

RESPUESTA DE LOS NEUTRÓFILOS POLIMORFONUCLEARES LUEGO DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON DIFERENTES COMPONENTES EN VACAS EN LA AMAZONÍA ECUATORIANA

Inflammatory response of the uterus after insemination in cows of the Ecuadorian Amazon

R.O. Quinteros-Pozo^{1,6}, D.O. Yáñez-Avalos¹, J.C. López-Parra^{1,2}, M.E. Ortega³, J. Masaquiza¹,
S. Bernardi^{1,4,5}, P.R. Marini^{1,4,5}

¹ Centro Latinoamericano de Estudios de Problemáticas Lecheras (CLEPL), Argentina

² Universidad Estatal Amazónica- Centro de Investigación, Posgrado y Conservación Amazónica - Ecuador.

³ Ministerio de Agricultura y Ganadería-Ecuador.

⁴ Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional de Rosario – Argentina.

⁵ Consejo de Investigaciones (CIC-UNR), Argentina.

⁶ Universidad Técnica del Norte – Ecuador.

* Corresponding author
P.R. Marini
E-mail: pmarini@unr.edu.ar

Recibido: 25/11/19

Aceptado: 20/12/2019

Publicado: 31/12/2019

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the response of the polymorphonuclear neutrophils after an artificial insemination with different components in cows of the Ecuadorian Amazon. On October 20, 2018, 12 crossed dairy cows were used which belong to the dairy rodeo of the Centre of Research, Postgraduate and Conservation of the Amazon Biodiversity. The cows were all randomly divided in a similar period into three groups: cows, inseminated with distilled water (n = 4); cows, inseminated with diluent by Triladyl © (n = 4) and cows, inseminated with conventional semen, tested and with high fertilization marketed by Showcase Selections (n = 4). Before proceeding with the artificial insemination, cytological samples were taken from every cow using the technology of cytobrush. After the insemination of the three groups, the cytobrush and blood samples were repeated at 4 hours, 8 hours and 12 hours after insemination, having a total of 48 repetitions. The response of the N-PMN is observed for each treatment, showing that there are only significant differences (P≤0.05) in which semen is used in an artificial insemination. Showing a peak of N-PMN at 8 hours after being inseminated, it is exceeding the 5% limit to consider it a subclinical endometritis. It is concluded that there is a response of polymorphonuclear neutrophils after the artificial insemination with semen in cows of the Ecuadorian Amazon.

Keywords: *Neutrophils, Spermatozoa, Cows, Uterus.*

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta de los neutrófilos polimorfonucleares luego de la inseminación artificial con diferentes componentes en vacas en la Amazonía Ecuatoriana. El 20 de octubre de 2018, se utilizaron 12 vacas cruzas lecheras pertenecientes al rodeo lechero del Centro de Investigación, Posgrado y Conservación de la Biodiversidad Amazónica. Las vacas, todas en similar periodo se dividieron aleatoriamente en tres grupos: vacas inseminadas con agua destilada (n = 4), vacas inseminadas con diluyente marca Triladyl © (n = 4) y vacas inseminadas con semen convencional probado y de alta fertilidad comercializado por Showcase Selections (n=4). Antes de proceder a la inseminación artificial se tomaron de todas las vacas muestras citológicas del endometrio por la técnica de cytobrush. Luego de la inseminación de los tres grupos, se repitieron los muestreos de cytobrush y sangre a las 4 horas, 8 horas y 12 horas de inseminadas, teniendo un total de 48 repeticiones. Se observa la respuesta de los N-PMN para cada tratamiento, mostrando que sólo hay diferencias significativas (P≤0,05) en donde se utiliza semen en la inseminación artificial. Mostrando un pico de N-PMN a las 8 horas de haber sido inseminada, superando el límite del 5% para considerarla endometritis subclínica. Se concluye que existe respuesta de los neutrófilos polimorfonucleares luego de la inseminación artificial con semen en vacas en la Amazonía Ecuatoriana

Palabras clave: *Neutrófilos, espermatozoides, vacas, útero.*

INTRODUCCION

Se ha demostrado que el plasma seminal modifica muchas funciones fisiológicas e inmunológicas en diferentes especies (Alghamdi et al., 2004; Alghamdi y Foster, 2005). Entre las barreras encontradas por las células espermáticas en la inseminación se encuentra el flujo bien documentado de neutrófilos en el lumen del tracto reproductivo de la hembra (Alghamdi et al., 2001, 2004).

El ingreso de neutrófilos después de la deposición del semen es importante para combatir la contaminación microbiana introducida durante el proceso de reproducción y la eliminación de células espermáticas en exceso y muertas. Sin embargo, se ha demostrado que la presencia de neutrófilos en el momento de la deposición del semen reduce la fertilidad en diferentes especies, incluyendo bovinos y equinos (Alghamdi et al., 2004; Kasimanickam et al., 2004, 2005). La endometritis posterior al apareamiento ha sido ampliamente estudiada en caballos, ya que se considera que causa infertilidad. Se sabe que la inflamación también ocurre en el ganado, pero no se ha investigado de la misma manera.

Los espermatozoides, el plasma seminal y los extensores de semen juegan un papel en la inducción de la inflamación. Además, el número de espermatozoides, la concentración y la viabilidad, así como el sitio de depósito del semen, pueden modular la respuesta inflamatoria. Las citoquinas, los leucocitos polimorfonucleares y las células mononucleares representan la respuesta inflamatoria uterina en el momento del servicio. La inflamación es la primera línea de defensa y elimina el exceso de espermatozoides y bacterias. La deposición de semen provoca una migración de células blancas masiva de neutrófilos polimorfonucleares, seguida de fagocitosis de espermatozoides ayudada por la formación de trampas extracelulares de neutrófilos. La eliminación efectiva del exceso de esperma y subproductos inflamatorios y el posterior retorno rápido del endometrio al estado normal es un requisito previo para la preñez.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta inflamatoria que genera la práctica de inseminación artificial determinando el porcentaje de neutrófilos polimorfonucleares en vacas en la Amazonía Ecuatoriana comparando inseminación con pajuelas cargadas con agua, con diluyente y con semen normal.

MATERIALES Y MÉTODOS

El 20 de octubre de 2018, se utilizaron 12 vacas cruzas lecheras pertenecientes al rodeo lechero del Centro de Investigación, Posgrado y Conservación de la Biodiversidad Amazónica (CIPCA). Dicho centro está ubicado en el cantón Carlos Julio Arosemena Tola de la provincia de Napo (Ecuador), en el kilómetro 44 vía Puyo-Tena (coordenadas: S 01° 14.325'; W077° 53.134') y dispone de una superficie de 42 ha de pastos.

Clima

El ambiente es tropical con precipitaciones de 4000 mm/año, una humedad relativa promedio del 80% y temperaturas que varían entre los 25 y los 30 °C. Su topografía se caracteriza por relieves ligeramente ondulados sin pendientes

pronunciadas, distribuidos en mesetas naturales de gran extensión. La altitud varía entre los 580 y 990 msnm. Si bien los suelos presentan una composición muy heterogénea, la mayoría se origina en sedimentos fluviales procedentes de la región andina del país.

Alimentación y Sanidad

La alimentación de los bovinos en estudio, fue de pastoreo libre, con pastizales en base de *Brachiaria decumbens* (17.585 kg MS/ha/año), *Brachiaria brizantha* (26.970 kg MS/ha/año), *Arachispintoi* (6.212 kg MS/ha/año), *Desmodium ovalifolium* (5.890 kg MS/ha/año) y *Stylosanthes guianensis* (15.237 kg MS/ha/año). Se aplicó el manejo sanitario habitualmente empleado para el rodeo bovino del CIPCA, desparasitaciones, baños contra garrapatas y moscas, vacunaciones para fiebre aftosa, rabia bovina y estomatitis vesicular y la aplicación inyectable de vitaminas y minerales.

Animales

Se evaluó la condición corporal (CC) dentro de la escala de (1 a 5; Edmonson and Lean, 1989). Las hembras en estudio presentaron un promedio de $2,5 \pm 0,25$ de CC. Fueron seleccionadas también por la presencia de un CL o folículo > 10 mm de diámetro en sus ovarios por medio de palpación y ultrasonografía y también se evaluó el grado de desarrollo del tracto genital. Las vacas utilizadas en el estudio tuvieron un promedio 150 ± 10 días de posparto y todas en tercera lactancia. Los animales seleccionados se dividieron aleatoriamente en tres grupos: vacas inseminadas con agua destilada: IA (n = 4), vacas inseminadas con diluyente Triladyl©: ID (n = 4) y vacas inseminadas con semen convencional: IS probado y de alta fertilidad comercializado por Showcase Selections (n=4).

Sincronización y control reproductivo de las hembras

Se utilizó el protocolo J- Synch 60 horas IA +eCG: en el día cero se aplicó un dispositivo con progesterona (0,5 g) y 2 mg de benzoato de estradiol vía intramuscular. En el día seis se removió el dispositivo con progesterona y se observó la calidad del implante (Presencia o Ausencia de vaginitis) y se administró 500 µg de Cloprostenol más 500 unidades internacionales de gonadotropina sérica de yegua preñada (eCG-Folligon Huixquilucan-Estado de México). Al día nueve se aplicó 2,5 ml de acetato de busarelina (GnRH) vía intramuscular y fueron inseminadas a las 60 horas de retirado el dispositivo con progesterona. Al mismo tiempo que se cumplió con las actividades propias de la IATF se llevó a cabo un control reproductivo por ecografía constatando la ciclicidad y el desarrollo folicular en respuesta al tratamiento recibido: En el día 0 del protocolo de IATF se realizó la primera evaluación ecográfica, con el propósito de analizar el estatus uterino y ovárico, descartando posibles afecciones reproductivas y sobre todo animales acíclicos. En el día 6 se realizó una medición ecográfica del desarrollo folicular y seguimiento visual de la presencia de celo (moco vaginal y en flancos).

En el día 9: o proestro, a las 60 horas de la PGF se realizó otra ecografía para ver el comportamiento de los folículos en un proestro prolongado.

Muestras de endometrio

Antes de proceder a la inseminación artificial de cada vaca se tomó una muestra citológica del endometrio por la técnica de

cytobrush utilizando cepillos colectores endocervicales (Medibrush XL, Medical Engineering Co, SA). Para proteger la pistola de la contaminación vaginal, la misma fue cubierta con una vaina descartable. La región perineal y la vulva fueron higienizadas con solución yodada y toallas de papel absorbente. Con la muestra obtenida se realizaron dos impresiones sobre un portaobjetos limpio y debidamente rotulado, el que se fijó con spray citológico (Biopur) y se almacenó para su posterior tinción en el laboratorio. La tinción utilizada fue una panóptica comercial (Tinción 15, Biopur) y las preparaciones citológicas así logradas se observaron con microscopio binocular Olympus BH-2 a 400 X. En cada frotis se contaron un mínimo de 200 (doscientas) células totales (células epiteliales y células inflamatorias), a partir de las cuales se determinó el porcentaje de neutrófilos polimorfonucleares (N-PMN) variable que fue utilizada para determinar el grado de inflamación de la mucosa uterina.

Sangre

También muestras de sangre a las 0, 4, 8 y 12 horas, obtenidas por punción de la vena coccígea, con agujas y jeringas estériles, que se colocaron en tubos con anticoagulante EDTA a concentración de 3,7 a 5,4 μM . Se homogenizó la sangre anticoagulada, se colocó una gota de sangre sobre un portaobjeto limpio y desengrasado para la observación de la fórmula leucocitaria. Se tiñeron las extensiones antes de las 24 horas, por método de tinción panóptica de May-Grünwald-Giemsa. Se realizó un recuento manual de glóbulos blancos utilizando pipeta de Thoma, solución de Turk y cámara cuentaglóbulos de Neubauer.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron organizados y tabulados para su posterior análisis mediante estadística descriptiva determinado la media y error estándar. Las diferencias entre las medias fueron sometidas a un análisis de variancia a un criterio de clasificación y pruebas de comparaciones múltiples HSD de Turkey-Kramer HSD ($p \leq 0,05$). Se ajustó una curva a partir de la estimación de los parámetros del modelo. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa JMP, versión 5.0 para Windows (JMP®, 2003).

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra la respuesta de los N-PMN a los tres tratamientos, mostrando que sólo hay diferencias significativas ($P \leq 0,05$) a las 8 horas de la inseminación artificial entre los tratamientos en donde el semen mostró un porcentaje superando el límite del 5% para considerarla endometritis subclínica. El resto de los valores promedios se encuentran por debajo del 5% para los diferentes tratamientos y horas de la toma.

En la Figura 1 se observa el comportamiento de los tres tratamientos al largo del ensayo en los diferentes muestreos antes y después de la inseminación. En él se observa que el grupo de vacas inseminadas con agua destilada se mantiene estable hasta el final que se eleva sin superar el límite del 5% de N-PMN, de la misma manera se comportó el grupo de vacas inseminadas sólo con diluyente. Sin embargo, el grupo de vacas inseminadas con semen mostraron un crecimiento en el

porcentaje de N-PMN hasta alcanzar el máximo de 5,75% a las 8 horas para luego descender.

Tabla 1: Media aritmética y error estándar de % N PMN en citologías, expresados por grupo y tiempo de muestreo.

Tiempo/ tratamiento	Agua	Diluyente	Semen
0 horas	2,75 \pm 0,8 a	2,12 \pm 0,5 a	1,25 \pm 0,3 a
4 horas	3,25 \pm 0,6 a	4,83 \pm 0,7 a	2,87 \pm 0,6 a
8 horas	3,12 \pm 0,5b	3,66 \pm 1,0 ab	5,75 \pm 0,4 a
12 horas	4,62 \pm 0,8 a	4,83 \pm 1,0 a	4,00 \pm 0,6 a

Tamaño muestral: n = 4 individuos por grupo

a, b, c Valores con diferente letra por fila difieren al menos al 0,05.

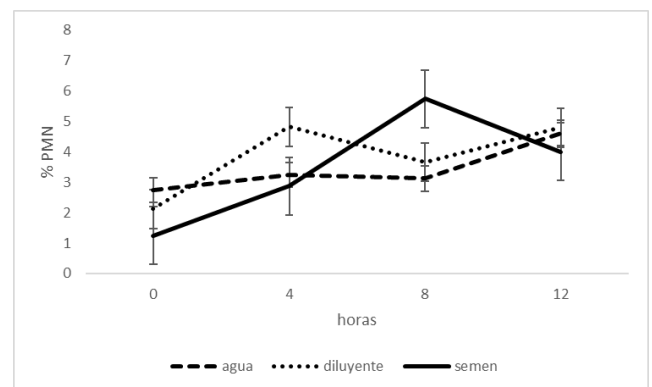


Figura 1: Media aritmética y error estándar del porcentaje de polimorfo nucleares neutrófilos en los tres tratamientos utilizados en la inseminación artificial.

Cuando el análisis se hace dentro de cada tratamiento el semen muestra diferencias significativas según la hora de la toma: 0 horas 1,25 \pm 0,3c, a las 4 horas 2,87 \pm 0,6bc, a las 8 horas 5,75 \pm 0,4a y las 12 horas 4,00 \pm 1,2ab mostrando diferencias significativas ($p \leq 0,05$). La respuesta de los N-PMN al tratamiento con semen mostró un pico de N-PMN a las 8 horas de haber sido inseminada, superando el límite del 5% para considerarla endometritis subclínica. Esto se observa en la Figura 2 en donde la relación entre el porcentaje de N-PMN y las horas transcurridas desde la inseminación artificial usando semen, en donde existe un crecimiento hasta las 8 horas posteriores a la inseminación y luego bajar a las 12 horas, en donde el mejor ajuste se logró con una regresión potencial ($R^2=0,83$).

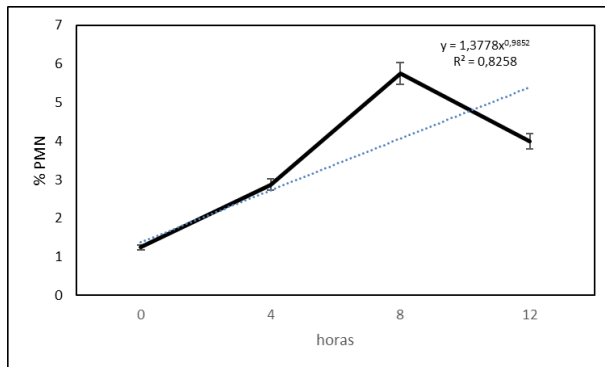


Figura 2: Media aritmética y error estándar del porcentaje de polimorfo nucleares en el tratamiento con semen en la inseminación artificial. Modelo potencial.

Los resultados obtenidos para el recuento de neutrófilos indican un promedio por tratamiento fue: IA (0 h: 60,3%, 4 h: 58%, 8 h: 45,5% y 12 h: 54%), ID (0 h: 53%, 4 h: 55,5%, 8 h: 46,6% y 12 h: 55%) y IS (0 h: 46%, 4 h: 55%, 8 h: 43,5% y 12 h: 38%), siendo similares entre los tres tratamientos y dentro de las diferentes tomas de sangre los valores que están por encima del rango están mayoritariamente en los tratamientos de IA e ID.

DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra que previo a la inseminación artificial entre los tres grupos, la salud uterina se encontraba en óptimas condiciones, medida a través del porcentaje de neutrófilos presentando valores entre 2,75 y 1,25 % de N-PMN por debajo del 5% de N-PMN según la clasificación por Rinaudo et al., 2012 para que se corrobore la presencia de endometritis subclínica en sistemas a pastoreo, sin mostrar diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Los resultados coinciden con los reportados por Maurino et al., 2012 en donde encontraron previo a la inseminación artificial el 2,58% de N-PMN en vaquillonas Holstein, sin embargo, en vaquillonas Hereford encontraron el 12,75% de N-PMN previo a la inseminación artificial. También en la Tabla 1 se observa la respuesta de los N-PMN a los tres tratamientos, mostrando que sólo hay diferencias significativas ($P \leq 0,05$) a las 8 horas de la inseminación artificial entre los tratamientos en donde el semen mostró un porcentaje superando el límite del 5% de N-PMN según la clasificación por Rinaudo et al., 2012 para considerarla endometritis subclínica. El resto de los valores promedios se encuentran por debajo del 5% de N-PMN para los diferentes tratamientos y horas de la toma.

La Figura 1 muestra el comportamiento de los tres tratamientos al largo del ensayo en los diferentes muestreos antes y después de la inseminación en donde los grupos de vacas inseminadas agua destilada y diluyente mantienen similar comportamiento hasta el último muestreo (12 horas) que se eleva sin supera el límite del 5% de N-PMN, esto último podría estar explicado por haberse manipulado varias veces el útero con las diferentes tomas. Sin embargo, el grupo de vacas inseminadas con semen muestran un crecimiento en el porcentaje de N-PMN hasta alcanzar el máximo de 5,75% a las 8 horas para luego descender a valores similares a los otros grupos por debajo del 5%.

La exposición de la mucosa uterina al plasma seminal y la secreción de las vesículas seminales indican un potencial desarrollo de los procesos inflamatorios en el útero de la especie bovina (Aloé et al., 2011). Esto coincide con los resultados de la Figura 1, en donde se observa un crecimiento del porcentaje de N-PMN por un proceso inflamatorio desarrollado. En la Figura 2 se observa la relación entre el porcentaje de N-PMN y las horas de toma de muestras de las vacas utilizadas en este tratamiento con semen, en donde el mejor ajuste lo lograron con una regresión potencial. En donde existe un crecimiento y luego una caída truncada, ya que baja pero podría faltar más tomas del estado del útero. Los resultados del porcentaje de neutrófilos en sangre varían de acuerdo al momento de la toma independientemente del tratamiento, superando el límite de 15 a 45% de referencia (Merck, 2007), sin mantener relación como la presencia de los N-PMN en la luz del útero. En general, la neutrofilia se presenta en los casos de liberación endógena de cortico esteroides, intoxicaciones agudas y crónicas, neoplasias, trastornos metabólicos, situaciones de estrés (Kelly, 1976; Benjamín, 1988). En este caso por el tipo de animal utilizado en la zona, pareciera que la misma se dio por una situación de estrés, coincidiendo con lo citado por Rodríguez, (2000).

Los resultados encontrados, no coinciden con los trabajos que plantean que el útero bovino, muestra sólo una débil respuesta inflamatoria después del apareamiento y que los espermatozoides no desencadenan una respuesta inmunológica detectable en el útero bovino, independientemente de la preparación de los espermatozoides, es decir, eyaculado fresco o congelados-descongelados. Luego del servicio, también puede observarse una invasión bacteriana inespecífica, que a menudo es superada naturalmente. Pero si el sistema de defensa falla se desencadena la endometritis (Blanch, 1994), y al no ser resueltas obligan al productor a descartar vacas, potencial fuente de producción de leche y vaquillonas de reposición. Los resultados de este trabajo se asemejan a los encontrados por Kaufmann et al., 2009, aunque este último trabajo no proporcionó información sobre el estado del endometrio antes de la IA.

CONCLUSIÓN

El trabajo realizado permitiría afirmar que la inflamación uterina, fundamentalmente la invasión de neutrófilos, causada en este caso en la práctica de la técnica de inseminación artificial se debería a la presencia de espermatozoides en el tracto genital de la hembra.

CÓDIGO DE ÉTICA

Los autores declaran que el estudio presentado se ha llevado a cabo de acuerdo con el Código de Ética para los experimentos con animales, tal y como se refleja en la normativa:

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores firmantes del presente trabajo de investigación declaran no tener ningún potencial conflicto de interés personal o económico con otras personas u organizaciones que puedan influir indebidamente con el presente manuscrito.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Preparación y ejecución: SB, PRM Desarrollo de la metodología: ROQP, DOYA, JCLP, MEO, JM Concepción y diseño: SB, PRM Edición del artículo: ROQP, JM Supervisión del estudio: SB, PRM

REFERENCIAS

- Aloé S, Weber F, Behr B, Sauter-Louis C, Zerbe H. Modulatory effects of bovine seminal plasma on uterine inflammatory processes. *Reprod. Domestic Anim.* 2011; 47(1): 12-19.
- Alghamdi AS, Foster DN. Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. *Biol. Reprod.* 2005;73: 1174–1181.
- Alghamdi A, Troedsson MH, Laschkewitsch T, Xue JL. Uterine secretion from mares with post-breeding endometritis alters sperm motion characteristics in vitro. *Theriogenology* 2001; 55: 1019–1028.
- Alghamdi AS, Foster DN, Troedsson MH. Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction* 2004; 127: 593–600.
- Blanch MS. La metritis bovina: Revisión. *INTA, RIA*, 1994; 25(1):1-11.
- Benjamín MM. *Manual de Patología Clínica Veterinaria*. Ed. Limusa, México. 1988 240p
- Edmondson AJ, Lean IJ. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J Dairy Sci*, 1989; 72:68-78
- Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 2004; 62:9–23.
- Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can.Vet. J.* 2005; 46: 255–259
- Kaufmann TB, Drillich M, Tenhagen BA, Forderung D, Heuwieser W. Prevalence of bovine subclinical endometritis 4h after insemination and its effects on first service conception rate. *Theriogenology*, 2009; 71(2): 385-391.
- Kelly, W R. *Diagnóstico Clínico Veterinario*. Ed. Aguilar, España. 1976 306-351 pp.
- Maurino A, Bernardi S, Rinaudo A, Marini PR. Prevalencia de endometritis subclínica antes y cuatro horas después de la inseminación artificial en vaquillonas. *Spermova* 2012; 2(1):47-48.
- MERCK *Manual Merck de veterinaria*. Editorial Océano. Sexta edición en español. 2007 pp 1200
- Rinaudo A, Bernardi SF, Marini PR. Punto de corte del porcentaje de neutrófilos para el diagnóstico de endometritis subclínica en vacas lecheras. XIII Jornadas de Divulgación Técnico - Científicas. Facultad de Ciencias Veterinarias - UNR - Argentina 2012 <https://fveter.unr.edu.ar/jornadas/>
- Rodríguez AL. Perfil metabólico del hato lechero del Zamorano. Tesis de grado. Universidad Zamorano – Honduras, 2000 pp30. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/5139/1/CPA-2000-T034.pdf>