

## USO DE SEMEN CONGELADO EN PROGRAMAS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN EQUINOS

Use of frozen-thawed semen in equine artificial insemination programmes

A. Alonso, C. Baca Castex, M. Pinto, M. Caldevilla, A. Ferrante, M. Miragaya

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, INITRA, Cátedra de Teriogenología, Buenos Aires, Argentina

E-mail:

### RESUMEN

El uso de semen congelado en equinos presenta resultados muy variables. Los porcentajes de preñez con semen congelado descongelado por ciclo varían de 10% a 70%. Con respecto a la dosis inseminante, si bien se ha recomendado el uso de 280 a 320 millones de espermatozoides con movilidad progresiva, bajo condiciones experimentales es posible obtener resultados aceptables con dosis más bajas de 50 a 100 millones. Para la inseminación con semen congelado se prefiere optar por el tipo de inseminación intrauterina profunda, que consiste en depositar la dosis en el fondo del cuerno uterino ipsilateral a la ovulación. Las yeguas jóvenes en general presentan buena condición uterina y ello aumenta sus probabilidades de preñez. Es importante realizar un correcto seguimiento ginecológico, que permita determinar el momento adecuado para inducir la ovulación. Las hormonas empleadas para la inducción de ovulación pueden ser Gonadotropina Coriónica humana (hCG) o deslorelina. Se puede optar también por una inseminación a tiempo fijo o por un protocolo de seguimiento ecográfico con inseminación dentro de las 6 horas de ovulación. Este es el mejor protocolo y brinda los mejores resultados de preñez. Nuestro laboratorio maneja un protocolo que incluye el monitoreo cada 6 horas, comenzando 24 horas luego de la inducción de la ovulación, con una tasa de preñez a primera inseminación del 73%. Si tenemos en cuenta que una de las desventajas en la inseminación con semen congelado es que su fertilidad suele estar disminuida, estos resultados son muy alentadores, ya que son equiparables a los resultados obtenidos con semen fresco o refrigerado. Esto representa una gran ventaja cuando se tiene almacenado semen congelado de padrillos que murieron, que han sido vendidos al exterior, o incluso castrados.

**Palabras clave:** equino, semen congelado, inseminación, dosis inseminante

### ABSTRACT

The use of equine frozen semen has variable results. Pregnancy rates per cycle may be between 10 to 70%. Although an inseminating dose of 280 a 320 x 10<sup>6</sup> progressive motile sperm (PMS) has been recommended, under experimental conditions it is possible to obtain acceptable results with doses of 50 to 100 x 10<sup>6</sup> PMS. Deep intrauterine insemination is preferred when using frozen thawed semen, which consists in depositing the dose at the tip of the horn, ipsilateral to ovulation. Young mares usually have better uterine condition and that increase their chance of become pregnant. It is important to make a correct follicular monitoring, in order to determine the right time to induce ovulation. Ovulation may be induced with Human Chorionic Gonadotrophin (hCG) or deslorelin. It possible to perform a fixed time insemination or to choose an ultrasound follicular following protocol, inseminating within 6 h of ovulation. This option offers the best pregnancy rates. Our laboratory manages a protocol which includes ultrasound monitoring every 6 hours, beginning 24 hours after induction of ovulation; this protocol had a first insemination pregnancy rate of 73%. If we consider that one of the main disadvantages of frozen-thawed semen is decreased fertility, these results are encouraging, since they are similar to those obtained with fresh or cooled semen, so it may represent an advantage when having stored semen of stallions that are dead, or have been sold or even castrated.

**Keywords:** equine, frozen semen, insemination, inseminating dose.

## INTRODUCTION

En los últimos años el uso del semen congelado en equinos ha incrementado su aplicación, aunque aún dista de tener el uso masivo y la eficiencia que observamos en especies como los bovinos. En bovinos, los toros se han ido seleccionando durante años en base a la habilidad del semen para soportar el estrés causado por los protocolos de criopreservación. Esta selección ha llevado a una respuesta positiva y uniforme en aquellos toros elegidos para criopreservar. En equinos, aunque se congele, almacene y descongele correctamente, existe una respuesta muy variable entre padrillos ya que no se ha aplicado este tipo de selección.

Entre las ventajas que ofrece el semen congelado, en comparación con el semen refrigerado, se encuentran: la posibilidad de colectar en una época del año concreta, sin necesidad de ajustarse a la estacionalidad reproductiva; el uso de semen de padrillos ya muertos o castrados; una organización más sencilla de los pedidos de semen, ya que las dosis pueden mantenerse por tiempo indefinido, permitiendo incluso su importación y el uso más eficiente del semen, ya que todo el eyaculado es procesado para producir dosis seminales.

Existen algunas desventajas en la utilización de semen congelado y generalmente se reportan menores tasas de preñez por ciclo. Esto se atribuye a diversos factores, entre los que se citan: la variabilidad de los protocolos de congelamiento; la fertilidad intrínseca de cada padrillo y la menor longevidad del semen una vez depositado en el útero de la yegua (Cuervo-Arango, 2015). La gran variabilidad entre padrillos determina que no se puedan estandarizar los protocolos para el congelamiento de semen en equinos. Existen diversos diluyentes utilizados comúnmente pero ninguno es necesariamente mejor que el otro para todos los padrillos; cada padrillo parece preferir una fórmula específica.

Selección de las yeguas para ser inseminadas con semen congelado

Es importante que el veterinario concientice al criador de que no todas las yeguas son aptas para ingresar a un programa de inseminación con semen congelado. Cada yegua debería ser sometida a un examen de aptitud reproductiva que incluya: evaluación de su conformación perineal, palpación, ecografía, vaginoscopia y citología. En algunos casos también puede ser conveniente realizar un cultivo bacteriológico y una biopsia endometrial. De esta forma es posible corregir defectos, mejorar la condición uterina o decidir si no es considerada apta para IA con semen congelado-descongelado (Miller, 2008).

Dosis inseminante

Dada la variedad de criterios para reportar la dosis inseminante y los diferentes factores en los distintos sistemas, durante años ha sido difícil estandarizar este parámetro. Para ello, la Federación Mundial para la Cría de Caballos de Deporte ([www.wbfs.org](http://www.wbfs.org)) estableció para sus países miembros el uso de una dosis de  $250 \times 10^6$  espermatozoides móviles progresivos, con un porcentaje de motilidad progresiva post-descongelado de 35%. No obstante este valor muchas veces es mayor al que permite obtener buenos resultados con cada padrillo.

Hay numerosos estudios que han ensayado rangos de dosis sumamente variadas: Sieme *et al.* (2004) no obtuvieron

diferencias entre  $100 \times 10^6$  (55/123, 45%) vs.  $800 \times 10^6$  (9/21, 43%) espermatozoides totales con 35% de movilidad progresiva, mientras que sí las hubo al comparar  $50 \times 10^6$  (11/39, 26%), vs.  $400 \times 10^6$  (19/39, 46%) espermatozoides totales (Clément *et al.*, 2005) y también  $137 \times 10^6$  (14/35, 40%) vs.  $27 \times 10^6$  (5/35, 14%) espermatozoides móviles progresivos (Govaere *et al.*, 2014). En nuestro equipo no se obtuvieron diferencias al inseminar con dosis de  $30-50 \times 10^6$  (16/21, 76%) vs.  $60-200 \times 10^6$  espermatozoides móviles progresivos (14/18, 78%) (Alonso *et al.*, 2008).

Esto evidencia que la dosis mínima para obtener resultados aceptables es particular de cada sistema, y en ella influyen muchos factores, además de la fertilidad intrínseca del padrillo, como el protocolo de congelamiento, el manejo de las yeguas, el tipo de maniobra de inseminación, etc.

Inducción de la ovulación

Al trabajar con semen congelado, debemos considerar lo importante de realizar un correcto seguimiento ginecológico, que incluya retajeo, palpación y ecografía, que nos permitirá determinar el momento adecuado para inducir la ovulación. Se considera conveniente inducir ovulación cuando la yegua presenta conducta de celo, edema uterino visible por ecografía, cérvix abierto a la palpación y un folículo mayor o igual a 35 mm. Las hormonas empleadas para la inducción de ovulación pueden ser Gonadotropina Coriónica humana (hCG) (1800 a 2500 UI EV), o análogos de GnRH (Factor liberador de gonadotropinas hipotalámico) como la deslorelina biorelease (1ml IM) y análogos de LH-RH (Factor liberador hipotalámico de LH) como la histrelina (0,5-1 mg IM). En la yegua, la hCG tiene acción principalmente LH e induce ovulación dentro de las 48 hs, más frecuentemente entre las 36 y 42 horas post-aplicación. La deslorelina y la histrelina inducen ovulación entre las 40 y 44 hs (Alonso *et al.*, 2016).

Sitio de IA

El sitio donde se deposita el semen en una inseminación también juega un rol importante: el semen puede ser depositado en el cuerpo uterino (inseminación tradicional) o en el extremo del cuerno uterino, en la unión uterotubárica ipsilateral al folículo ovulatorio o a la ovulación (inseminación profunda). Esta última es la preferida desde hace varios años al inseminar con semen congelado. Para la inseminación profunda se puede optar entre la técnica histeroscópica o inseminar por vía transvaginal con ayuda transrectal. Aunque los reportes iniciales sobre técnicas de inseminación profunda con dosis baja en la yegua estuvieron basados en procedimientos guiados endoscópicamente para depositar el semen en la unión uterotubárica (papila), en trabajos más recientes se ha utilizado la técnica de colocación de la pipeta de inseminación transvaginal y luego por vía transrectal guiar el catéter flexible hasta el extremo del cuerno uterino, donde se encuentra la papila. Esta última opción reporta mejores resultados y permite prescindir de un equipo costoso como es el endoscopio (Alonso *et al.*, 2016).

Número de inseminaciones

La inseminación con semen congelado requiere un manejo particular ya que la criopreservación pre-capacita a los espermatozoides y reduce su capacidad de fertilización a un lapso aproximado de 6 hs post-IA, por lo tanto es necesario inseminar sobre ovulación. Para ello, se puede optar por una inseminación a tiempo fijo o por un protocolo de seguimiento ecográfico con inseminación dentro de las 6 horas de

ovulación. Este es el mejor protocolo y brinda los mejores resultados de preñez.

En el caso de la IA prefijada se han presentado varios protocolos de IA, entre los que se menciona aquel que contempla dos inseminaciones aproximadamente a las 30 y a las 40 horas luego de la inducción de ovulación. De este modo es posible tener cubierto un rango de tiempo en el cual es bastante probable que la yegua ovule, con espermatozoides capaces de fertilizar presentes en la unión útero-tubárica. Aunque este protocolo permite realizar menos revisiones de la yegua en el período periovulatorio, tiene como desventajas el uso de dos dosis inseminantes y la realización de dos maniobras de IA profunda, lo que implica una mayor reacción inflamatoria en el útero y mayor riesgo de contaminación. Sin embargo, la mayor desventaja es el costo de la dosis inseminante, especialmente cuando se trata de semen importado o de gran valor genético (Baca Castex *et al.*, 2016).

Nuestro laboratorio maneja un protocolo que incluye el monitoreo cada 6 horas, comenzando 24 horas luego de la inducción de la ovulación. Una vez detectada la misma se insemina en la unión uterotubárica del cuerno ipsilateral (cuerpo hemorrágico visible por ecografía), utilizando un catéter estéril flexible de 75 cm de longitud (Minitüb®) colocado por vía transcervical y guiado por manipulación transrectal. Es posible completar este protocolo con la aplicación de 10 a 20 UI de oxitocina 4 a 6 horas luego de la inseminación, para facilitar las contracciones uterinas que ayudan a la evacuación de restos de diluyente, espermatozoides muertos, etc.

Los porcentajes de preñez promedio por ciclo para yeguas inseminadas con semen congelado son del 30 al 40%. Algunos padrillos pueden tener porcentajes de preñez por ciclo del 50 al 70% mientras que con el semen congelado de otros padrillos no se logre obtener una preñez. En general, el porcentaje de preñez promedio por ciclo para semen congelado es un 5 a 10% más bajo que el obtenido con semen refrigerado (Sanchez *et al.*, 2009)

En un estudio retrospectivo sobre 85 yeguas de entre 3 y 15 años de edad en las que se aplicó este protocolo se obtuvo una tasa de preñez a primoinseminación del 72,9% (Caldevilla y Miragaya, comunicación personal). Si tenemos en cuenta que una de las desventajas en la inseminación con semen congelado es que su fertilidad suele estar disminuida, estos resultados son muy alentadores, ya que son equiparables a los resultados obtenidos con semen fresco o refrigerado. Esto representa una gran ventaja cuando se tiene almacenado semen congelado de padrillos que murieron, que han sido vendidos al exterior, o incluso castrados.

#### Procedimientos post-inseminación

En respuesta a estas maniobras de inseminación, pueden evidenciarse diversas reacciones por parte de la yegua, como contracciones miométricas e inflamación uterina, que se reflejan con mayores niveles de neutrófilos y presencia de líquido intrauterino. Esta inflamación es inicialmente una respuesta fisiológica normal al servicio, pero se ve exacerbada por componentes del diluyente de semen (Miller, 2008). Las yeguas jóvenes y con buena condición uterina suelen estar mejor preparadas para resolver este tipo de reacciones y ello aumenta sus probabilidades de preñez. En estas yeguas con condición uterina adecuada la reacción

inflamatoria alcanza su mayor nivel a las 8 hs post-inseminación y el líquido debería ser evacuado a las 12 hs post-inseminación.

En los casos en que sea conveniente tomar medidas que ayuden a resolver esta inflamación post-inseminación, es posible actuar a partir de las 4 horas de haber inseminado. Las opciones de tratamiento van desde múltiples inyecciones de oxitocina, la realización de lavajes uterinos, el uso de antibióticos y la aplicación de dexametasona (240mg IM).

#### CONCLUSIÓN

Todo indica que en el futuro la demanda de semen congelado seguirá creciendo junto con la industria equina. Ello requerirá de avances en las técnicas de congelamiento, así como del uso de protocolos de manejo que incluyan un metódico seguimiento de la dinámica folicular para determinar el momento y las condiciones óptimas para la inseminación.

#### REFERENCIAS

- Alonso A, Pinto M, Gambarotta M, Miragaya M. Obtención de preñeces en equinos por primo-inseminación utilizando semen congelado-descongelado a dosis mínima. Revista de Bioestadística. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina 2008, 39, 26-29.
- Alonso A, Caldevilla M, Pinto M, Miragaya M. Inseminación con semen congelado en equinos. Revista del colegio de veterinarios de la provincia de Bs As, 2016 Vol 66, p. 19-20.
- Baca Castex C, Alonso A, Miragaya M. Manejo Reproductivo y Avances en Inseminación Artificial. 6to Congreso Internacional de Reproducción Animal, Asunción, Paraguay. 11-12 agosto 2016.
- Clément F, Duchamp G, Larry JL, Vidament M. Effects of frequency of insemination, number of spermatozoa and insemination site on fertility of equine frozen semen. Anim Reprod Sci 2005, 89:208–211.
- Cuervo-Arango J. Inseminación artificial con semen congelado: dosis, frecuencia y momento óptimo de la IA. Proceedings del Primer Encuentro Internacional de Reproducción Equina, Fundación Tronador, Chile, diciembre 2015, pág 49 a 57.
- Govaere JL, Hoogewijs MK, De Schauwer C, De Vliegheer S, Van Soom A, Duchateau L, de Kruif A. Effect of artificial insemination protocol and dose of frozen/thawed stallion semen on pregnancy results in mares. Reprod Domest Anim. 2014 Jun; 49(3):487-91.
- Miller CD. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. Theriogenology; 2008, 70:463-468.
- Sanchez R, Gomez I, Samper JC. Artificial Insemination with Frozen Semen. En Samper JC. Equine Breeding Management an Artificial Insemination: St. Louis: Editorial Elsevier. 2009,175-183.
- Sieme H, Bonk A, Hamann H, Klug E, Katila T. Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses of fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. Theriogenology; 2004, 62: 915–28.