

Inseminación artificial con semen congelado equino: reacción inflamatoria, transporte espermático y técnica de inseminación

Artificial insemination with frozen equine semen: inflammatory reaction, sperm transport and insemination technique

Nicolás Cazales Penino^{1*} 0000-0002-7418-117X

María José Estradé¹ 0000-0001-7600-3388

Rodrigo Costa Mattos² 0000-0001-9349-3366

¹Unidad Académica Reproducción Animal, Facultad de Veterinaria, UDELAR, Uruguay. *Email: nicolascazales@hotmail.com

²Reprolab, Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Brasil.

Veterinaria (Montevideo) Volumen 56
Nº 214 (2020 Jul - Dic) e20205621402

DOI:10.29155/VET.56.214.2

Recibido: 18/02/2020
Aceptado: 23/06/2020

Resumen

El objetivo de la siguiente revisión es discutir el efecto sobre la fertilidad de algunos factores clásicamente reconocidos como relevantes para el éxito de la inseminación artificial (IA) con semen congelado equino: número total de espermatozoides por IA (dosis), número de inseminaciones por ciclo (frecuencia de IA), momento óptimo de la IA relativo a la ovulación, sitio de inseminación y técnica de IA. La IA con semen congelado ha ganado popularidad entre los propietarios y veterinarios que trabajan con equinos. La dosis mínima recomendada para la IA convencional en el cuerpo del útero con semen congelado ha sido establecida en 250×10^6 de espermatozoides con motilidad progresiva. Sin embargo, la dosis mínima requerida para mantener buenos índices de preñez parece depender de la fertilidad intrínseca de cada padrillo, así como del sitio de inseminación. La inseminación profunda en la punta del cuerno es un procedimiento de rutina entre los veterinarios de campo cuando se utiliza dosis de inseminación baja. Por otro lado, el número de inseminaciones por ciclo parecería no afectar los índices de preñez siempre y cuando la última inseminación sea realizada en la ventana de tiempo entre 12 h antes o 12 h después de la ovulación. El ovocito equino permanece viable y con plena capacidad de ser fertilizado por 12 a 15 h post-ovulación, no habiendo un aumento en las tasas de pérdidas embrionarias hasta pasadas las 12 horas post-ovulación. Por lo que en inseminaciones pos-ovulatorias y utilizando un agente inductor de la ovulación, no habría ninguna ventaja en revisar las yeguas en intervalos menores a 12 h, ya que no parecería mejorar los índices de preñez ni las tasas de pérdida embrionaria. En conclusión, la técnica de IA será determinada por el número y costo de las dosis de semen disponibles, estatus de la yegua a inseminar y fertilidad del semen congelado.

Palabras clave: Dosis bajas, Inseminación profunda, Semen congelado, PMNs, Estrato compacto, Estrato esponjoso.

Abstract

The aim of the following review is to discuss the effect on fertility of some factors classically recognized as relevant to the success of artificial insemination (AI) with frozen equine semen: total sperm numbers per AI (dose), number of inseminations per cycle (AI frequency), optimal timing of AI relative to ovulation, AI site and AI techniques. The frozen semen AI is widely used in the equine industry. The minimum recommended dose of spermatozoa has been established in 250×10^6 progressive motile sperm for uterine body insemination. However, the minimum dose required for maintaining the highest fertility for each stallion may differ greatly and therefore is determined by individual variation of intrinsic stallion fertility as well as with the insemination site. Deep intra-uterine insemination is commonly accepted as a routine procedure for AI with low doses. The number of AIs per cycles does not seem to be a factor affecting the final outcome of pregnancy as long as the last AI is performed within 12 h before and 12 h after the ovulation. Contrary to the extended practitioners belief, the mare's oocyte could remain viable and fully capable of fertilization for 12-15 h, and the embryo loss rate after post-ovulatory insemination does not begin to increase until 12 h post-ovulation. Therefore, in a postovulatory insemination regime and using an ovulation inducing agent, examination of mares at intervals of any less than 12 h does not improve pregnancy or embryo loss rates. In conclusion, the number and cost of available semen doses, status of the mare to be inseminated and fertility of the frozen semen will determine the AI technique.

Keywords: Low dose insemination, Deep-horn insemination, Frozen semen, PMNs, Stratum compactum; Stratum spongiosum.

Introducción

En los últimos 25 años se han logrado avances en los programas de inseminación con semen congelado en caballos de deporte, debido en parte a que estos están en competencia durante casi todo el año. Los padrillos de alta performance, suelen descansar sólo un par de meses al año, que es cuando sus propietarios aprovechan para congelarle semen y así poder cumplir con las demandas del mercado. En general, los padrillos que se utilizan en programas de inseminación artificial (IA) con semen congelado no se seleccionan por su eficiencia reproductiva sino por su mérito genético, performance individual y otras variables de mercado, lo cual genera un gran desafío para obtener índices reproductivos satisfactorios. Afortunadamente se han logrado importantes avances en la inseminación con semen congelado que permiten compensar ciertas situaciones de mal pronóstico. Dentro de éstos, se encuentran el catéter flexible para la IA profunda, utilización de análogos de GnRH para inducción de la ovulación, mejoras en los métodos de selección y concentración espermática y medios de congelamiento, entre otros (Sánchez, 2015).

El uso de semen congelado para la inseminación de yeguas ofrece ciertas ventajas al veterinario y propietario comparado con el semen refrigerado, tales como: (i) los padrillos se pueden colectar en una época del año concreta, sin necesidad de ajustarla a las demandas del ciclo reproductivo de la yegua, permitiéndoles así tener una mejor performance deportiva; (ii) se puede seguir utilizando el semen de padrillos lesionados o incluso una vez muertos; (iii) es más fácil el organizar los pedidos de semen, ya que se pueden mantener durante un tiempo indefinido en el Haras, además de permitir la importación de semen de padrillos de diferentes continentes y (iv) se desperdicia menos semen, ya que todo el eyaculado puede ser procesado en forma de dosis inseminantes.

A pesar de los avances, y en contraste a lo que ocurre en bovinos, la IA con semen congelado todavía no sustituyó la IA con semen fresco o refrigerado en la producción equina. Esto puede deberse a los bajos índices de preñez obtenidos con el semen congelado de algunos padrillos, diversidad de criterios para el procesamiento en la congelación de semen y a las diversas técnicas y estrategias de inseminación utilizados por los veterinarios y centros de reproducción equina (Loomis, 2001; Love, 2012). A esto se le suma la menor longevidad propia del semen congelado una vez depositado en el tracto genital de la yegua, debido a los cambios en la “capacitación” del espermatozoide durante el proceso de congelación/descongelación (Watson, 2000, Graham, 2011). La evidencia científica sugiere que, aunque los espermatozoides presentes en el semen congelado de algunos padrillos pueden permanecer viable en el tracto reproductivo de la yegua durante 48 h (Volkman y Zyl, 1987), la inmensa mayoría no dura más de 12 h (Sieme et al., 2003) por estar perjudicada su viabilidad. Esta última característica del semen congelado hace necesaria la utilización de protocolos de inseminación que requieren un manejo intensivo de las yeguas, incrementándose así los costos derivados de la IA con semen congelado.

El objetivo de la siguiente revisión es discutir el efecto sobre la fertilidad de los factores de la IA con semen congelado clásicamente reconocidos como relevantes para el éxito de la misma: número total de espermatozoides por IA (dosis), número de inseminaciones por ciclo (frecuencia de IA), momento óptimo de la IA relativo a la ovulación, sitio de IA y técnica de IA.

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

Es difícil recomendar una dosis estándar para semen congelado que haya sido críticamente evaluada en el caballo. Algunos estudios aportan datos de número total de espermatozoides (NTE) sin el porcentaje de motilidad progresiva y en otros el número de espermatozoides motiles progresivos (EMP) por IA. La mayoría de los estudios científicos no suelen controlar el efecto de otros factores “de confusión” como método de procesamiento, factor yegua, factor padrillo, técnica de inseminación, etc., haciendo difícil una comparación crítica de los mismos. Uno de los pocos estudios retrospectivos con un número considerable de inseminaciones (> 2000 inseminaciones), demostró que más del 80% de las inseminaciones con semen congelado tenían entre 400 y 500 millones de espermatozoides totales por dosis, utilizando en promedio 8 pajuelas de 0,5 mL y siendo el sitio de la inseminación el cuerpo del útero (Samper et al., 2002). En un esfuerzo para aumentar la uniformidad en relación al número total de espermatozoides por dosis, la Federación Mundial para la Cría de Caballos de Deporte (www.wbfs.org) ha establecido un estándar para dosis de semen congelado entre países miembros que implica el uso de una dosis de inseminación con un mínimo de 250×10^6 espermatozoides motiles progresivos, con un porcentaje de motilidad progresiva después de la descongelación de al menos 35%. Sin embargo, en muchos casos esta dosis excede con creces el número mínimo de espermatozoides requeridos para llegar a la máxima fertilidad propia de cada padrillo, que por otro lado es una buena práctica, siempre y cuando la disponibilidad del semen no sea un factor limitante. Sieme et al. (2004) reportaron que no hubo diferencia en las tasas de preñez por ciclo en yeguas inseminadas en el cuerpo uterino con 100×10^6 (55/123, 45%) u 800×10^6 (9/21; 43%) espermatozoides totales con más de 35% motilidad progresiva a partir de 17 padrillos diferentes, distribuidos de forma uniforme entre ambos grupos. Sin embargo, otros estudios usando dosis menores de espermatozoides demostraron diferencia en las tasas de preñez entre yeguas inseminadas en el cuerpo uterino con 50×10^6 (11/39, 26%) o 400×10^6 (19/39; 46%) de espermatozoides totales a partir de 4 padrillos diferentes (Clément et al., 2005), o entre inseminaciones en el cuerpo del útero con 137×10^6 (14/35; 40%) o 27×10^6 (5/35; 14%) de espermatozoides motiles progresivos (Govaere et al., 2014).

Estas diferencias entre estudios demuestran la existencia de un umbral mínimo de espermatozoides con motilidad progresiva por debajo del cual la fertilidad se ve comprometida, pero también sugieren que ese umbral no es el mismo para todos los padrillos y es probable que haya grandes variaciones individuales. De este modo se demostró que es posible obtener tasas de preñez

aceptables (63%) después de inseminar yeguas en el cuerpo uterino con tan solo 14×10^6 espermatozoides motiles progresivos de dos padrillos de alta fertilidad (Morris et al., 2003). En estos padrillos, el umbral de la dosis de espermatozoides se observó muy por debajo de lo esperado, ya que la fertilidad no bajó a 15% hasta reducir la dosis de inseminación a 3×10^6 EMP.

Analizando el efecto que tienen los espermatozoides sobre el útero, observamos que estos estimulan las contracciones uterinas necesarias para el transporte rápido de los espermatozoides hacia la unión útero-tubárica (UUT), así como para la eliminación del exceso de espermatozoides y de contaminantes a través del cérvix. Los espermatozoides también son los responsables de generar una fuerte reacción inflamatoria que es proporcional al número de espermatozoides inseminados (Kotilainen et al., 1994; Fiala et al., 2007; Cazales et al., 2018; Gomes et al., 2019). En yeguas resistentes a la endometritis pos-servicio, cuanto mayor el número de espermatozoides presente en la dosis inseminante mayor la respuesta inflamatoria y más rápida su resolución (pico inflamatorio entre las 4 y 12 horas pos-inseminación); mientras que dosis bajas en espermatozoides generan una respuesta inflamatoria más leve, pero más sostenida en el tiempo (pico inflamatorio > 12 horas pos-inseminación) (Nikolakopoulos y Watson, 2000; Cazales et al., 2018). Esto podría indicar que en yeguas resistentes a la endometritis pos-servicio generar una fuerte reacción inflamatoria con una dosis estándar que garantice una adecuada y rápida resolución del cuadro inflamatorio sería adecuado para proporcionar un ambiente uterino apropiado a la llegada del embrión, alrededor del día 6 pos-ovulación (Katila, 2012; Lewis et al., 2015; Cazales et al., 2018). En yeguas susceptibles a la endometritis pos-servicio, sería recomendable utilizar una IA profunda con dosis baja de espermatozoides, combinado con el uso sistémico de corticoides (Dell'Aqua et al., 2006; Bucca et al., 2008; Gomes et al., 2019) al momento de la IA, para atenuar la respuesta inflamatoria y así poder aplicar un tratamiento pos-inseminación eficaz (Samper et al., 2016 y Canisso et al., 2016), que ayude a eliminar los productos derivados de la inflamación lo más rápido posible.

Efecto del número de inseminaciones por estro sobre las tasas de preñez

El veterinario clínico responsable de la IA con semen congelado frecuentemente se enfrenta al dilema de inseminar con una sola dosis de semen congelado por estro (cuando el número de dosis por yegua es limitado o muy caro) incrementando el número de revisiones ecográficas; o bien inseminar más de una vez, generalmente a un tiempo fijo relativo al momento de administración de un agente inductor de la ovulación, evitando así tener que revisar yeguas por la noche.

Es difícil evaluar el efecto exacto del número de inseminaciones en el mismo estro sobre las tasas de preñez, ya que no es fácil separar este factor de otras variables como son el momento de la última IA relativa a la ovulación o el número de espermatozoides totales o motiles que se han introducido en la yegua en el mismo ciclo. Los resultados de ensayos clínicos controlados sugieren que no hay un incremento en las tasas de preñez por inseminar

más de una vez en el mismo estro en comparación con una única inseminación, siempre y cuando la última o única inseminación se haga durante la ventana de tiempo de 12 h antes y 12 h después de la ovulación, y la dosis tenga un número adecuado de espermatozoides motiles (Loomis y Squires, 2005; Metcalf, 2007; Lewis et al., 2015; Immonen y Cuervo-Arango 2020). De esta forma las tasas de preñez no fueron diferentes en yeguas inseminadas dos veces ($129/280$; 46%) 24 y 40 h pos-hCG o una sola vez ($120/255$; 47%) 6 h pos-ovulación (Barbacini et al., 2005), con 800×10^6 espermatozoides totales por inseminación. Del mismo modo, Sieme et al. (2003) observaron que las tasas de preñez fueron semejantes en yeguas inseminadas dos veces ($31/62$; 50%) o una sola vez dentro de las 12 h después de ovular ($24/48$; 50%). En el grupo de yeguas inseminadas dos veces, la última IA al menos ocurrió entre 12 h antes y 12 h después de la ovulación.

Por otro lado, una frecuencia mayor (más de dos inseminaciones) en el mismo estro puede ser perjudicial para las tasas de preñez. Clément et al. (2005) realizaron un total de cuatro inseminaciones consecutivas en 24 h con 100×10^6 espermatozoides totales por inseminación, con la última inseminación ocurriendo 5 h antes de la ovulación, produciendo tasas de preñez más bajas ($8/24$; 34%) que yeguas inseminadas una sola vez con 400×10^6 espermatozoides totales dentro de las 12 h previas a la ovulación ($16/28$; 57%). Es probable que la reducción en la fertilidad en yeguas inseminadas múltiples veces sea debido a la mayor reacción inflamatoria uterina por la continua estimulación del semen. De este modo, sería recomendable inseminar sólo una vez a las yeguas que tienen problemas de evacuación uterina.

Efecto del momento de la IA relativo a la ovulación en las tasas de preñez

Los protocolos de inseminación con semen congelado con una única dosis por estro utilizan, en general, inseminaciones pos-ovulatorias, debido en parte a la corta vida media de los espermatozoides congelados - descongelados (aproximadamente 12 h) y/o a la existencia de un número de dosis limitado o muy caro. Este protocolo es el único que asegura que el semen sea depositado luego de una ovulación confirmada y asumiendo la liberación del ovocito (Lewis et al., 2015; Immonen y Cuervo-Arango, 2020).

El ovocito de la yegua puede permanecer viable hasta 12-15 h pos-ovulación (Koskinen et al., 1990; Woods et al., 1990), sin que haya realmente un aumento significativo en las tasas de muerte embrionaria respecto a las que ocurren en inseminaciones pre-ovulatorias (Newcombe y Cuervo-Arango, 2011; Newcombe et al., 2011; Immonen y Cuervo-Arango, 2020). Sin embargo, los veterinarios clínicos que realizan IA pos-ovulatorias prefieren inseminar la yegua lo antes posible luego de la ovulación, generalmente 3-4 h después, y en ningún caso más tarde de las 6 h pos-ovulación. Esta creencia ha sido perpetuada durante años a pesar del gran costo que conlleva el manejo reproductivo intensivo derivado de la alta frecuencia de exámenes ecográficos necesarios para poder inseminar la yegua en el momento pos-ovulatorio inmediato (< 6 h) (Immonen y Cuervo-Arango, 2020).

Puesto que la evidencia científica sugiere que las tasas de preñez y las de muerte embrionaria no son diferentes en yeguas inseminadas de 0 a 6 h y de 6 a 12 h tras la ovulación, se puede deducir que no se obtendría ventaja aparente al aumentar la frecuencia de exámenes ecográficos diarios más allá de dos veces al día (por ejemplo cada 12 h) con el fin de inseminar una yegua con semen congelado en el periodo pos-ovulatorio inmediato (< 4-6 h pos-ovulación). Newcombe et al. (2011) en un estudio retrospectivo con un gran número de yeguas analizadas (867 ciclos estrales) demostró que las tasas de preñez y las de muerte embrionaria temprana no fueron diferentes en yeguas inseminadas con semen congelado la primera vez que se detectó la ovulación después de haber visto el folículo pre-ovulatorio en el examen anterior llevado a cabo 0-3 h (43.2 % y 10.5%), 3-6 h (44.7% y 11.9%), 6-9 h (45.1% y 5.6%), 9-12 h (55.8% y 7.5%) o 12-15 h (47.9% y 3.6%) antes. Imonnen y Cuervo-Arango (2020), en otro estudio retrospectivo con 159 yeguas y 213 inseminaciones, tampoco obtuvieron diferencias en las tasas de preñez y muerte embrionaria entre inseminar al detectar la ovulación luego de 4, 8 y 16 horas de realizada la penúltima ecografía (con folículo pre-ovulatorio presente). Por otro lado, Barbacini et al. (1999) también reportaron tasas de preñez similares entre yeguas inseminadas 6 h antes de la ovulación (39%, n = 225) o 6 h pos-ovulación (38%, n = 351). De igual manera, no hubo diferencia en las tasas de muerte embrionaria entre el grupo de yeguas inseminadas pre- y pos-ovulación (8.1 vs. 9.3%), lo que indicaría que las tasas de preñez bajan y aumentan las pérdidas embrionarias de forma significativa solo cuando se insemina a partir de las 12 a 18 h pos-ovulación (Woods et al., 1990).

No obstante, cabe resaltar que en yeguas con problemas de evacuación uterina (generalmente yeguas viejas con acúmulo de fluido intrauterino) el retraso en la inseminación con respecto a la ovulación puede perjudicar sus ya comprometidas defensas uterinas. Por este motivo, incluso en yeguas reproductivamente normales que son inseminadas en el periodo pos-ovulatorio (cuando ocurre fisiológicamente una disminución en las defensas uterinas naturales de la yegua), es recomendable utilizar un tratamiento pos-inseminación rutinario más agresivo que el utilizado en inseminaciones pre-ovulatorias (por ejemplo: lavados uterinos, administración de oxitocina y de antibióticos). En el citado estudio (Newcombe et al., 2011) el protocolo de tratamiento pos-inseminación consistió en la administración de una infusión intrauterina de 1.800 mg de penicilina procaínica (6 mL de Depocillin) junto a 900 mg de Framicetina (6 mL Framomycin, un antibiótico aminoglucósido) 8 h pos-inseminación, seguido de 25 UI de oxitocina por vía endovenosa 8 h más tarde. En numerosos casos (especialmente si se encontró > 15 mm de fluido libre intrauterino 8-12 h pos-inseminación), además la yegua fue lavada con 1-2 L de Ringer Lactato antes de la infusión de antibióticos y previa administración de oxitocina. Aun siendo difícil para el veterinario clínico cambiar un protocolo tan enraizado de trabajo de IA pos-ovulatoria, es interesante conocer las posibilidades de éxito de las inseminaciones llevadas a cabo en el periodo de 12-15 h pos-ovulación, incluso de aún más tiempo después de la ovulación, ya que en numerosas

ocasiones nos encontramos ante una yegua que “no debería haber ovulado todavía” y sin embargo aparece sin el folículo pre-ovulatorio que previamente habíamos anotado 24 h antes. Ante este escenario clínico, sería muy recomendable inseminar a la yegua, especialmente cuando la ovulación parezca tener menos de 12-15 h de ocurrida de acuerdo a indicadores como morfología y ecogenicidad del cuerpo lúteo temprano (Pierson y Ginther, 1985; Townson y Ginther, 1989; Newcombe, 1996; Cuervo-Arango et al., 2020).

Efecto del lugar y técnica de inseminación sobre las tasas de preñez

Las técnicas de inseminación profunda con baja dosis en la yegua han sido desarrolladas para poder reducir el número de espermatozoides requeridos para lograr una preñez (Hayden et al. 2012). La dosis típica recomendada para alcanzar tasas de preñez máxima para la inseminación tradicional en el cuerpo del útero es de $>200 \times 10^6$ espermatozoides con motilidad progresiva (MP) y morfológicamente normales (MN) para semen descongelado (Pickett et al., 2000; Lyle y Ferrer, 2005; Metcalf, 2007). Indudablemente esto varía mucho entre padrillos, lográndose con algunos padrillos buenos índices de preñez con dosis de espermatozoides menores. El sitio de inseminación parecería aumentar las tasas de preñez con dosis de espermatozoides menores cuando son depositados con bajo volumen cerca de la UUT (Morris y Allen, 2002; Morris et al., 2003). Mientras que dosis y volúmenes mayores pueden ser depositados en cualquier parte del útero ya que los espermatozoides serán igualmente distribuidos de forma rápida por todo el tracto reproductivo a través de las contracciones miométricas (Cazales et al. 2018). Inclusive en inseminaciones con bajo número de espermatozoides y bajo volumen los espermatozoides son igualmente distribuidos por todo el útero ya que existen testimonios de mellizos como resultado de ovulaciones bilaterales cuando se ha inseminado en la punta de uno de los cuernos (Samper, 2019 comunicación personal).

Luego que la yegua es cubierta o inseminada, un porcentaje de espermatozoides fértiles son transportados, principalmente por la influencia de contracciones uterinas, hasta el lugar donde ocurre la fecundación, en la trompa uterina (Katila, 1997; Fiala et al., 2007). Ocho minutos posteriores a la IA se identificaron espermatozoides marcados radioactivamente en la punta del cuerno uterino (Katila et al., 2000). Luego de 30 minutos de la inseminación artificial con semen fresco, en el 67% de las yeguas fueron identificadas la presencia de células espermáticas en las trompas uterinas (Fiala et al., 2010). El número de espermatozoides presentes en las trompas uterinas aumenta con el correr de las horas pos-IA, alcanzando su mayor población en aproximadamente 4 horas (Bader, 1982; Fiala et al., 2007). Luego de este tiempo, en yeguas normales el lavado uterino no afecta las tasas de preñez, implicando que un número suficiente de espermatozoides ya alcanzó la trompa uterina encontrándose en un ambiente seguro y formando una reserva de espermatozoides adecuada para la fertilización (Brinsko et al., 1991).

Se ha propuesto que los bajos índices de preñez obtenidos en yeguas susceptibles a la endometritis pos-servicio se explicarían en parte por una incapacidad de los mecanismos de contracción uterina de establecer un apropiado transporte espermático, que asegure una adecuada población espermática en las trompas uterinas, protegida de los daños causados por la inflamación (Scott et al., 1995; Scott et al., 2003; Samper et al., 2016). Yeguas lavadas 1 hora pos-inseminación profunda con semen congelado pos-ovulación tuvieron las mismas tasas de preñez que yeguas lavadas 4 horas pos-inseminación utilizando dosis de entre 100 y 500 x 10⁶ espermatozoides en un máximo de 3 pajuelas de 0,5 mL (Samper et al. 2016). Esto sugiere que la inseminación profunda con baja dosis y bajo volumen aceleraría el transporte espermático, garantizando un número suficiente de espermatozoides en la trompa uterina una hora después de la inseminación (Samper et al., 2016). Esto ha sido confirmado por Cazales et al. (2018) quienes demostraron que la inseminación profunda aceleró el transporte espermático y garantizó una colonización máxima de espermatozoides en la trompa uterina ya a las 2 horas pos-inseminación, cuando se utilizan dosis bajas (50 x 10⁶ espermatozoides totales) en una sola pajuela de 0,5 mL. Cuando se utilizaron dosis mayores de 400 x 10⁶ de espermatozoides totales utilizando 8 pajuelas por inseminación, no se encontró diferencia en el transporte espermático entre inseminaciones en la punta del cuerno o en el cuerpo del útero. Esto parecería indicar que no hay ninguna ventaja en inseminar en la punta del cuerno cuando se utiliza una dosis estándar de > 400 x 10⁶, pero sí cuando se utiliza una dosis baja de < de 50 x 10⁶ de espermatozoides totales por inseminación (Cazales et al., 2018).

Existe una constante presión de la industria equina para disminuir la dosis necesaria para establecer preñeces y así lograr un uso más eficiente del semen congelado, mejorar los índices de preñez del semen de padrillos subfértiles, padrillos oligospermicos, y tecnologías emergentes como el semen sexado (Brinsko, 2006; Varner et al. 2008; Hayden et al. 2012). Se han reportado dos métodos para inseminación con baja dosis de espermatozoides: (1) inseminación profunda histeroscópica y (2) inseminación profunda en la punta del cuerno uterino utilizando una pipeta flexible (Brinsko et al. 2003; Hayden et al. 2012). Aunque es muy difícil comparar resultados de preñez entre los diferentes estudios, debido a potenciales de fertilidad diferentes de las yeguas, padrillos, experiencia profesional, todo hace indicar que la deposición del semen cerca de la unión útero-tubárica (UUT) mediante una pipeta flexible tienen resultados similares a la canulación de la UUT por medio del catéter a través de un endoscopio (Brinsko, 2006; Samper y Plough, 2010; Hayden et al., 2012). Las dos técnicas permiten reducir drásticamente las dosis inseminante sin afectar las tasas de preñez. Se puede alcanzar tasas aceptables de preñez con dosis de semen fresco que van de 1 a 25 x 10⁶ de espermatozoides con motilidad progresiva en volúmenes de 20 a 1000 µl con ambas técnicas de inseminación profunda. Estudios directos para la comparación de estas dos técnicas, utilizando la misma población de yeguas y de padrillos demostraron que no hay diferencias en la tasa de preñez cuando se inseminan con 5 x 10⁶ espermatozoides con

MP refrigerados por 24 horas (Brinsko et al., 2003). Si la dosis inseminante baja a 1 x 10⁶ espermatozoides con MP la tasa de preñez parecería ser más alta con un histeroscopio que con la inseminación profunda con pipeta guiada transrectalmente (Morris et al., 2000; Morris et al., 2003). Sin embargo, Hayden et al. (2012) no obtuvieron diferencias en las tasas de preñez entre inseminar con 0,5 x 10⁶ o 1 x 10⁶ de espermatozoides con un histeroscopio o con la con pipeta guiada transrectalmente. Si la dosis inseminante es mayor a 100 x 10⁶ espermatozoides con MP, es poco probable que las técnicas de inseminación profunda con baja dosis mejoren la tasa de preñez comparada con la inseminación en el cuerpo del útero (Sieme et al., 2004 y Cazales et al., 2018). Sin embargo, si la dosis inseminante contiene menos de 50 x 10⁶ espermatozoides con MP en bajo volúmenes, entonces parecería haber una ventaja en las técnicas de inseminación profunda sobre la inseminación tradicional en el cuerpo del útero en lo que a tasa de preñez se refiere (Lyle y Ferrer, 2005).

Con respecto a la reacción inflamatoria, la inseminación profunda en la punta del cuerno con una pipeta flexible guiada transrectalmente, no produjo mayor reacción inflamatoria que la inseminación en el cuerpo del útero (Güvenc et al., 2005, Cazales et al., 2018). La inseminación histeroscópica causó mayor reacción inflamatoria y menores tasa de preñez en yeguas susceptibles a la endometritis pos-servicio, cuando la maniobra duró más de 7 minutos, indicando que esta técnica no es apta para yeguas con problemas de evacuación uterina (Sieme et al., 2004; Gomes et al., 2019).

Varias circunstancias demandan la utilización de un bajo número de espermatozoides por inseminación, como tener pocas dosis disponibles de semen congelado, precios altos por dosis inseminante de semen congelado y la industria del semen sexado. El sexado del semen es posible por medio de la citometría de flujo; el tiempo promedio de sexado es de 1000 espermatozoides / segundo y esto limita la capacidad de producir dosis inseminantes con > 50 x 10⁶ EMP (Buchanan et al., 2000; Lyle y Ferrer, 2005; Clulow et al., 2008; Clulow et al., 2009; Samper et al., 2012; Aurich y Schneider, 2014; Ramírez et al., 2017). Las dosis usuales de semen sexado oscilan entre 5 – 25 x 10⁶ EMP, siendo el porcentaje de preñez entre 25 y 60% (Buchanan et al., 2000; Clulow et al., 2009; Samper et al., 2012; Aurich y Schneider, 2014). Otras áreas donde tiene relevancia la utilización de estas técnicas serían casos de padrillos oligospermicos, yeguas con problemas de evacuación uterina y utilización de espermatozoides provenientes de colas de epidídimos (Sieme, 2011; Hayden et al., 2012). Actualmente cada vez más veterinarios de campo realizan de rutina la inseminación profunda en la punta del cuerno utilizando una pipeta flexible atraumática cuando utilizan semen congelado. Se requieren más investigaciones para poder determinar si efectivamente existen mejoras en las tasas de preñez cuando se utilizan estas técnicas en estas categorías de animales sobre todo cuando usamos semen congelado.

Conclusiones

Las distintas técnicas de inseminación artificial afecta el transporte espermático y la reacción inflamatoria pos-inseminación. La IA profunda con una pipeta flexible guiada transrectalmente aumenta el número de espermatozoides que alcanzan la trompa uterina y acelera el transporte espermático sin causar mayor reacción inflamatoria que la IA en el cuerpo del útero. La IA en la punta del cuerno con semen congelado viabiliza la utilización de un número bajo de espermatozoides, no recomendándose la IA con dosis bajas ($< 50 \times 10^6$ EMP) en el cuerpo del útero. Con dosis mayores a 100×10^6 EMP parecería no haber una ventaja aparente en inseminar en la punta del cuerno en relación a la IA tradicional en el cuerpo del útero. Cuanto mayor la dosis inseminante mayor el número de espermatozoides que alcanzan la trompa uterina, causando una respuesta inflamatoria mas intensa pero de resolución mas rápida.

Utilizando la IA profunda con dosis bajas con un histeroscópio o una pipeta flexible guiada transrectalmente se obtuvieron tasas de preñez semejantes. Como las dos técnicas reducen el tiempo de transporte espermático y aumentan el número de espermatozoides que colonizan la trompa uterina, sería posible aplicar tratamientos tempranos, que reduzcan el tiempo de contacto de los espermatozoides con el útero en yeguas susceptibles a la endometritis persistente pos-servicio, pudiendo mejorar las tasas de preñez en esta categoría de yeguas. Debido a la simplicidad, bajo costo y tiempo que consume la técnica, la pipeta guiada transrectalmente es el método de elección en condiciones de campo para la IA con baja dosis en yeguas.

Dado que no hay una reducción en las tasas de preñez, ni un aumento de las pérdidas embrionarias con intervalos de exámenes ecográficos de hasta 12 horas, se puede concluir que en programas de inseminación pos-ovulatoria, la utilización de drogas inductoras de la ovulación junto a un regimen de examinación de dos veces por día (o cada 12 horas), tendrá los mismos resultados que si revisáramos la yegua con mayor frecuencia. Esto reduce el número de exámenes ultrasonográficos por yegua sin reducir la fertilidad del semen congelado. El uso de agentes inductores de la ovulación es necesario para generar un marco de tiempo confiable alrededor del cual programar los exámenes de seguimiento folicular. Existen protocolos de inseminación con dosis únicas y múltiples, con tasas de éxito iguales, lo que permite cierta flexibilidad en la planificación del manejo de la yegua y los costos asociados. Generalmente, se requiere un manejo posterior a la inseminación para resolver cualquier respuesta inflamatoria uterina indeseada. Estos tratamientos dependen de la yegua y su respuesta individual al semen y a los tratamientos proporcionados, pudiendo variar desde unas pocas inyecciones de oxitocina hasta multiples lavados uterinos con varios litros de solución fisiológica o Ringer Lactato.

En resumen, la técnica de inseminación será determinada por el número y costo de dosis disponibles por ciclo, estatus de la yegua a inseminar y fertilidad del semen congelado. Si la dosis

de semen son muy caras o solo tenemos una dosis disponible, se recomienda realizar una sola IA profunda en la punta del cuerno pos-ovulación con una pipeta flexible guiada transrectalmente. El número de pajuelas por dosis va a depender de la fertilidad de cada padrillo y de la técnica de inseminación. Si la yegua a inseminar es una yegua “problema”, susceptible a endometritis persistente pos-servicio, se recomienda realizar una IA profunda con baja dosis y bajo volumen (1 a 4 pajuelas) y aplicar un lavado uterino temprano 2 a 4 horas pos-IA. Si la yegua es una yegua fértil y hay disponibilidad de semen, se puede utilizar un esquema de inseminación a tiempo fijo con 2 inseminaciones por ciclo con una dosis completa.

Referencias bibliográficas

- Aurich, C., Schneider, J. (2014). Sex determination in horse. Current status and future perspectives. *Animal Reproduction Science*, 146, 334-341.
- Bader, H. (1982). An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. *J Reprod Fertil*, 32, 59-64.
- Barbacini, S., Loomis, P., Squires, E. L. (2005). The effect of sperm numbers and frequency of insemination on pregnancy rates of mares inseminated with frozen-thawed spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 89, 203-205.
- Barbacini, S., Gulden, P., Marchi, V., Zavaglia, G. (1999). Incidence of embryo loss in mares inseminated before or after ovulation. *Equine Vet Educ*, 11, 251-254.
- Brinsko, S. P., Rigby, S. L., Lindsey, A. C., Blanchard, T. L., Love, C. C., Varner, D. D. (2003). Pregnancy rates in mares following hysteroscopic or transrectally-guided insemination with low sperm numbers at the utero-tubal papilla. *Theriogenology*, 59, 1001-9.
- Brinsko, S. P., Varner, D. D., Blanchard, T. L. (1991). The effect of uterine lavage performed four hours post insemination on pregnancy rate in mares. *Theriogenology*, 35, 1111-19.
- Brinsko, S. P. (2006). Insemination doses: How low can we go? *Theriogenology*, 66, 543-550.
- Bucca, S., Carli, A., Buckley, T., Dolcy, G., Fogarty, U. (2008). The use of dexamethazone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. *Theriogenology*, 70, 1093-1100.
- Buchanan, B. R., Seidel, G. E., McCue, P. M., Schenk, J. L., Erickson, L. A., Squires, E. L. (2000). Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. *Theriogenology*, 53, 1333-1344.
- Canisso, I. F., Stewart, J., Couthinho Da Silva, M. A. (2016). Managing persistent post-breeding endometritis. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 32, 465-80.
- Cazales, N., Sandra, F., Cavestany, D., Mattos, R. C. (2018). Do Insemination dose and site with frozen semen affect

- sperm transport and inflammatory response in mares? *J Equine Vet Sci*, 66, 109-110.
- Clément, F., Duchamp, G., Larry, J. L., Vidament, M. (2005). Effects of frequency of insemination, number of spermatozoa and insemination site on fertility of equine frozen semen. *Anim Reprod Sci*, 89, 208-11.
- Cuervo-Arango, J., Martín-Peláez, S., Claes, A. N. (2020). A practical guide to estimate the age of the early CL by ultrasonography in mares examined for the first time to be used as recipients in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology*, 153, 48-53.
- Clulow, J. R., Buss, H., Sieme, H., Rodger, J. A., Cawdell-Smith, A. J., Evans, G., Rath, D., Morris, L. H. A., Maxwell, W. M. C. (2008). Field fertility of sex-sorted and non-sexsorted frozen-thawed stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 108, 287-297.
- Clulow JR, Evans G, Morris LHA, Maxwell WMC (2009). Factors influencing the “sortability” of stallion spermatozoa into X and Y chromosome bearing populations. *Anim Reprod Sci*, 113, 220-228.
- Dell’Aqua, J. R. J. A., Papa, F. O., Lopes, M. D., Alvarenga, M. A., Macedo, L. P., Melo, C. M. (2006). Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen. *Anim Reprod Sci*, 94, 270-3.
- Fiala, S. M., Cruz, L. A., Rodrigues, R., Jobim, M. I. M., Gregory, R. M., Mattos, R. C. (2010). Sperm cells in the reproductive tract of the mare: Where can we find them? *Pferdeheilkunde*, 26, 19-21.
- Fiala, S. M., Pimentel, C. A., Mattos, A. L. G., Gregory, R. M., Mattos, R. C. (2007). Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. *Theriogenology*, 67, 556-62.
- Gomes, G. M., Crespilho, A. M., Leão, K. M., Jacob, J. C. F., Gomes, L. P. M., Segabinazzi, L. G., Papa, F. O., Alvarenga, M. A. (2019). Can sperm selection, inseminating dose and artificial insemination technique influence endometrial inflammatory response in mares? *J Equine Vet Sci*, 73, 43-47.
- Govaere, J. L., Hoogewijs, M. K., De Schauwer, C. (2014). Effect of artificial insemination protocol and dose of frozen/thawed stallion semen on pregnancy results in mares. *Reprod Domest Anim*, 49, 487-91.
- Graham, J. K. (2011). Principles of Cryopreservation. In: *Equine Reproduction* (2nd ed., pp. 2959-2963). Philadelphia: Wiley-Blackwell.
- Güvenc, K., Reilas, T., Katila T. (2005). Effect of frozen semen on the uterus of mares with pathological uterine changes. *Reprod Nutr Dev*, 44, 243-50.
- Hayden, S. S., Blanchard, T. L., Brinsko, S. P., Varner, D. D., Hinrichs, K., Love, C. C. (2012). Pregnancy rates in mares inseminated with 0.5 or 1 million sperm using hysteroscopic or transrectally guided deep-horn insemination techniques. *Theriogenology*, 78, 914-920.
- Immonen, I., Cuervo-Arango, J. (2020). Effect of Timing of Post-ovulatory Insemination Relative to hCG/ Buserelin Treatment with 1 Straw of frozen-thawed semen on Mare Fertility. *J Equine Vet Sci*, 87, 102900.
- Katila, T. (1997). Interactions of the uterus and semen. *Pferdeheilkunde*, 13(5), 508-511.
- Katila, T. (2012). Post-mating inflammatory responses of the uterus. *Reprod Domest Anim*, 47, 31-41.
- Katila, T., Sankari, S., Makela, O. (2000). Transport of spermatozoa in the reproductive tracts of mares. *J Reprod Fertil Suppl*, 56, 571-8.
- Koskinen, E., Lindeberg, H., Kuntsi, H., Ruotsalainen, L., Katila, T. (1990). Fertility of mares after postovulatory insemination. *J Vet Med Assoc*, 37, 77-80.
- Kotilainen, T., Huhtinen, M., Katila T. (1994). Sperm induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*, 41, 629-636.
- Lewis, N., Morganti, M., Collingwood, F., Grove-White, D. H., Argo, C. M. (2015). Utilization of One-Dose Postovulation Breeding With Frozen-Thawed Semen at a Commercial Artificial Insemination Center: Pregnancy Rates and Postbreeding Uterine Fluid Accumulation in Comparison to Insemination With Chilled or Fresh Semen. *J Equine Vet Sci*, 20(1-6). <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2015.07.008>
- Loomis, P. R. (2001). The equine frozen semen industry. *Anim Reprod Sci*, 68, 191-200.
- Loomis, P. R. Squires EL (2005). Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology*, 64, 480-91.
- Love, C. C. (2012). Measurement of Concentration and Viability in Stallion Sperm. *J Equine Vet Sci*, 32(8), 464-466.
- Lyle, S. K., Ferrer, M. S. (2005). Low-dose insemination-Why, when and how. *Theriogenology*, 64, 572-579.
- Metcalf, E. L. (2007). The efficient use of equine cryopreserved semen. *Theriogenology*, 68, 423-428.
- Morris, L. H., Hunter, R. H., Allen, W. R. (2000). Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *J Reprod Fertil*, 118, 95-100.
- Morris, L. H., Allen WR. (2002). An overview of low dose insemination in mares. *Reprod Domestic Anim*, 37, 206-210.
- Morris, L. H., Tiplady, C. A., Allen, W. R. (2003). Pregnancy rates in mares after a single fixed-time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa onto the uterotubal junction. *Equine Vet J*,

- 35, 197-201.
- Nikolakopoulos, E., Watson, E. D. (2000). Effect of infusion volume and sperm numbers on persistence of uterine inflammation in mares. *Equine Vet J*, 32, 164-166.
- Newcombe, J. R. (1996). Ultrasonography of ovulation and development of the corpus luteum in the mare: a personal view. *Equine Vet Educ*, 8, 47-58.
- Newcombe, J. R., Paccamonti, D. L., Cuervo-Arango, J. (2011). Reducing the examination interval to detect ovulation below 12 h does not improve pregnancy rates after postovulatory insemination with frozen/thawed semen in mares. *Anim Reprod Sci*, 123, 60-63.
- Newcombe, J. R., Cuervo-Arango, J. (2011). The effect of time of insemination with fresh cooled transported semen and natural mating relative to ovulation on pregnancy and embryo loss rates in the mare. *Reprod Domest Anim*, 46, 678-681.
- Pickett, B. W., Voss, J. L., Squires, E. L., Vanderwall, D. K., McCue, P. M., Bruemmer, J. E. (2000). Collection, preparation and insemination of stallion semen. In: *Bulletin No 10 Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory* (pp. 94-95). Fort Collins: Colorado State University.
- Pierson, R. A., Ginther, O. J. (1985). Ultrasonic evaluation of the corpus luteum in the mare. *Theriogenology*, 23, 795-80.
- Ramírez, C. H., Domínguez, E., Bragulat, A. F., Flores, S., Barrios, P. P., Ugaz, C., Clemente, H., Giojalas, L., Losinno, L. (2017). Nano-partículas magnéticas para separación de espermatozoides X en semen equino. Resultados preliminares. En: *Resúmenes de las Segundas Jornadas Internacionales de Biotecnologías Reproductivas en Equinos* (pp. 281-294). Buenos Aires: Facultad de ciencias Veterinarias, Universidad del Salvador.
- Sánchez, R. (2015). Resultados de un programa comercial de transferencia de embriones de gran escala con inseminación artificial profunda. En: *Resúmenes de la Primera Jornada Internacional de Biotecnologías Reproductivas en Equinos* (pp. 49-56). Buenos Aires: Sociedad Argentina de Tecnologías Embrionarias.
- Samper, J. C., Morris, L., Peña, F. J., Plough, T. A. (2012). Commercial breeding with sexed stallion semen: reality or fiction? *J Equine Vet Sci*, 32, 471-474.
- Samper, J. C., Plough, T. (2010). Techniques for the Insemination of Low Doses of Stallion Sperm. *Reprod Dom Anim*, 45 (Suppl. 2), 35-39.
- Samper, J. C., Stanford, M. S., French, H. M., Chapwanya, A. (2016). Post-breeding inflammation in mares after insemination with large and low doses of fresh or frozen semen. *Pferdeheilkunde*, 32, 24-26.
- Samper, J. C., Vidament, M., Katila, T., Newcombe, J., Estrada, A., Sargeant, J. (2002) Analysis of some factors associated with pregnancy rates of frozen semen: a multi-center study. *Theriogenology*, 58, 647-50.
- Sieme, H., Schäfer, T., Stout, T. A., Klug, E., Waberski, D. (2003). The effect of different insemination regimes on fertility in mares. *Theriogenology*, 60, 1153-64.
- Sieme, H., Bonk, A., Hamann, H., Klug, E., Katila, T. (2004). Effects of artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology*, 62, 915-28.
- Sieme, H. (2011). Freezing semen. In: McKinnon, A.O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds). *Equine Reproduction* (2nd ed., pp. 2972-2982). Ames: Wiley-Blackwell.
- Scott, M. A., Liu, I. K. M., Overstreet, J. W., Enders, A. C. (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.
- Scott, M. A., Liu, I. K. M., Overstreet, J. W. (1995). Sperm transport to the oviducts: Abnormalities and their clinical implications. *Proc Am Assoc Equine Pract*, 41(1).
- Townson, D. H., Ginther, O. J. (1989). Ultrasonic echogenicity of developing corpora lutea in pony mares. *Anim Reprod Sci*, 20, 143-153.
- Varner, D. D., Love, C. C., Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Hartman, D. L., Bliss, S. B., Carroll, B. S., Esch, M. C. (2008). Semen processing for the subfertile stallion. *J Equine Vet Sci*, 28, 677-85.
- Volkman, D. H., Van Zyl, D. (1987). Fertility of stallion semen frozen in 0.5 ml straws. *J Reprod Fertil Suppl*, 35, 143-148.
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 60/61, 481-92.
- Woods, J., Bergfelt, D. R., Ginther, O. J. (1990). Effect of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic loss rate in mares. *Equine Vet J*, 22(6), 410-415.

Notas de contribución:

Nicolás Cazales es el autor principal, realizó la búsqueda bibliográfica y redactó el artículo.

Maria José Estrade y Rodrigo Mattos colaboraron con las correcciones del texto.

El editor Cecilia Cajarville aprobó este artículo.