una muestra de cada

cuerno uterino. Las muestras fueron fijadas en una solución de formol salino bufferado al 4% (v/v) por 48hs y lavadas en alcohol 70%. Las láminas fueron procesadas en el laboratorio Historep de la Universidad Federal de Pelotas, Brasil, con la técnica de hematoxilina eosina y acido periódico de Schiff (PAS). Luego de confeccionadas las láminas con las muestras histológicas, se realizó la lectura a través de microscopia óptica de luz a 200x, 400x y 1000x (Olympus, BX60). Se evaluó el número de células inflamatorias (PMNs) en el stratum compactum (SC) y stratum spongiosum (SS). De cada muestra se analizaron 5 campos a 400x en el SC y 5 campos a 400x en el SS, y se hizo promedio del número de PMNs por campo, para establecer el grado de inflamación provocado por el tratamiento empleado en cada yegua. Las muestras clasificadas como IIB y III fueron excluidas del trabajo (Kenney, 1978; Doig y col., 1981).

5.8 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron evaluados utilizando el Software estadístico Graph Pad Prism Version 8.0.2 (San Diego, CA, USA). Se empleó un análisis de varianza de dos vías (two-way ANOVA). Como variables independientes se consideraron la dosis de inseminación (50 o 400), el sitio de inseminación (punta del cuerno o cuerpo del útero) y el tiempo posinseminación (2, 4 o 12 h), mientras que el número de PMNs en los lavados y en el SC y SS se consideraron como variables dependientes. Diferencias de Probabilidades < 0,05 fueron consideradas significativas. Probabilidades entre 0,05 y 0,09 fueron consideradas tendencia. Los datos fueron presentados como media ± error estándar (EE).

6. RESULTADOS

6.1 Lavados Uterinos

La media de PMNs encontrados en los lavados uterinos de las 16 yeguas del grupo control fue de $0,34x10^6 \pm 0,13x10^6$ PMNs (Tabla 3). Las yeguas inseminadas tuvieron mayor número de PMNs ($P < 0,05$) que las yeguas del grupo control con excepción de las yeguas del grupo B50 a las 2 h, T50 a las 4 h y T400 a las 12 h ($P > 0,05$) (Tabla 3).

Tabla 1. Media (± EE) de PMNs ($x10^6$) en los lavados uterinos de las yeguas control y de las yeguas inseminadas en la punta del cuerno (Tip) y en el cuerpo del útero (Body) con $50x10^6$ y $400x10^6$ de espermatozoides a las 2, 4 y 12 horas posinseminación.

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

Presencia de asterisco (*) representa valores que se diferencian estadísticamente ($P < 0,05$) del grupo control. Body 50 = IA en el cuerpo del útero con $50x10^6$ de espermatozoides; Tip 50 = IA en la punta del cuerno con $50x10^6$ de espermatozoides; Body 400 = IA en el cuerpo del útero con $400x10^6$ de espermatozoides; Tip 400 = IA en la punta del cuerno con $400x10^6$ de espermatozoides.

El tiempo ($P=0,024$) y el sitio de inseminación ($P=0,001$) tuvieron diferencias significativas, influyendo en el número de PMNs recuperados en los lavados uterinos, pero no hubo relación tiempo/sitio ($P = 0,270$). Hubo una mayor reacción inflamatoria a las 4 h posinseminación en el grupo de las yeguas inseminadas en el cuerpo del útero ($P = 0,009$), en relación a las yeguas inseminadas en la punta del cuerno. Las yeguas que fueron inseminadas en el cuerpo del útero obtuvieron un número mayor de PMNs a las 4 h, en relación a las 2 h y 12 h. En las yeguas inseminadas en la punta del cuerno no se encontraron diferencias en la cantidad de PMNs entre ninguna de las horas evaluadas (Figura 13 A).

En el líquido recuperado de los lavados uterino, se observó que la dosis ($P < 0,001$) y el tiempo ($P = 0,001$) postinseminacion tuvieron influencia en el número de PMNs, habiendo una relación tiempo/dosis ($P < 0,001$). A las 2 y 4 h se obtuvo una mayor reacción inflamatoria en las yeguas inseminadas con $400x10^6$ espermatozoides ($P < 0,003$) en comparación a las yeguas inseminadas con $50x10^6$, mientras que las 12 h

posinseminación ocurrió lo inverso, apreciándose un mayor número de PMNs en los lavados uterinos de las yeguas inseminadas con $50x10^6$. En el grupo de las yeguas inseminadas con $50x10^6$ espermatozoides, se recuperó un mayor número de PMNs en la luz uterina a las 4 y 12 h ($P < 0,001$) en comparación a las 2 h, no apreciándose diferencias significativas entre las 4 y 12 h ($P > 0,09$). En las yeguas inseminadas con una dosis de $400x10^6$ se obtuvo una mayor reacción inflamatoria a las 2 y 4 h ($P < 0,05$) que a las 12h posinseminación, no habiendo diferencia entre 2 y 4 h posinseminación (Figura 13 B).

Se apreció una influencia tanto de la dosis ($P = 0,001$) como el lugar de inseminación ($P = 0,003$) en la respuesta inflamatoria provocada. En la inseminación en la punta del cuerno se obtuvo una mayor inflamación ($P < 0,001$) en las yeguas inseminadas con $400x10^6$ espermatozoides en relación a las yeguas inseminadas con $50x10^6$. Se aprecia una tendencia ($P = 0,086$) de una mayor respuesta inflamatoria en las yeguas inseminadas con $400x10^6$ en comparación a las yeguas inseminadas con $50x10^6$, cuando se utilizó la técnica convencional de inseminación en el cuerpo del útero. Si comparamos entre sí ambos sitios de inseminación para cada dosis inseminante, no se apreciaron diferencias en la cantidad de PMNs encontrados en los lavados uterinos de las yeguas inseminadas en la punta del cuerno y en el cuerpo del útero con una dosis de $400x10^6$ espermatozoides ($P > 0,09$). Cuando se inseminó con una dosis de $50x10^6$, sí se observó una mayor reacción inflamatoria en las yeguas inseminadas en el cuerpo ($P = 0,039$) que en las inseminadas en la punta del cuerno (Figura 13 C).

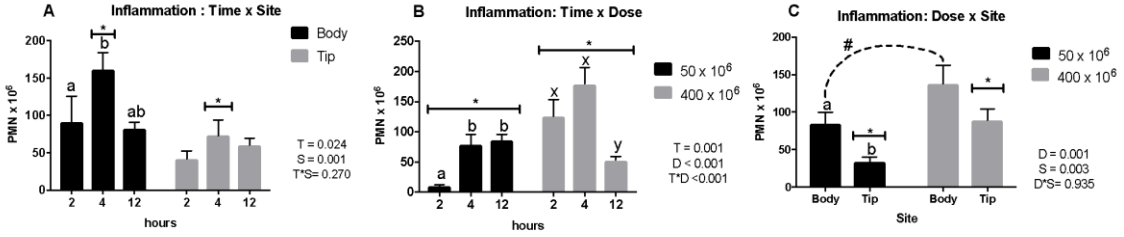

Figura 13 Media de PMNs (± EE) recuperados en los lavados uterinos con relación al (A) Tiempo y Sitio de inseminación; (B) Tiempo y Dosis de inseminación y (C) Dosis y Sitio de inseminación. Asterisco (*) Representa diferencias ($P < 0,05$) entre grupos; (a, b) y (x,y) representan diferencias ($P < 0,05$) dentro de los grupos; Numeral (#) representa una tendencia estadística entre grupos ($p = 0,086$). Body = IA en el cuerpo del útero; Tip = IA en la punta del cuerno; T = tiempo; S = sitio; D = dosis.

6.2 Estrato Compacto

La inseminación en las yeguas independientemente de la dosis y del sitio, provocó un aumento en el número de PMNs en el estrato compacto a las 12 h posinseminación en todos los grupos, comparado con las yeguas del grupo control ($P < 0,05$). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre las 2 y 4h posinseminación, donde solamente se obtuvieron diferencias significativas con el grupo control en los grupos Tip 50 a las 2 h y Body 50 a las 4 h ($P < 0,05$) (Tabla 4).

Tabla 2. Media (± EE) de PMNs/campo observados en el estrato compacto de las yeguas del grupo control y de las yeguas inseminadas en la punta del cuerno (Tip) y en el cuerpo del útero (Body) con $50x10^6$ (50) y $400x10^6$ (400) de espermatozoides a las 2, 4 y 12 horas posinseminación

Tratamiento		Tiempo		
		2h	4h	12h
Control	2,8 ± 0,8*			
Body 50		4,8 ± 0,50	12,1 ± 5,10*	14,5 ± 1,90*
Tip 50		12,8 ± 1,6*	8,2 ± 2,3	13,7 ± 0,60*
Body 400		4,8 ± 0,70	4,4 ± 0,90	29,5 ± 6,0*
Tip 400		4,8 ± 0,80	4,4 ± 0,80	27,4 ± 5,40*

El asterisco (*) representa valores con diferencias significativas (P < 0,05) con respecto al grupo control. Body 50 = IA en el cuerpo del útero con $50x10^6$ de espermatozoides; Tip 50 = IA en la punta del cuerno con $50x10^6$ de espermatozoides; Body 400 = IA en el cuerpo del útero con $400x10^6$ de espermatozoides; Tip 400 = IA en la punta del cuerno con $400x10^6$ de espermatozoides.

El sitio de inseminación no influyó sobre la cantidad de PMNs presente en el estrato compacto (P = 0,174), pero sí hubo diferencias en cuanto al tiempo posinseminación, observándose una mayor reacción inflamatoria a las 12 h (P < 0,05) comparado con 2 y 4 h posinseminación, en ambos sitios, punta del cuerno y cuerpo del útero (Figura 14 A).

En cuanto a la dosis, tampoco hubo un aumento significativo del número de PMNs en el estrato compacto (P = 0,991) al aumentar la dosis de $50x10^6$ a $400x10^6$, pero si hubo diferencias al comparar la dosis con el tiempo posinseminación (P < 0,001). A las 12 h se obtuvo una mayor reacción inflamatoria que a las 2 y 4 h posinseminación, en las yeguas inseminadas con $400x10^6$ espermatozoides. Cuando se inseminó con $50x10^6$ espermatozoides la reacción inflamatoria fue mayor a las 12 h en comparación a las 4h (P < 0,05), no encontrándose diferencias a las 2 h posinseminación. Si tomamos el número de PMNs a las 2 y 4 h posinseminación, no se hallaron diferencias (P > 0,09), entre los grupos, independientemente de la dosis utilizada (Figura 14 B).

Tanto la dosis (P = 0,966) como el sitio (P = 0,745) de inseminación no influyeron en la reacción inflamatoria provocada en el estrato compacto. No se encontraron diferencias significativas en el número de PMNs en el estrato compacto, durante las primeras 12 h posinseminación (Figura 14 C).

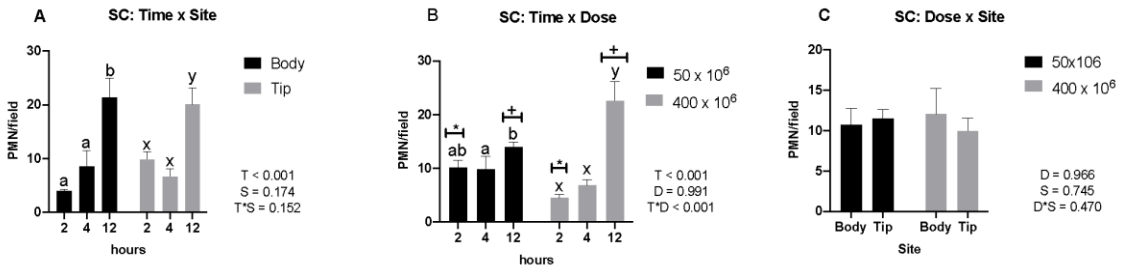

Figura 14. Media de PMNs/campo (± EE) observados en el estrato compacto (SC) del endometrio con relación al (A) Tiempo y Sitio de inseminación; (B) Tiempo y Dosis de inseminación y (C) Dosis y Sitio de inseminación. El asterisco (*) representa diferencias (P < 0,05) entre grupos; (a, b) y (x,y) representan diferencias (P < 0,05) dentro de los grupos; Body = IA en el cuerpo del útero; Tip = IA en la punta del cuerno; SC = stratum compactum; T = tiempo; S = sitio; D = dosis.

6.3 Estrato Esponjoso

En el estrato esponjoso se observó un mayor número de PMNs a las 12 h comparado con las yeguas del grupo control (P < 0,05), en todos los grupos inseminados, a excepción del grupo Tip 400. Por otro lado, a las 2 y 4 h posinseminación no se encontraron diferencias significativas, solamente los grupos Tip 50 a las 2 h y Body 400 a las 4 h se registraron mayores números de PMNs (P < 0,05) en el estrato esponjoso, en comparación con las yeguas del grupo control (Tabla 5).

Tabla 3. Media (± EE) de PMNs/campo observados en el estrato esponjoso de las yeguas del grupo control y de las yeguas inseminadas en la punta del cuerno (Tip) y en el cuerpo del útero (Body) con $50x10^6$ (50) y $400x10^6$ (400) de espermatozoides a las 2, 4 y 12 horas posinseminación.

Tratamiento		Tiempo		
		2h	4h	12h
Control	1,7 ± 0,5*			
Body 50		3,1 ± 1,10	6,3 ± 2,2	9,30 ± 1,50*
Tip 50		7,3 ± 1,70*	2,9 ± 0,80	11,20 ± 1,20*
Body 400		3,8 ± 0,60	2,4 ± 0,60*	10,80 ± 1,70*
Tip 400		2,7 ± 0,50	6,1 ± 0,70	5,70 ± 1,20

El asterisco (*) representa valores con diferencias significativas (P < 0,05) con respecto al grupo control. Body 50 = IA en el cuerpo del útero con $50x10^6$ de espermatozoides; Tip 50 = IA en la punta del cuerno con $50x10^6$ de espermatozoides; Body 400 = IA en el cuerpo del útero con $400x10^6$ de espermatozoides; Tip 400 = IA en la punta del cuerno con $400x10^6$ de espermatozoides.

En el estrato esponjoso el sitio de inseminación no influyo en el número de PMNs (P = 0,827), pero sí lo hizo el tiempo posinseminación (P < 0,001). Tampoco hubo una relación Tiempo por Sitio (P = 0,240). Las yeguas inseminadas en el cuerpo del útero, tuvieron una mayor reacción inflamatoria a las 12 h (P < 0,001), comparado con las yeguas 2 y 4 h posinseminación. Se encontró una mayor reacción inflamatoria en las yeguas inseminadas en la punta del cuerno a las 12 h (P < 0,001) en relación con las de 4 h,

pero no hubo diferencia a las de 2 h (P > 0,09) posinseminación. Si comparamos el número de PMNs en el estrato esponjoso a las 2 y 4 h posinseminación, no se hallaron diferencias entre los grupos, independientemente del sitio de inseminación (Figura 15 A).

La dosis inseminante no tuvo influencia en el número de PMNs hallados en el estrato esponjoso (P= 0,059). Tampoco hubo relación Tiempo/Dosis (P=0,358). Se observo una tendencia (P=0,069) a las 2 h posinseminación, habiendo una mayor reacción inflamatoria en las yeguas inseminadas con una dosis de $50x10^6$ espermatozoides, en comparación con las yeguas inseminadas con $400x10^6$ espermatozoides. En general en el estrato esponjoso, se obtuvo una mayor reacción inflamatoria a las 12 h (P < 0,05) en relación con las yeguas 2 y 4 h posinseminación, independientemente de la dosis utilizada (Figura 15 B).

En el estrato esponjoso tanto la dosis (P= 0,130) como el sitio (P= 0,958) no influyeron en el número de PMNs en las primeras 12 h posinseminación (Figura 15 C).

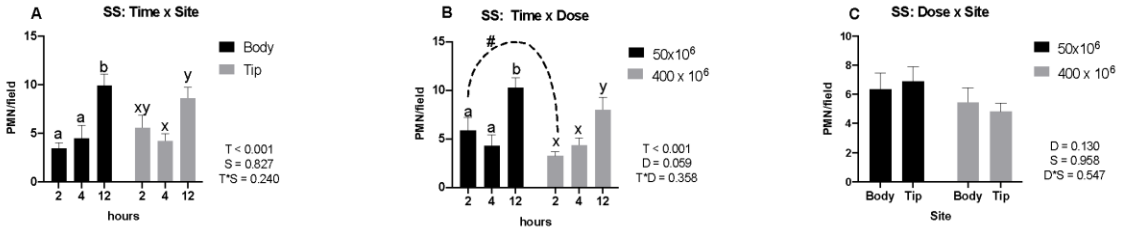

Figura 15. Media de PMNs/campo (± EE) observados en el estrato esponjoso del endometrio con relación al (A) Tiempo y Sitio de inseminación; (B) Tiempo y Dosis de inseminación y (C) Dosis y Sitio de inseminación. (a, b) y (x,y) representan diferencias (P < 0,05) dentro de los grupos; Numeral (#) representa una tendencia estadística entre grupos (P = 0,069). Body = IA en el cuerpo del útero; Tip = IA en la punta del cuerno; SS = stratum spongiosum; T = tiempo; S = sitio; D = dosis

7. DISCUSIÓN

La presencia de PMNs en la luz uterina es indicativo de inflamación (Knudsen, 1964). En este estudio se observaron algunos PMNs en las yeguas del grupo control seguramente debido a la realización del examen citológico previo, concordando con lo hallado por Williamson y col. (1987), quienes observaron neutrofilia transitoria luego de la manipulación del cérvix y el útero. Por otro lado, Mattos y col. (1984), empleando la misma técnica utilizada en este trabajo, no detectaron presencia de PMNs al examen citológico utilizando un hisopo intrauterino, lo que confirma lo encontrado por Ball y col. (1988), en que la técnica del lavado uterino permitió un mejor muestreo para examen citológico y bacteriológico que el hisopo intrauterino. Este seguramente sea el motivo de porque el lavado uterino detecto algunos PMNs en las yeguas del grupo control a diferencia del hisopo intrauterino.

La inseminación artificial en las yeguas por el contacto de los espermatozoides con las paredes del endometrio, provocó una reacción inflamatoria, comparado con las yeguas del grupo control. Esto concuerda con los hallazgos de otros autores (Cohen, 1984; Kotilainen y col., 1994; Fiala y col., 2007).

Al analizar el efecto sitio de inseminación sobre la reacción inflamatoria, hasta las 12 h posinseminación, se observó una menor respuesta inflamatoria en las yeguas inseminadas en la punta del cuerno comparada con las inseminadas en el cuerpo del útero. Esta diferencia fue detectada cuando se utilizó la dosis baja mientras que con la dosis alta no hubo diferencias en la reacción inflamatoria entre inseminar en la punta del cuerno o en el cuerpo del útero. Probablemente, al inseminar en la punta del cuerno ocurre un menor contacto de los espermatozoides con la superficie del endometrio, lo que produciría una menor reacción inflamatoria en la luz uterina. Cuando la reacción inflamatoria fue evaluada a las 24 h posinseminación en yeguas normales con semen congelado, no se observaron diferencias entre inseminar con semen congelado en la punta del cuerno o en el cuerpo del útero (Güvenc y col., 2005). Probablemente, la inexistencia de diferencias entre los sitios de inseminación se deba a que 24 h después de la deposición del semen en el útero el número de PMNs es menor que los observados a las 4 h, debido al inicio de la resolución fisiológica de la reacción inflamatoria (Fiala y col., 2007). Los resultados obtenidos permiten afirmar que la introducción de la pipeta hasta la punta del cuerno, guiada transrectalmente, parecería no causar mayor reacción inflamatoria que la IA tradicional en el cuerpo del útero si se realiza de forma correcta en yeguas reproductivamente normales.

Al analizar el efecto dosis sobre la reacción inflamatoria en la luz uterina se observa una interacción entre dosis y tiempo. Cuando se utiliza dosis alta la reacción inflamatoria fue más intensa a las 2 y 4 h y menos intensa a las 12 h posinseminación al contrario de lo que ocurre con la dosis baja. Resultados similares fueron obtenidos por Kotilainen y col. (1994), Nikolakopoulus y Watson (2000), Fiala y col. (2007) y Cazales y col (2018). Dosis altas de espermatozoides provocaron un efecto quimiotáctico más fuerte sobre los PMNs, resultando en una rápida y eficiente fagocitosis de espermatozoides y bacterias; tal rápida eliminación del material extraño resultó en un proceso inflamatorio intenso pero corto en el tiempo. Mientras, dosis espermáticas más bajas causaron un estímulo débil

al endometrio provocando una respuesta inflamatoria leve y prolongada en el tiempo. Por lo que en yeguas reproductivamente sanas dosis de inseminación altas provocan un mayor estimulo de los mecanismos de defensa favoreciendo una recuperación más rápida del endometrio. Estos resultados corroboran los resultados de otros autores, los cuales indicaron una relación directa entre el número de espermatozoides inseminados y la intensidad de la reacción inflamatoria (Parleviliet y col., 1997; Troedsson y col., 1998; Lindsey y col., 2001; Katila, 2011; Gomes y col., 2019).

Al analizar los estrato compacto y esponjoso sólo se pudo detectar un efecto tiempo, habiendo mayor número de PMNs a las 12 h posinseminación independientemente del sito y de la dosis inseminante. El número de PMNs presentes tanto en el estrato compacto como en el estrato esponjoso no varió con el sitio ni la dosis de inseminación a diferencia de lo observado en la luz uterina. Esto seguramente se deba a que los PMNs pasan rápidamente de los vasos sanguíneos a la luz uterina durante la fase aguda del proceso inflamatorio y probablemente demoren más tiempo en alcanzar los tejidos más profundos del endometrio. Por este motivo, probablemente fue que Fiala y col. (2007) tampoco encontraron diferencias en el número de PMNs presentes en el estrato compacto y esponjoso a las 2 y 4 h posinseminación con diferentes dosis de semen refrigerado.

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

En resumen, utilizando la dosis alta la IA profunda en la punta del cuerno con semen congelado, no causó mayor inflamación en el endometrio que la IA en el cuerpo del útero. Mientras que con la dosis baja, la IA profunda causó menor reacción inflamatoria que la IA en el cuerpo del útero. La dosis de IA alta provocó una reacción inflamatoria más intensa, pero de resolución más rápida que la dosis baja. En conclusión, la IA profunda es una técnica segura para utilizar en la yegua y la reacción inflamatoria se vio influenciada por el sitio, la dosis y el tiempo posinseminación. Estos resultados fueron obtenidos de yeguas clínica y reproductivamente sanas, sin historial reproductivo, enviadas a frigorífico.

8. CONCLUSIONES

La técnica del lavado uterino permite un mejor muestreo para examen citológico y bacteriológico que el hisopo intrauterino.

La introducción de una pipeta atraumática hasta la punta del cuerno ipsilateral al folículo ovulatorio guiada transrectalmente no causa una mayor reacción inflamatoria que la técnica de IA convencional en el cuerno del útero.

La dosis inseminante provoco una respuesta inflamatoria que fue mayor al aumentar el número de espermatozoides inseminados. Dosis bajas provocan reacciones inflamatorias de menor intensidad, pero de mayor duración, mientras que dosis altas provocan reacciones intensas pero de rápida resolución.

La inseminación profunda en la punta del cuerno ipsilateral no provoca una mayor reacción inflamatoria que la IA tradicional en el cuerpo del útero.

La IA con la dosis baja en la punta del cuerno, genera una reacción inflamatoria menor que la IA en el cuerpo del útero.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso A, Baca CC, Pinto M, Caldevilla M, Ferrante A, Miragaya M. (2016). Uso del semen congelado en programas de inseminación artificial en equinos. Spermova 6(2):107-109.

2. Arifiantini RI, Purwantara B, Yusuf TL, Sajuthi D. (2010). Effect of different cryoprotective agents on skim milk and dimitropoulus extender for stallion semen cryopreservation.J.Indonesian Trop.Anim.Agric. 35(1): 68-74

3. Aurich C (2012) Artificial insemination in Horses: More than a Century of Practice and Research. J Equine Vet Sci. 32 (8): 458-463.

4. Bader H (1982). An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. J Reprod Fertil; 32: 59-64.

5. Ball BA, Shin SJ, Patten VH, LeinDH, Woods GL (1988). Use of low- volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. Theriogenology;29: 1269-1283.

6. Barros SS, Masuda EK. (2009) Biopsia endometrial na égua, diagnóstico e prognóstico. 30.

7. Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Brinsko SP, Rigby SL. (2003) Manual of equine reproduction.2a. ed. Ciudad, Mosby, 253.

8. Boyle MS (1992). Artificial insemination in the horse. Annales de zootechnie, INRA/EDP Sciences, 41 (3-4):311-318.

9. Camargo CE, Macan R, Munhoz ML, Kozicki LE, Ollhoff RD, Saporski Segui M, Talini R,Weiss RR, Gomes Steinberg-Galan T, Simioni Felicio LC. (2018). Effect of different types of artificial insemination and semen dose on reproductive efficiency in mares.Pferdeheilkunde–Equine Medicine 34:57-60.

10. Card C. (2005). Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares.Theriogenology 64:580–588.

11. Cazales N, Fiala SM, Cavestany D, Mattos RC. (2018). Insemination dose and site with frozen semen affects the sperm transport and inflammatory response in mares? Journal of Equine Veterinary Science 66;109.

12. Cocchiaa N, Paciellob O, Aulettac L, Uccelloc V, Silvestrod L , Mallardoe K, Paraggiof G,Pasolinic MP. (2012) Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. Theriogenology 77:89 –98

13. Cohen J. (1984) Immunological aspects of sperm selection and transport. Immunological Aspects of Reproduction in Mammals. Kent, Buttenvorths ;77-89.

14. Cortés Z, Aréchiga C, Rincón M, Rochín F, López M, Flores G (2018). Revisión: El Ciclo Reproductivo de la Yegua. Abanico Veterinario 8(3):14-41.

15. Cunningham JG. (2014). Fisiología Veterinaria. 5ª ed,ciudad, Elsevier, 607.

16. Curnow EM (1991). Ultrassonogrphy of the mare`s uterus. Eq Vet Educ; 3 (4): 190-193.

17. Dahms BJ, Troedsson MHT. (2002). The effect of seminal plasma components on opsonization and PMN-phagocytosis of equine spermatozoa. Theriogenology 58:457-460.

18. Doig PA, McKnigth JD, Miller RB (1981). The Use of Endometrial Biopsy in the Infertile Mare. Can. Vet. J. 22: 72-76.

19. Ferrari. A. (2012). Caracterización y potencialidades del sector ecuestre en Uruguay.Uruguay XXI. Disponible en: https://archive.org/details/CaracterizacionYPotencialidadesDelSectorEcuestreEnUruguayy/page/n1 Fecha de consulta: 08/06/2019

20. 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.

21. Fiala SR. (2017) Endometrio da égua pós-cobertura ênfase na resposta inflamatoria.Rev. Bras. Reprod Anim, 41(1):326-329.

22. García MPL (2018) Transoporte espermático en yeguas 2, 4 y 12 horas luego de la inseminación artificial con semen congelado. Tesis de grado, UdelaR, Montevideo, Uruguay, 63 p.

23. Gomes GM, Crespilho AM, Leao KM, Jacob JCF, Gomes LPM, Segabinazzi LG, Papa FO, Alvarenga MA. (2019). Can sperm selection, inseminating dose, and artificialinsemination technique influence endometrial inflammatory response in mare? J Eq Vet Sc 73:43-47.

24. Gordon LR, Sartin EM. (1978) Endometrial biopsy as an aid to diagnosis and prognosis in equine infertility. J. Equine Med. Surg. 1: 328-336.

25. Govaere JL, Hoogewijs MK, De Schauwer C, De Vliegher S , Van Soom A , Duchateau L y De Kruif A (2014). Effect of artificial insemination protocol and dose of frozen/thawed stallion semen on pregnancy results in mares. Reprod Domest Anim; 49: 487-91.

26. Graham JK. (1996) Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 12(1), 131–147.

27. Guvenc K, Reilas T, Katila T. (2005). Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares.

28. Haadem CS, Nødtvedt A, Farstad W y Thomassen R. (2015) A etrospective cohort study on fertility in the Norwegian Coldblooded trotter after artificial insemination with cooled, shipped versus fresh extended semen. Acta Vet Scand 57:77.

29. Hemberg E, Lundeheim N, Einarsson S. (2005). Retrospective Study on Vulvar Conformation in Relation to Endometrial Cytology and Fertility in Thoroughbred Mares. J. Vet. Med. A 52: 474–477.

30. Hennecke DR, Potter GD, Kreider JL, Yeates BF (1983). Relationship between condition score, physical meaasurements and body fat percentage in mares. Eq Vet J; 15 (4): 371-372.

31. International Federation of Horseracing Authorities (IFHA). (2014). Acuerdo internacional de cría, carreras y apuestas, Versión Castellano. Disponible en: http://www.studbook.com.uy/archivos/AcuardoIntCria.pdf. Fecha de consulta 15/10/19.

32. Jasko DJ, (1992) Pregnancy rates utilizing fresh, cooled, and frozen thawed stallion semen. Proceedings of the 38th American Association for Equine Practicing numero de volumen: 649-60.

33. 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.

34. Katila T. (1995) Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. Biol Reprod 52:515-517.

35. Katila T. (2001) In Vitro Evaluation of Frozen-Thawed Stallion Semen: A Review. Acta Vet Scand. 42(2): 199–217.

36. Katila T (2011). Sperm-Uterine Interactions .En: Equine Reproduction, 2a ed,Blakwell;: 1092-1098.

37. Kenney RM. (1977). Clinical aspects of endometrial biopsy in fertility evaluation of the mare. Proc Am Assoc Equine Practitioners; 23: 105–122.

38. Kenney RM. (1978) Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. JAVMA 172 (3): 241-262.

39. Knudsen P. (1964). Endometrial citology as a diagnostic aid in mares. Cornell Vet 54:415-22.

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

41. Kowalczyk A, Czerniawska-Piatkowska E, Kuczaj M. (2019). Factors Influencing the Popularity of Artificial Insemination of Mares in Europe. Animals 9: 460.

42. Lindsey AC, Brummer JE, Squieres EL (2001). Low dose insemination of mares using non-sorted and sex-sorted sperm. Anim Reprod Sci; 68: 279-289.

43. Loomis PR. (2001) The equine frozen semen industry. Animal Reproduction Science 68;191–200.

44. Loomis PR, Graham JK. (2008). Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. Animal Reproduction Science, 105(1-2), 119–128.

45. López LM, Zarco L, Boeta AM. (2010). Inducción de la actividad ovárica en yeguas criollas con un programa de fotoperiodo artificial en la latitud 19°9´N. Vet. Méx., 41 (2):89-100.

46. Love, C. (2012) Measurement of concentration and viability in Stallion sperm. J Equine Vet Sci. 32 (8): 464-466.

47. Malshitzky E. (1998). Efeito de diferentes tratamentos pós-cobertura na fertilidade de éguas Puro Sangue de Corrida. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 40 p.

48. Mattos RC, Mattos ALG, Klug E, Günzel AR. (1984). Citología endometrial na égua como Método diagnóstico auxiliar e complementar. Rev. Bras Reprod Anim; 8 (2): 83-90.

49. McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. (2011) Equine Reproduction.2a. ed., ciudad Wiley-Blackwell, 3132.

50. Mesa AM, Henao GR. (2012). Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos.Revista MVZ Córdoba 17(1): 2908-2915.

51. Nikolakopoulos E, Watson ED: Effect of infusion volume and sperm numbers on persistence of uterine inflammation in mares. Equine Vet J 32(2):164–166

52. Parlaviliet JM, Tremoleda JM, Cheng FP, Pycock J, Olendbrander B (1997). Influence of semen, extender, and seminal plasma on the defence mechanism of the mare’s uterus .Pferdeheilkunde; 13: 540.

53. Pérez DD, Acosta M, Restrepo G, Camacho C, Pérez J.(2017). Congelación de semen equino bajo dos esquemas de adición de dimetilformamida. Rev Inv Vet. 28(4): 918-927

54. Reilas T. (2001) Uterine environment in the mare. Tesis (Doctorado en medicina veterinaria), Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Helsinki, Helsinki, 78p.

55. Rigby S, Derczo S, Brinsko S, Blanchard T, Taylor T, Forrest DW, Varner D. (2000)Oviductal sperm number following proximal uterine horn or uterine body insemination.Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners; 46: 332-334.

56. Samper JC, Pycock JF, Mc Kinnon AO. (2007). Current therapy in Equine reproduction. Ciudad, Saunders Elsevier, 492.

57. Samper JC, Plough T (2010). Techniques for the Insemination of Low Doses of StallionSperm. Reprod Dom Anim 45(2): 35–39

58. Samper JC.(2015). Post-breeding inflammation and its effect on fertility. I Jornada Biotecnologías Reproductivas en Equinos. Buenos Aires,. P 43-45.

59. Samper JC, Stanford MS, Hillary MF, Chapwanya A. (2016). Post-breeding inflammation in mares after insemination with large and low doses of fresh or frozen semen. Pferdeheilkunde 32: 24-26.

60. 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 41:1–2.

61. 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.

62. Sieme H, Schäfer T, Stout TAE, Klug E, Waberski D. (2003). The effect of different insemination regimes on fertility in mares. Theriogenology 60:1153–1164.

63. Sieme H, Bonk A, Hamann H, Klug E, Katila T. (2004) Effect of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. Theriogenology 62(5):915-28.

64. Snider TA, Sepoy C, Holyaok GR. (2011) Equine endometrial biopsy reviewed:observation, interpretation and application of histopathologic data. Theriogenology 75;1567–1581.

65. Tibary A, Ruiz A. (2018). Uterine disorders in the mare: diagnostic approach, treatment and prevention. Spermova; 8(1):1-24

66. Troedsson MHT, Crabo BG, Ibrahim N, Ing M, Scott M. (1995) Mating- Induced endometritis: mechanisms clinical importance, and consequences. AAEP Proceedings; 41: 11-12.

67. Troedsson MHT, Liu IKM, Crabo BG (1998). Sperm transport and survival in the mare: a review. Theriogenology; 5: 807-818.

68. Troedsson MHT. (1999) Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. Theriogenology 52: 461-471.

69. Tyler KR. (1977) Histological changes in the cervix of the rabbit after coitus. J Reprod Fertil; 49:341-345.

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

71. Watson ED, Nikolakopoulos E. (1996). Sperm longevity in the mares uterus. Journal of Equine Veterinary Science; 16 (9):390-392.

72. Watson PF. (2000). The causes of reduced fertility whit cryopreserved semen. Animal Reproduction Science 60-61:481-492.

73. Williamson P, Munyua S, Martin R, Penhale WJ (1987). Dynamics of the acute uterine response to infection, endotoxin infusion and physical manipulation of the reproductive tract in the mare. J Reprod Fertil Suppl; 35: 317-325.

74. Yates DJ y Whitacre MD. (1993). Inseminación Artificial en el Equino. En: Van Camp SD.Veterinary Clinics of North America, Equine Practice 4(2): 173-192.

75. Youngquist RS, Threlfall WR. (2007). Current Therapy in Large Animal Theriogenology. 2a. ed. St Louis, Saunders; 1061.