



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**“TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN EQUINOS”
(RECOPIACION BIBLIOGRAFICA)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
FERNANDO ANTONIO HERNANDEZ MIRANDA**

ASESOR: MVZ. EUGENIO BRAVO QUINTANAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLAN



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijare,
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Transferencia de Embriones en Equinos"
(Recopilación Bibliográfica)

que presenta el pasante: Fernando Antonio Hernández Miranda
con número de cuenta: 9754454-2 para obtener el título de :
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Méx. a 7 de Enero de 2004

PRESIDENTE MVZ. Juan Alfonso Monroy Juárez

VOCAL MVZ. Felipe de Jesús Cortés Delgadillo

SECRETARIO MVZ. Eugenio Bravo Quintanar

PRIMER SUPLENTE M.C. Crisóforo Mercado Márquez

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Patricia Gómez de la Cruz

A G R A D E C I M I E N T O S

A DIOS Y AMIS PADRES † POR DARME LA OPORTUNIDAD DE CAMINAR POR EL SENDERO DE LA VIDA, ESPECIALMENTE A MI MADRE POR ENSEÑARME A LUCHAR HASTA EL ÚLTIMO MOMENTO.

A TODOS MIS HERMANOS EN ESPECIAL A AUREA Y A SU FAMILIA QUE HA SIDO MI FAMILIA EN ESTOS ÚLTIMOS AÑOS.

A LA UNAM Y A LA F.E.S. CUAUTITLAN POR ALBEREGARME DURANTE ESTOS AÑOS EN SUS INSTALACIONES Y PERMITIRME ALCANZAR UNO DE LOS OBJETIVOS MÁS IMPORTANTES DE MI VIDA.

A TODOS Y CADA UNOS DE LOS PROFESORES QUE HAN CONTRIBUIDO EN MI FORMACIÓN ACADÉMICA.

EN ESPECIAL AL M.VZ. EUGENIO BRAVO QUINTANAR POR TODO SU APOYO PARA REALIZAR ESTE TRABAJO.

A TODOS MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS CON LOS QUE HE COMPARTIDO TANTOS MOMENTOS AGRADABLES; OSCAR, MANUEL, TOÑO, RENE, ETC. Y EN ESPECIAL A MIRIAM POR TODO SU APOYO BRINDADO .

A TODOS GRACIAS.

ÍNDICE

I. Objetivos.....	2
II. Resumen.....	3
III. Introducción.....	4
IV. Aspectos reproductivos generales.....	6
a)-Aspectos reproductivos de la yegua.....	6
b)-Aspectos reproductivos del semental.....	9
V. Descripción de transferencia de embriones.....	11
a)- Ventajas de la transferencia de embriones en equinos.....	11
b)- Desventajas de la transferencia de embriones en equinos.....	13
c)- Selección de las yeguas donadoras y las yeguas receptoras.....	16
d)- Sincronización entre las yeguas donadoras y las yeguas receptoras.....	19
e)- Inseminación de la yegua donadora.....	24
f)- Recolección y evaluación de embriones equinos.....	27
1. Recolección embrionaria.....	27
2. Evaluación de la calidad embrionaria.....	35
3. Factores que afectan la recolección embrionaria.....	37
g)- Técnicas de transferencia de embriones.....	41
1. Técnica quirúrgica.....	41
2. Técnica no quirúrgica.....	43
h)- Gestación en la yegua receptora.....	44
i)- Conservación de embriones equinos.....	47
VI. Análisis de la información.....	51
VII. Conclusiones.....	54
VIII. Bibliografía.....	55

I. OBJETIVOS

1. Recopilar y actualizar la información referente a la transferencia de embriones en equinos.

2. Facilitar el acceso tanto a la información técnica como a los avances sobre dicho tema a los estudiantes de medicina veterinaria, médicos veterinarios en ejercicio profesional y criadores de caballos.

II. RESUMEN

En el presente trabajo se describe la transferencia de embriones en equinos, la cual es una técnica de reproducción asistida en la yegua, que consiste en recolectar mediante un lavado uterino el embrión de una yegua donadora, al cual se le realiza una evaluación morfológica y se transfiere por medio de una técnica no quirúrgica en la mayoría de las veces al útero de una yegua receptora que llevará la gestación a término. Para realizar la transferencia a la yegua receptora, ésta deberá ser sincronizada lo más cercano al día de ovulación de la yegua donadora.

También se mencionan las ventajas y avances que se han tenido con respecto a ésta técnica en la especie equina, así como las desventajas y las limitantes que no han permitido un amplio desarrollo comercial como en la especie bovina.

Aunque la transferencia de embriones en equinos ha tenido avances en los últimos años por ejemplo: lograr mejores porcentajes de gestación mediante transferencias no quirúrgicas y el desarrollo de métodos exitosos para el transporte de embriones refrigerados lo cual elimina la necesidad de mantener a las yeguas receptoras y donadoras en el mismo sitio de transferencia y permite ampliar el servicio; aún no ha alcanzado un impacto tan amplio como ha sucedido con los bovinos, ya que se ha enfrentado a mayores limitantes siendo las principales: las restricciones de las asociaciones de criadores, atraso en el congelamiento de embriones y la falta de productos comerciales para lograr la superovulación, lo que hace que el procedimiento sea costoso y a su vez hace que pocos criadores demanden esta técnica principalmente en países en vías de desarrollo como es el caso del nuestro.

III. INTRODUCCIÓN

El hombre al domesticar los caballos 5000 años atrás, comenzó a dirigir su reproducción. Existen evidencias que demuestran que algunos pueblos de Asia menor alrededor del 2,500 a.C. manejaban manadas de cría y castraban a los machos que no reunían las características requeridas como reproductores, por lo que el manejo de la reproducción, aún empíricamente y la aplicación de la tecnología no es una herramienta nueva en la relación del hombre con los animales. (10,31)

En la actualidad la industria de la reproducción equina es cada vez más exigente respecto a la eficiencia para la producción de potros de alto valor genético. Esto ha impactado fuertemente en el uso de la inseminación artificial y otras técnicas de reproducción asistida como la transferencia de embriones en algunos países; estas técnicas se han visto limitadas en equinos ya que algunas Asociaciones de Criadores no aceptan el registro de potros nacidos por inseminación artificial ni por transferencia de embriones (Pura Sangre Inglés) y también en parte por la fisiología reproductiva de la yegua, uno de los factores que ha limitado la transferencia de embriones en equinos ha sido la dificultad para inducir el crecimiento simultáneo de varios folículos en forma efectiva con el fin de obtener más embriones. Además la transferencia de embriones equinos congelados se ha atrasado en comparación con los embriones bovinos por razones biológicas y artificiales. (31,35,47,57)

Uno de los objetivos de la tecnología aplicada a la reproducción equina es aumentar la eficiencia reproductiva, por ejemplo, el número de crías obtenidas por animal en una temporada reproductiva. (6,31)

La primera transferencia de embriones fue reportada por Heape hace más de 100 años y se hizo en conejos, ésta técnica de reproducción asistida no fue desarrollada en equinos hasta la década de los 70s. El primer reporte de transferencia de embrión en equino fue comunicado por Oguri y Tsutsumi en Japón en 1972 y fue realizado en forma quirúrgica, sin embargo la técnica no fue aceptada como procedimiento en la industria equina hasta la década de los 80s. (6,29,36,39)

La transferencia embrionaria equina es una técnica de reproducción asistida que consiste en recolectar el embrión o embriones de una yegua donadora y transferirlo al útero de una yegua receptora que llevará a término la gestación. Aunque inicialmente el uso de la transferencia embrionaria en los programas comerciales fue limitado por la necesidad de tener un grupo de yeguas receptoras en el lugar de la recolección embrionaria o transportar a las yeguas donantes a los centros de transferencia embrionaria, actualmente hay avances en el desarrollo de métodos exitosos para el transporte de embriones refrigerados lo cual elimina la necesidad de mantener a las yeguas receptoras en el mismo sitio. (6,28)

El uso de la transferencia de embriones y el desarrollo de las tecnologías del embrión para los equinos han aumentado constantemente en las últimas dos décadas. La técnica de transferencia de embriones se ha transformado en un procedimiento común en la práctica equina en algunos países. Los principales países involucrados en transferencia de embriones equinos incluyen los Estados Unidos, Argentina, y Brasil. Otros países que usan transferencia de embriones en menor grado son: Australia, Canadá, Italia, Alemania y Francia. (47,57)

En México la inseminación artificial en equinos ha tenido un fuerte impacto principalmente en razas utilizadas para el salto. En cuanto a la transferencia de embriones son pocos los lugares en que realizan esta técnica de reproducción en el país, la mayoría se ha hecho en forma experimental, esto tal vez por los costos que implica, considerando que el porcentaje de caballos de alta estima en México es reducido y que no hay incentivos para la investigación por lo que ésta técnica tiene poca demanda; sin embargo la transferencia de embriones junto con otras técnicas de reproducción asistida se llevan a cabo en varios países y se sigue investigando para hacerlas más eficientes e indudablemente tienen buenas expectativas de aplicación para mayor eficiencia en la reproducción equina, por lo que es de suma importancia que los médicos veterinarios y persona interesadas en la cría de caballos se mantengan actualizados en información respecto a estos temas. (23)

IV. ASPECTOS REPRODUCTIVOS GENERALES

a) Aspectos reproductivos de la yegua

Parámetros reproductivos de la yegua

- Pubertad: 12 a 17 meses
- Duración del ciclo estral: 21 días
- Duración del celo: 5 a 7 días
- Primer celo después del parto: 7 a 12 días
- Duración de la gestación: 315 a 360 días
- Duración del parto: 1 a 5 horas
- Duración de la lactación: 5 a 6 meses. (16,21,40,57)

El aparato reproductor de la yegua consta de ovarios, oviductos, útero, cérvix, vagina y vulva (Fig.1). Los ovarios tienen forma oval, histológicamente son diferentes al resto de los mamíferos, ya que en la zona periférica se sitúa tejido conjuntivo y los vasos sanguíneos y en la zona central se encuentran los folículos. Los oviductos miden entre 20 y 30 cm de longitud y desembocan en el inicio de los cuernos uterinos. El útero de la yegua tiene forma de Y mide entre 40 y 50 cm, está formado por 2 cuernos uterinos que son paralelos y se unen en la parte craneal del cuerpo del útero que continúa hacia el cérvix uterino situado en la cavidad pelviana. (11,36,43)

El útero está tapizado por el endometrio y rodeado por dos capas de tejido muscular liso llamado miometrio. El grosor de la pared uterina y el tono del miometrio dependen del estado reproductivo de la yegua. (11)

La vagina incluye el vestibulo mide 20 cm de longitud y termina en la vulva, la cual está formada por los labios que en condiciones normales están verticales y cerrados. (11,43)

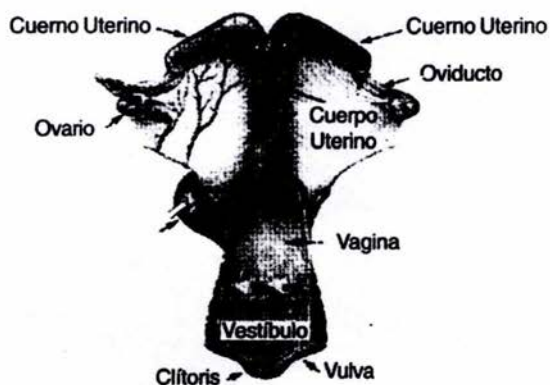


Figura 1. Aparato reproductor de la yegua.

Fisiología

La yegua es ***poliéstrica estacional*** cuya actividad reproductiva es regulada principalmente por el fotoperiodo, las yeguas responden a un fotoperiodo creciente incrementando su actividad reproductiva, la información proporcionada por la luz y la oscuridad es transformada por el sistema neuroendocrino en mensajes químicos a nivel de la glándula pineal que produce la melatonina. El hipotálamo mediante estímulos del Sistema Nervioso Central y la disminución de la melatonina, produce la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) que actúa en el lóbulo anterior de la hipófisis donde estimula la secreción de la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH). (8,11, 36,43, 57)

El ciclo estral de las yeguas tiene una duración aproximada de 21 días contados a partir de la fecha de ovulación hasta presentarse la siguiente, y consiste en 2 fases; la primera fase estral que dura alrededor de 7 días y la segunda llamada fase lútea con una duración aproximada de 14 días siempre y cuando no exista fecundación del óvulo y reconocimiento de la gestación por parte de la yegua. (7,21,57)

La FSH estimula en el ovario el desarrollo folicular y la producción de estrógenos en éste, al aumentar los niveles de estrógenos en sangre la yegua presenta estro. Al madurar el folículo (40 mm aproximadamente) la LH induce la ovulación, una vez producida ésta, se forma un cuerpo hemorrágico y posteriormente un cuerpo lúteo primario que su principal acción es la de producir progesterona. (7,11, 21, 43)

Al producirse la progesterona en el cuerpo lúteo, disminuye la liberación de la GnRH y se prepara al endometrio para una posible implantación del embrión, si se presenta la gestación el cuerpo lúteo será el encargado de mantenerla en primera instancia, ya que después serán las copas endometriales las encargadas de hacerlo, cabe mencionar que en la especie equina se lleva a cabo una segunda fase de desarrollo folicular alrededor de los 40 días de gestación, producida por la hormona gonadotropina coriónica equina (GCe), estos folículos pueden incluso llegar a ovular y forman cuerpos lúteos secundarios, los cuales también producen progesterona para mantener la gestación hasta el quinto mes aproximadamente. Si no hay gestación, 16 días después de la ovulación el endometrio libera $\text{PGF}_2\alpha$ que inducen la lisis del cuerpo lúteo, al disminuir los niveles de progesterona, inicia la liberación de GnRH, comenzando un nuevo ciclo estral. (7,11,40)

b) Aspectos reproductivos del semental

El aparato reproductor del semental está formado por testículos, epidídimos, conductos deferentes, uretra y pene. Como glándulas anexas se encuentran las vesículas seminales, la próstata, y glándulas bulbouretrales (Fig. 2). Los testículos están recubiertos externamente por el escroto que interviene en el control de temperatura. (11,43)

La cápsula denominada túnica albugínea envuelve a cada testículo y lo mantiene la estructura anatómica. Histológicamente están formados por túbulos seminíferos densamente contorneados que albergan en su interior los epitelios sustentaculares (células de Sertoli) y a la línea de células germinales inmaduras (espermatogonias y espermatocitos) en diferentes etapas de desarrollo hasta espermatozoides. El otro componente fundamental es el intersticio testicular en el que se localizan los endocrinocitos intersticiales (células de Leydig) productoras de la hormona testosterona que se dirige tanto a la luz de los túbulos seminíferos para la maduración de los espermatozoides, como a los vasos sanguíneos manteniendo los caracteres secundarios del macho y la libido. (11,43)

Los túbulos seminíferos se fusionan en un conducto único llamado epidídimo que debido a sus múltiples sinuosidades concentra aproximadamente 45 m de conducto en 12 cm de longitud en el que se distinguen tres regiones, cabeza, cuerpo y cola, a su paso por éste adquieren su maduración fisiológica y se almacenan los espermatozoides. (11,16,21)

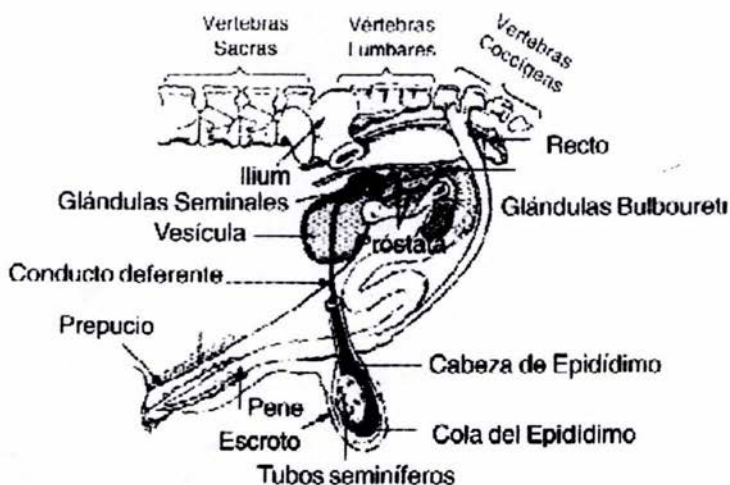


Figura 2. Aparato reproductor del semental

Fisiología

En cuanto a la endocrinología del semental; la producción de GnRH hipotalámica induce la liberación de FSH y LH hipofisarias. La FSH actúa sobre las células de Sertoli promoviendo la espermatogénesis. La LH ejerce su acción sobre las células de Leydig (ICSH) para la producción de testosterona, la cual actúa a nivel testicular en la maduración espermática y a nivel general manteniendo los caracteres secundarios del macho y la libido. La testosterona ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de FSH hipotalámica. (11,16,21)

La espermatogénesis en el semental es un proceso que dura 57 días. La pubertad se define como la edad en que un potrillo puede montar, copular y fertilizar una yegua, esto ocurre alrededor de los 2 años, la madurez sexual generalmente la alcanzan a los 5 años de edad. (21,24)

V. DESCRIPCIÓN DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

a) VENTAJAS DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN EQUINOS

- **La obtención de potrillos de yeguas en entrenamiento.**

En general, las yeguas en entrenamiento que tienen un desempeño sobresaliente, son relegadas de la actividad reproductiva hasta que termina su carrera deportiva, este es uno de los mayores beneficios que ofrece la transferencia de embriones, ya que se tiene la posibilidad de obtener potrillos de yeguas enroladas en un programa de entrenamiento, sin interferir con su desempeño deportivo. (6,42,51,54,57)

- **Multiplicación del número de potrillos por yegua donante por año.**

Se considera que una yegua donadora de fertilidad normal inseminada con un semental de las mismas condiciones, puede producir de 3 a 4 o más potrillos en una temporada reproductiva mediante la transferencia de embriones. Debido a que todavía no hay un método práctico y económico para inducir la superovulación en yeguas, los resultados y la eficacia de esta técnica son inferiores que los obtenidos en la especie bovina. (6,42,51,54,57)

- **Obtener crías de potranças de dos años.**

La transferencia de embriones permite obtener potrillos de yeguas que no han completado su desarrollo corporal suficiente para llevar una gestación a término. (6,42,51,54,57)

- **Obtención de potrillos de yeguas muy viejas ó subfértiles.**

Es común que algunas yeguas conciban pero no sean capaces de llevar una gestación a término y sufran absorción embrionaria o fetal antes de los 90 días. Aunque la transferencia embrionaria fue inicialmente propuesta como método promisorio para la obtención de potrillos de yeguas viejas o subfértiles, en

experimentos de transferencia de embriones se ha documentado que muchos de éstos embriones producidos por yeguas viejas o subfértiles son defectuosos y tienen bajo porcentaje de sobrevivir luego de la transferencia a la yegua receptora, por lo tanto, yeguas viejas y yeguas subfértiles no son las candidatas más óptimas para la transferencia embrionaria; sin embargo sigue siendo una alternativa para tener potros de yeguas en esas condiciones. (5, 6,29,42,51)

- **La obtención de potrillos de yeguas con problemas de salud de índole no reproductiva.**

Las yeguas con inhabilidades físicas por ejemplo; rasgado de músculos abdominales, viejas fracturas pélvicas y rotura del tendón prepúbico; pueden todavía producir descendientes. (2,6)

- **Reducción de tiempo para identificación de sementales y yeguas de alta heredabilidad.**

Al aumentar la producción por yegua permite que haya mayor influencia genética de la madre. La recuperación embrionaria también ha sido utilizada, para evaluar la fertilidad de sementales, diluciones seminales variadas y semen congelado. (6,51)

- **La utilización de la técnica como herramienta de investigación.**

La transferencia de embriones permite el desarrollo de otras técnicas de reproducción como: la ingeniería genética, producción de gemelos idénticos, fertilización in vitro, transferencia nuclear, entre otras. Actualmente ya hay reportes de nacimientos de equinos que fueron clonados. (1,17,50,54,56,57)

b) DESVENTAJAS DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN EQUINOS

Para obtener resultados satisfactorios, es fundamental que cada una de las etapas sea cuidadosamente planeada y ejecutada. El éxito de ésta técnica requiere mucha atención a varios detalles más que a uno solo en particular, es necesario disponer de las instalaciones, el equipo adecuado y personal capacitado para realizar en forma efectiva cada una de estas etapas. La recolección del embrión y su posterior transferencia implica la invasión del ambiente uterino de las yeguas donantes y receptoras; si no se utilizan las medidas técnicas que minimicen el grado de contaminación, este procedimiento puede transformarse en un riesgo para la salud de las yeguas. Así mismo el embrión es muy sensible y puede ser perjudicado si es expuesto a condiciones físicas, químicas o biológicas desfavorables lo que se traduce en porcentajes más bajos de gestación. (7,42)

- **El procedimiento es costoso.**

Esta es la principal limitante para que se realice en forma comercial en el país, ya que en México pocos criadores tendrían acceso a esta técnica de reproducción asistida. (2)

- **No hay un método eficaz para estimular la superovulación.**

Actualmente la mayoría de recolecciones embrionarias se realizan en yeguas que ovularon sin que se les aplique algún tratamiento para inducir múltiples ovulaciones como se realiza en los bovinos, esto trae como resultado una colección de embriones entre el 50% y 70% de las tentativas. Uno de los costos principales de la transferencia del embrión es el mantenimiento de las yeguas receptoras que se programan pero no se utilizan para la transferencia embrionaria. Un método para disminuir substancialmente el costo de esta técnica, es aumentar el número de embriones recuperados de la yegua donante con la inducción de ovulaciones múltiples. Las tentativas en inducir ovulaciones múltiples en yeguas han incluido la

administración de gonadotropina coriónica equina (GCe), GnRH, FSH porcina, y de extracto pituitario equino (EPE). Sin embargo, *aún no hay producto hormonal comercialmente disponible para inducir ovulaciones múltiples en yeguas.* (2,35,47,49,57)

La gonadotropina coriónica equina se utiliza para inducir la superovulación en rumiantes. Desafortunadamente la GCe, en dosis muy grandes, no tiene ningún efecto sobre el desarrollo folicular u ovulación en la yegua. La administración de GnRH induce el desarrollo de folículos en yeguas en anestro estacional, pero la administración de GnRH en yeguas con ciclos normales es ineficaz para inducir múltiples ovulaciones. Debido a que no hay producto equino comercialmente disponible de FSH, en los estudios de la administración de FSH a yeguas se ha utilizado FSH porcina; la respuesta a FSH porcina para inducir múltiples ovulaciones en la yegua ha sido muy reducida. (2,19,47)

El producto más utilizado para la inducción de ovulaciones múltiples en la yegua es el Extracto Pituitario Equino (EPE) crudo, que se ha producido en varios laboratorios en forma experimental. La tarifa de ovulación varía enormemente, probablemente porque la cantidades de FSH y de LH en la preparación cruda no se han estandarizado. Al igual que con las yeguas que ovulan espontáneamente, la recuperación de embriones de más de una ovulación es de aproximadamente 50%. Así, una yegua que tuvo cuatro ovulaciones en respuesta a EPE proporciona generalmente dos embriones. (2,29,47,57)

- **Las restricciones o prohibiciones que se obligan cumplir por algunas asociaciones de criadores.**

Algunos Asociaciones de criadores han relegado a la transferencia embrionaria a yeguas viejas e infértiles, restringiendo los registros a un potrillo por año. (2,26,36)

RESTRICCIONES PARA EL USO DE IA Y TE DE LAS ASOCIACIONES QUE TIENEN REPRESENTACIÓN EN MÉXICO.

ASOCIACION	IA	SEMEN FRIO	SEMEN CONGELADO	TRANSFERENCIA DE EMBRIONES	COMENTARIOS
The Jockey Club (Thoroughbreds)	No	No	No	No	Solo monta natural
Arabian Horse registry of America, Inc.	Si	Si	Si	Si Uno/yegua/año	
American Paint horse Association	Si	Si	No	Si	25 envíos como máximo, usarlo antes de las 24 horas Tipificación obligatoria del semental
*American Quarter Horse Association	Si	Si	Si	Si	Debe estar inscrito en Programa de TE tipificación de padres e hijos
Appalossa Horse Club	Si	No	No	Si Uno/yegua/año	Tipificación obligatoria, en IA los animales deben estar en el mismo rancho
American Miniature Horse Association	No	No	No	No	Solo Monta Natural
American Miniature Horse Registry and American Shetland Pony Club	No	No	No	No	Solo Monta Natural
Pinto Horse Association of America, Inc.	Si	Si	Si	Si	No más de 24 horas entre la colección y la inseminación
Fallabella Miniature Horse Association of America.	Se ha intentado IA pero no ha funcionado, solo se usa monta natural				

▲ Adaptado de (26)

* A partir del 2002, la asociación de registro más grande de los Estados Unidos, la American Quarter Horse Association, aprobó el registro ilimitado de potros de una yegua durante un año, usando transferencia de embriones. (47)

- **La ejecución de la transferencia embrionaria requiere de equipo y entrenamiento especializado.**

Debido a lo anterior son pocas las instalaciones y los médicos dedicados a equinos que están preparados para ofrecer este servicio. (2,42)

c) SELECCIÓN DE LAS YEGUAS DONADORAS Y LAS YEGUAS RECEPTORAS.

En un programa de transferencia de embriones es importante que los animales sean perfectamente identificados, cada animal debe de tener su ficha que incluye fechas de vacunación, antiparasitarios o cualquier otra medicación recibida, también puede incluir registro sobre la historia reproductiva, en caso de que haya tenido pariciones anteriores; historia de problemas en el parto, duración de los ciclos estrales. Si la yegua ha sido sincronizada deben registrarse las hormonas utilizadas, dosis y vías de administración, estructuras ováricas detectadas por palpación, comportamiento sexual durante el celo etc. (42)

Yeguas donadoras

Probablemente la yegua donadora sea el elemento más difícil de seleccionar para el médico veterinario, ya que la mayoría de clientes ya tiene seleccionada su yegua donadora para la transferencia de embriones. (54)

Las yeguas donadoras deberán estar ciclando normalmente, y encontrarse en buena condición física antes de que se intente la recuperación embrionaria y deberán ser sometidas a un examen reproductivo integral, ya que la historia reproductiva de la yegua proveerá de información importante respecto a la recuperación embrionaria esperada. Los exámenes incluyen la palpación rectal y la ultrasonografía. Poniendo especial atención en el tamaño y tono uterinos, el cérvix es examinado por vía vaginal

mediante vaginoscopia y se debe revisar la forma, tamaño y tono de éste, además verificar su amplitud, si hay adherencias, desgarres etc. También se pueden obtener muestras del útero para citología y cultivo. Las yeguas que muestren signos de endometritis deben ser tratadas apropiadamente antes de intentar la recuperación embrionaria. (29,51,54,57)

Características de la yegua donadora

- De alta calidad genética.
- Con un desempeño deportivo sobresaliente.
- Yeguas de preferencia fértiles.
- Reproductivamente sanas y de ser posibles jóvenes.
- Con una buena condición corporal. (7,51,54)

Selección de yeguas receptoras

Sin duda este es el elemento más importante en un programa de transferencia de embriones, puesto que es uno de los elementos que pueden determinar el éxito o el fracaso de la transferencia embrionaria en la que todos los demás elementos sean adecuados y correctos, es por eso que deben seleccionarse muy cuidadosamente las yeguas receptoras; con una buena historia clínica y un examen integral de su aparato reproductivo. Sólo las hembras que no posean evidencias de endometritis y tengan pueden ser usadas como receptoras. Las yeguas receptoras deben tener su calendario de vacunación de acuerdo a la zona, (tétanos, rinoneumonitis deben ser incluidas). Además deben ser sometidas a cuarentena por un periodo mínimo de 30 días. Por lo general se trata de utilizar aquellas reproductoras que han experimentado 2 o más ciclos normales. (29,51,54)

Características que se buscan en las yeguas receptoras.

- Que sean jóvenes y fértiles, de preferencia entre 4 y 10 años de edad que no sean multíparas.
- Sanas reproductivamente y en general.
- Con una buena conformación corporal.
- Con buena alzada y caja apropiada.
- De temperamento tranquilo y con buen comportamiento.

(7, 51,53,56)

Para conocer todos los eventos que van ocurriendo en los ovarios, y en forma indirecta en los niveles hormonales de las yeguas, se utilizan las técnicas de palpación rectal, ultrasonografía y vaginoscopia, además del comportamiento de las hembras ante el caballo recelador. Deben de revisarse tanto las yeguas donadoras como las yeguas receptoras, para así poder llevar registros reproductivos donde se plasmen todos los eventos encontrados como; desarrollo folicular, fecha de ovulación, servicios a la yegua donadora etc. (7,42, 51)

d) SINCRONIZACIÓN ENTRE YEGUAS DONADORAS Y YEGUAS RECEPTORAS.

La sincronización en el equino no tiene que ser tan estrecha, pues el rango es de +1 a -2 días y se han demostrado buenos resultados con este intervalo. (29,50,57)

Idealmente se requieren de 2 a 3 yeguas receptoras por yegua donadora, para que alguna de estas quede sincronizada lo mejor posible y tener opciones de selección en el momento de la transferencia. (6,29,54,57)

Es conveniente y se prefiere que la yegua receptora ovule el mismo día que la yegua donadora o hasta 2 días después, siendo esta última opción la más adecuada para realizar la transferencia sin embargo aunque no es lo ideal se pueden utilizar yeguas que ovularon hasta 1 día antes que la donadora. La forma de detectar la ovulación con el uso del ultrasonido, es la desaparición de un folículo preovulatorio de un tamaño previamente detectado lo cual indica de ovulación reciente. (6,18,29,54)

En términos técnicos a las receptoras se les clasifica como que están sincronizadas en relación a la donadora de la siguiente manera:

Clasificación	Ovulación de las receptoras en relación a la donadora
+1	ovuló 1 día antes que la donadora
0	ovuló el mismo día que la donadora
-1	ovuló 1 día después que la donadora
-2	ovuló 2 días después que la donadora

▲ Adaptada de (54)

Existen varios métodos para lograr la sincronización de las yeguas donadoras con las yeguas receptoras. Los medicamentos hormonales más usados son los progestágenos, prostaglandinas e inductores de la ovulación (GCh y deslorelin). (7,21,44,57)

Prostaglandinas

Las prostaglandinas actúan local y sistémicamente en la yegua y se implican en muchos mecanismos fisiológicos, incluyendo la reproducción. La longitud del ciclo estral en las yeguas, es en promedio de 21 días, aproximadamente 14 días después de la ovulación, las prostaglandinas F₂ alfa (PGF₂ α) producidas por el endometrio, producen lisis del cuerpo lúteo en yeguas no gestantes. (44,57).

En el transcurso del diestro las células del cuerpo lúteo derivadas de la teca interna aumentan de tamaño y forman mayor número de receptores para las prostaglandinas, por lo que se vuelven más sensibles a su acción, éste proceso toma aproximadamente 5 días y puede ser la razón por la que la respuesta a las prostaglandinas exógenas en los primeros días no es adecuada y en la mayoría de las ocasiones no se logra lisis del cuerpo lúteo hasta el quinto día después de la ovulación. (53)

Las prostaglandinas exógenas más utilizadas son: el Dinoprost, 5-10 mg/animal IM y el cloprostenol 100- 250 mcg/animal IM.(44)

Aunque las PGF₂α son altamente eficaces para terminar la producción de progesterona mediante lisis del cuerpo lúteo, su eficacia para la sincronización de estros y ovulaciones es equívoca, especialmente cuando se usa sola. (8,44,53)

Antes de la inyección de la yegua con prostaglandinas es recomendable siempre realizar un examen reproductivo para asegurarse que la yegua no se encuentra gestante y revisar el desarrollo folicular en el momento de la inyección, pues de eso dependerá el intervalo que habrá desde la inyección a la ovulación. Algunos efectos

secundarios que se pueden presentar con el uso de prostaglandinas son: sudoración, hipergastromotilidad, disnea e inclusive cólico. (53,57)

Las yeguas en diestro son sensibles a una sola inyección de prostaglandinas y presentan estro de 3 a 5 días después de la aplicación. Si un grupo de yeguas se encuentra en diestro al mismo tiempo, es posible sincronizar sus ciclos. En un grupo de yeguas con ciclos aleatorios, el estro se sincroniza mediante un régimen con 2 dosis de $\text{PGF}_2\alpha$ y 2 dosis de GCh mediante el siguiente protocolo; una inyección de Prostaglandinas (día 1), una dosis de GCh (día 7 u 8), una segunda dosis de $\text{PGF}_2\alpha$ (día 15) y otra de GCh (día 21 o 22) el estro se presenta en un periodo de 2 a 4 días con fertilidad normal. (21)

Progestágenos

El progestágeno más utilizado en la reproducción equina es el Altrenogest en dosis de 0.044 mg/kg/día. Un régimen para sincronizar estros y la ovulación con progestágenos consiste en aplicar progesterona o altrenogest por 8 a 12 días a un grupo de yeguas ciclando, sin importar en que etapa del ciclo estral se encuentren seguido de una dosis de $\text{PGF}_2\alpha$ al final del tratamiento con progestágenos. El estro se puede esperar dentro de 2 a 5 días, sin embargo, el intervalo de terminación del estro y la ovulación puede ser dictado por el grado del desarrollo de folicular. Aunque el grado de sincronización de estro es relativamente alto con este régimen, la sincronización de la ovulación es menor, en este caso la GCh se puede usar para reducir la variación asociada con el intervalo de ovulación al final del tratamiento con progestágenos. Así, los progestágenos exógenos se puede usar solos para alterar la fase prostestacional en animales individuales, pero para sincronizar estros y la ovulación entre un grupo de yeguas los progestágenos se usan generalmente con $\text{PGF}_2\alpha$ y con GCh o deslorelin para aumentar el grado de sincronización, especialmente para sincronizar la ovulación. (44)

También se han utilizado estrógenos junto con progestágenos, partiendo del principio que el uso de prostaglandinas al final del tratamiento con progestágenos asegura la regresión el cuerpo lúteo, pero no controla el desarrollo folicular. Respecto a esto los estrógenos han sido usados como un potente inhibidor para el control del desarrollo folicular; además aumenta la sincronización de estros y ovulación en yeguas. En general los estrógenos ejercen un efecto negativo en la liberación de FSH y un efecto positivo para la LH. (44)

Mientras que dosis pequeñas de estrógenos (0.5-1.0 mg) pueden ser usadas para inducir conducta semejante al estro, dosis más grandes (5-10 mg) son usadas en combinación con progestágenos para inhibir el desarrollo folicular para el propósito de sincronización de estros y ovulación en yeguas. El estradiol, se usa para el tratamiento con progestágenos por que la sincronización de estros y la ovulación son más predecibles. (44)

Un régimen común para la sincronización de estros y la ovulación en yeguas se desarrolló en 1981, este implica la inyección intramuscular de una combinación de progesterona (150 mg) y estradiol (10 mg) por 10 días que comienzan en etapas del ciclo estral al azar. El tratamiento con $\text{PGF}_2\alpha$ se da en el último día. Con este régimen se reporta un alto grado (81%) de sincronización de la ovulación ocurre entre 10 y 12 días después del tratamiento con $\text{PGF}_2\alpha$. Este mismo régimen puede ser usado con GCh cuando el diámetro del folículo alcanzó 35 mm ó más, esto asegura que el momento de la ovulación sea más predecible para la inseminación, en este caso de la yegua donadora. (32,44,52)

En la transferencia embrionaria equina es posible utilizar yeguas ovariectomizadas como receptoras, con tratamiento esteroideo. Previo a la transferencia embrionaria es necesario tratar a las yeguas ovariectomizadas con progesterona (300 mg diariamente) o (altrenogest en dosis de 0.044/kg/día) desde unos pocos días antes de la transferencia embrionaria hasta los días 100 a 140 de preñez, cuando está será

mantenida por la progesterona placentaria. Las tasas de preñez obtenidas con transferencia embrionaria a yeguas ovariectomizadas son similares a las halladas en yeguas intactas, el parto y la lactación de yeguas ovariectomizadas que han recibido transferencia de embriones se ha informado como normales. (29,44, 51)

El uso de yeguas receptoras ovariectomizadas, podría eliminar la necesidad de sincronizar la ovulación entre la yegua donante y la receptora, reduciéndose de esta manera el número de receptoras por donante. McKinnon 1988 reportó rangos de preñez similar por transferencia de embriones en yeguas intactas y yeguas ovariectomizadas administrándoles 300 mg de progesterona. La desventaja de esto es la aplicación continua de progestágenos. (44,51)

e) INSEMINACIÓN DE LA YEGUA DONADORA.

En la especie equina la decisión de cuando inseminar o dar la monta a la yegua parece un tanto complicada, ya que en esta especie la manifestación del celo varía de 3 inclusive hasta 10 días, sucediendo la ovulación de 24 a 48 horas previas al final del estro, además el periodo fértil de la yegua es de 6 a 12 horas (46)

Se puede servir a la yegua donadora tanto con monta natural como con inseminación artificial, en la mayoría de los casos se hace con la segunda opción. Las técnicas actuales permiten que el semen del equino se pueda manejar en tres diferentes modalidades: fresco, frío (refrigerado) y congelado. (22,24,51)

Semen fresco

Se considera semen fresco aquel que se deposita en el tracto reproductivo de la yegua dentro de los primeros 30 minutos después de su colección (de preferencia no más de 15), ya sea mezclado con algún diluyente o sin mezcla alguna. El uso de I. A. con semen fresco implica que tanto la yegua como el semental se encuentren en el mismo lugar y que la disponibilidad de semen no represente ningún problema. Se recomienda inseminar a la yegua a partir del tercer día o a partir de la presencia de un folículo de cuando menos 35 mm hasta que ocurra la ovulación y sea detectada por palpación o ultrasonografía. (37,53)

Semen refrigerado

El semen frío o refrigerado es enfriado paulatinamente hasta llegar a 5 °C, se transporta en termos (Equitainer) y se puede usar en las siguientes 48 horas, es preferible utilizarlo en las primeras 24 horas después de su recolección y enfriamiento ya que al pasar las horas disminuyen los porcentajes de gestación. Al realizar la inseminación con semen frío, no es necesario entibiarlo de eso se encarga el útero de la yegua, lo importante es realizar el proceso lo más pronto posible. (25,37)

La dosis inseminante que comúnmente ha sido utilizada es una dosis de 250 a 500 millones de espermatozoides progresivamente móviles (EPM) con buenos porcentajes de fertilidad de un semental fértil, en algunas ocasiones se han disminuido la cantidad de EPM sin reducir la fertilidad depositando el semen directamente en el oviducto. Yeguas que han sido inseminadas con dosis menor de 500×10^6 de (EPM) han tenido un 20 % menor porcentaje de gestación, que las yeguas inseminadas con 500×10^6 de (EPM). Con semen frío y congelado se recomienda 500-1000 millones (EPM) por dosis inseminante. (8,37,45,51)

Semen congelado

El semen de equino es congelado a -196°C en nitrógeno líquido y es almacenado en pajillas o popotes con capacidades desde 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 4.0 y hasta 5ml, siendo las pajillas de 0.5 y popotes de 5ml los más usados. Las concentraciones que se almacenan van desde 50 hasta 1600×10^6 de (EPM) por ml. siendo de 100 a 400×10^6 por ml las más comunes. Para descongelar el semen deben seguirse las recomendaciones del centro procesador, en la mayoría de los métodos se recomienda una descongelación rápida en agua por ejemplo: 37°C por 30 segundos para la pajilla francesa y 50°C por 45 segundos para popote. (26,37,45)

Actualmente existe variedad de opiniones en cuanto a cual es el mejor momento de realizar la inseminación. Existen recomendaciones que van desde inseminar con una dosis por ciclo antes de la ovulación preferentemente 12 horas, hasta inseminar cada 24 horas a partir del tercer día de celo. Independiente del tipo de semen a utilizar el objetivo siempre será alcanzar los mejores porcentajes de concepción, lo cual será posible si se trabaja con sementales, semen y yeguas de buena calidad reproductiva. (8,37,53).

Después del servicio o la inseminación los espermatozoides viajan hacia el extremo ovárico del oviducto. "El espermatozoides llega en un lapso de 2 horas y la mayoría de

espermatozoides se encuentran en el oviducto 4 horas después de la inseminación” (Bader, 1982). Sin embargo la utilización de semen congelado resulta en un retraso en la llegada del esperma a los oviductos. El espermatozoide equino sobrevive en promedio 2 días en el tracto genital de la yegua, con variación de horas y hasta 7 días. A diferencia del espermatozoide el óvulo permanece viable y puede ser fecundado solamente por 6 a 12 horas. Debido a esto se requiere que haya espermatozoides viables en horas cercanas a la ovulación. (40,46)

Un poco antes de la ovulación un cúmulo de células foliculares que están rodeando al ovocito se agranda y forma una masa gelatinosa, la cual se cree es necesaria para el transporte intraoviductal del ovocito y además provee los factores quimiotácticos para el espermatozoide. Solo uno de los millones de espermatozoides alcanza el óvulo, lo penetra a través de la zona pelúcida y lo fecunda. Una vez que el espermatozoide penetró en la zona pelúcida comienza una reacción llamada fenómeno de zona, que impide la penetración de otros espermatozoides. (40)

f) RECOLECCIÓN Y EVALUACIÓN DE EMBRIONES EQUINOS

1. Recolección Embrionaria

Los procedimientos para la recolección embrionaria, prácticamente no han cambiado en las últimas dos décadas. El método más común para la recolección de embriones equinos es el procedimiento transcervical o no quirúrgico. Una vez que se ha seleccionado la yegua receptora más idónea en relación al día de ovulación de la donadora se procede a la recolección del embrión. (6)

Para la recuperación de embriones equinos se utiliza una sonda de Foyle de calibre francés, tamaño 30, de doble vía alargada, los frascos y los cilindros deben ser esterilizados a vapor durante 10 segundos, los catéteres, filtros y las tubuladuras son empaquetados individualmente y esterilizados con óxido de etileno durante 24 horas, debiendo retirarse del esterilizador por lo menos durante 48 horas previas a su uso. (6,51)

La especie equina parece ser la única especie de los animales domésticos en la que sólo los óvulos fecundados pasan a través del oviducto hacia el útero, llegando a éste entre los días 5-½ a 6 post-ovulación, estando en estadios de desarrollo de mórula compacta (Fig. 3) a blastocisto temprano (Fig. 4), después de entrar al lumen uterino el tamaño del embrión crece rápidamente hasta blastocisto expandido (Fig. 5). Aunque los embriones pueden ser recolectados entre los días 6 y 9 después de la ovulación (Tabla 1), los días óptimos para la recuperación son el séptimo o el octavo. La principal indicación para recuperar embriones en el día 6 es para realizar el congelamiento de dichos embriones. Los embriones no son recuperados en el día 9 porque el porcentaje de transferencia exitosa es generalmente más bajo que para los embriones recuperados en los días 7 u 8. (1,29,40,50)

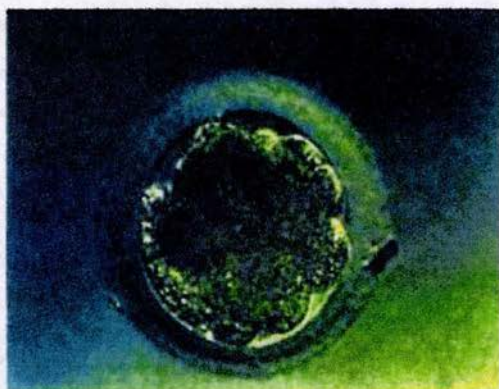


Figura 3. Mórula equina. El embrión consiste en una masa compacta de blastómeros, con una zona pelúcida prominente.

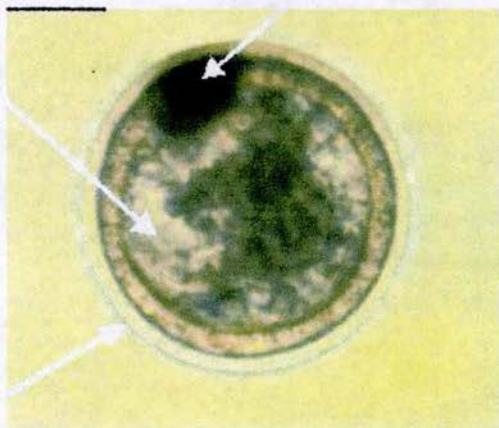


Figura 4. Blastocisto temprano; comienza la formación del fluido que llena al blastocele y la zona pelúcida está adelgazando.

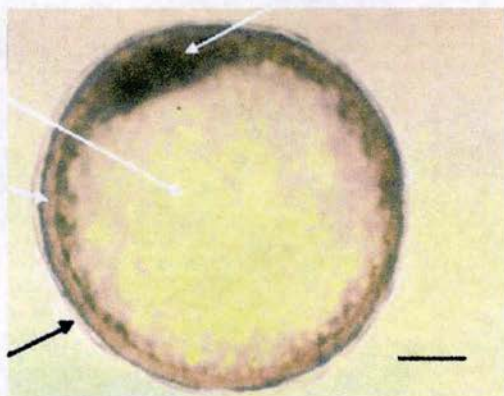


Figura 5. Blastocisto expandido, la cavidad del blastocelo está totalmente formada y el cúmulo celular interno que será el futuro feto.



Figura 6. Catéter para lavado.

Después de colocar a la yegua en el brete con la cola vendada para evitar contaminación, la zona perianal es lavada, bien enjuagada con agua limpia y secada, el clítoris es limpiado con un algodón húmedo. El operador se coloca un guante de plástico estéril en el brazo y gel lubricante estéril en la parte dorsal, luego introduce el catéter o la sonda estéril que cuenta con un globo inflable en la vagina (Fig. 6). Después de meter el catéter en la vagina se introduce suavemente a través del cérvix aproximadamente 5 cm en el cuerpo uterino, el balón es inflado con 60-80 cc de aire o solución salina estéril y luego se tracciona hacia atrás contra el orificio cervical interno para prevenir la pérdida de líquido (Fig. 7). Una vez colocado el catéter, el útero es lavado tres a cuatro veces con solución salina amortiguada con fosfatos puro o modificado (DPBS) previamente entibiado (30–35 ° C) conteniendo 1% de suero fetal bovino, penicilina y estreptomycin. El útero es llenado con 1 a 2 litros de solución DPBS en cada lavado (4 a 8 litros son usados durante todo el proceso de recolección). Después de llenado el útero se le permite al líquido salir y pasar a través de un filtro para embriones de 0.75 micras. Es importante que el filtro de embriones no rebase o quede sin líquido; los filtros son ahora diseñados para prevenir ambos problemas. El líquido que pasa por el filtro es recolectado en un recipiente graduado para evaluar cuanto se recuperó. Después del primer lavado el útero es masajeadó a través del recto durante los subsiguientes lavados, y esto puede ayudar a que el embrión quede suspendido en el medio y además aumentar la recuperación total del líquido. La mayoría (> 90%) del líquido de lavado debería ser recuperado y estar libre de restos celulares o de sangre. La recuperación de líquido de lavado opaco indica que la yegua tiene un proceso de endometritis activa en el momento del lavado, y necesitará una evaluación diagnóstica futura. La presencia de sangre es asociada con un masajeo vigoroso del útero y/o la manipulación inadecuada del catéter. (6)

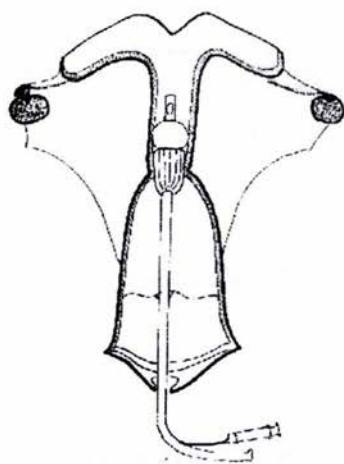


Figura 7. Colocación correcta del catéter en el útero de la yegua

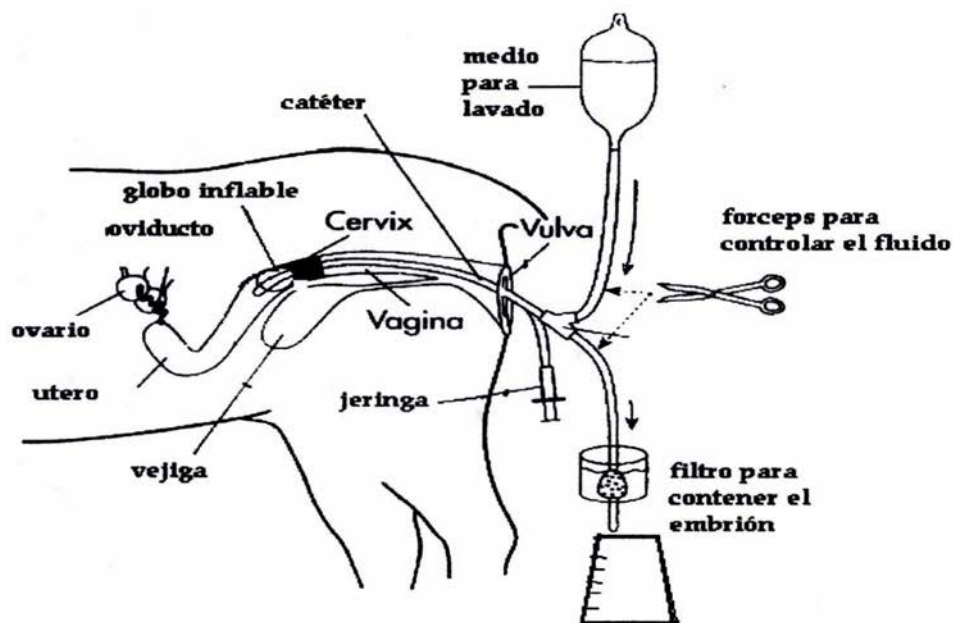


Figura 8. Esquema del procedimiento de lavado para recolección embrionaria.

Una vez finalizado el lavado el contenido del filtro es vaciado en una caja de Petri con cuadrícula para la búsqueda y enjuagado con DPBS (Fig. 9). El líquido recuperado es revisado utilizando un microscopio estereoscópico a un aumento de 15x. Los embriones de 8 días usualmente se ven a simple vista. Cuando un embrión es identificado, es lavado como mínimo por 3 pasajes sucesivos en gotas de un mililitro de medio DPBS con 10% de suero fetal bovino (esterilizado por pasaje por filtro de 0.22 μ m); después del lavado el embrión se coloca en el mismo medio en una placa de Petri de 35 x 10 mm. El embrión es evaluado a mayor aumento (40 - 80x) y calificado usando la escala de 1 (excelente) a 4 (pobre) y 5 ovocito no fertilizado o embrión degenerado. Los embriones pueden ser tomados utilizando pajuelas de 0,25 o 0,5 cc, pipetas capilares de vidrio de 25 μ l conectadas a un bulbo de goma, o algún otro instrumento adosado a una jeringa. Cada vez que se tome un embrión con un tipo de estos capilares o pajuelas, la columna de líquido que contiene el embrión debe ir rodeada de una burbuja de aire en cada extremo y luego una columna de medio líquido sólo. Esto previene accidentes como el de absorber la columna de medio al tocar con el extremo de la pajuela algún material absorbente. El proceso de levantar y depositar un embrión en las pajillas o capilares para su transferencia o transporte debe ser realizado bajo la lupa estereoscópica. (6)

Una vez que los embriones son colocados en el medio de mantenimiento, estos deben ser rápidamente envasados para el transporte o transferidos a una hembra receptora, dado que la viabilidad del embrión disminuye después del almacenamiento por más de 3 horas en DPBS. Mientras los embriones están esperando a ser envasados o transferidos, aparentemente toleran temperaturas que varían entre la temperatura ambiente (25° C) y la temperatura corporal (37° C). Sin embargo es importante prevenir los cambios bruscos de temperatura. (6)



Figura 9. Transfiriendo el medio de lavado contenido en el filtro para embriones a una caja de petri para su búsqueda.



Figura 10. Medio para lavado.

Lista de algunos materiales para colección, evaluación y transferencia de embriones

- Medio para lavado Dubelco
- Sonda de lavado (Foley)
- Adaptador para sonda
- Catéteres de transferencia o pipetas
- Mandril o fijador controlar el paso del líquido
- Jeringas
- Mosquito para el circuito de globo inflable
- Baño María con termostato

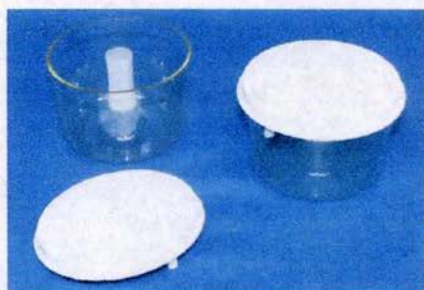


Figura 11. Filtro para embriones.

- Guantes de exploración rectal
- Detergente suave
- Toallas
- Tijeras
- Cinta adhesiva
- Rotulador
- Gel lubricante estéril
- Ropa adecuada
- Microscopio estereoscópico
- Placa calefactora
- Pipetas de cristal
- Capilares
- Medio de cultivo
- Placas de petri
- Filtros
- Jeringas para filtros
- Probetas
- Pajillas
- Jeringas con adaptador
- Camisa sanitaria
- Utensilios misceláneos (20)

2. Evaluación de la calidad embrionaria

Morfología Embrionaria

En un programa de transferencia embrionaria equina es importante que se efectúe el examen morfológico del embrión por dos razones fundamentales, 1) las tasas de preñez disminuyen por la transferencia de embriones anormales y puede ahorrarse tiempo y receptoras si se efectúa un diagnóstico diferencial de un ovocito infertilizado de embriones anormales. La evaluación morfológica sigue siendo el método más práctico para evaluar la calidad de embriones equinos, los parámetros utilizados incluyen; forma, color número y densidad celular, tamaño del espacio perivitelino, número de célula extruidas y degeneradas y el estadio de desarrollo comparado con el edad del embrión. (51)

La yegua es la única especie que los ovocitos no fertilizados son retenidos en el oviducto, el mecanismo de transporte del óvulo fertilizado a través del oviducto hacia el útero todavía no es claro aunque parece ser que depende de la segmentación y de cambios en la zona pelúcida.(40.51)

Los ovocitos fertilizados llegan al útero en el día 5 o 6 post-ovulación, el estadio más temprano de desarrollo embrionario que puede entrar al útero es la mórula: después del estado de mórula la división celular continúa con mucha rapidez y a medida que los blástomos entran en contacto con la zona pelúcida eliminan el espacio perivitelino con alta eficacia. Una vez que esto ocurre el embrión equino se expande rápidamente. La transición de mórula a blástula, sumada a un aumento continuo en el número de blástomos, se da en dos cambios fundamentales: 1) Formación de una cavidad llena de líquido en el centro del embrión llamada blastocele y 2) predisposición celular en dos poblaciones; (una capa delgada que rodea el blastocele y una masa compacta y más pequeña que se proyecta hacia el interior del blastocele).

A continuación de la formación del blastocisto, se hace evidente que el embrión está constituido por 2 tipos de células; las células externas trofoblásticas (masa celular externa) que tienen la función de absorber nutrientes e inducir cambios especiales en la mucosa uterina para la implantación y en la superficie interna del trofoblasto hay un pequeño grupo celular denominado masa celular interna (embrioblasto) que posteriormente será el embrión. (51)

Una vez identificados los embriones se evalúan y se les asigna un puntaje de calidad, que va del 1 al 5, siendo 1 excelente y 5 muerto o degenerado.

Los parámetros morfológicos evaluados son la densidad del blástomero, blastómeros extruídos o dañados, color del embrión, forma del embrión, daños de la zona pelúcida, tamaño del espacio perivitelino y estadio de desarrollo embrionario comparado con la edad embrionaria.(6,51,54)

Sistema de clasificación usado para evaluar la calidad de embriones

- **Grado 1:** Excelente- es un embrión ideal, esférico, con células de tamaño, color y textura uniformes.
- **Grado 2:** Bueno- hay imperfecciones mínimas como bastones extruídos, forma irregular o separación trofoblástica.
- **Grado 3:** Regular- problemas definidos, pero no severos, presencia de blastómeros extruídos, células degeneradas o blastocele colapsado.
- **Grado 4:** Malo- problemas severos, blastocele colapsado numerosos blastómeros extruídos, células degeneradas pero con masa embrionaria aparentemente viable.
- **Grado 5:** Infertilizado o muerto-ovocitos infertilizados o embriones totalmente degenerados. (6,51)

La utilización de embriones refrigerados que puedan ser transportados, necesitará una evaluación más exacta de la morfología embrionaria, previamente a su transferencia. Las anomalías embrionarias asociadas con la refrigeración de embriones de 10 a 24 horas son: 1) colapso del blastocisto total o parcial con separación de la zona pelúcida o cápsula. 2) formación de una depresión en áreas aisladas de las células trofoblásticas, 3) blastómeros extruídos, 4) células oscurecidas y 5) aumento de la superficie de aspecto granular con aparente separación celular. Los ovocitos infertilizados no son liberados al útero de la yegua sin embargo a veces pueden presentar un dilema diagnóstico, estos ovocitos infertilizados se recuperan más comúnmente junto al ovocito fértil, en ausencia de ovulaciones múltiples, esto implica que los ovocitos infertilizados liberados se originaron de una ovulación previa. La mayoría de ovocitos infertilizados se vuelven ovalados, son comúnmente aplanados en una dirección y miden de 80 a 180 micras. (40,51)

3. Factores que afectan la recuperación embrionaria

La calidad del embrión equino tiene un efecto principal en tarifas del embarazo. Los embriones con mala calidad (menor a 3) resultan en tarifas muy pobres de gestación. (50)

➤ Edad del embrión

En general los embriones equinos se pueden recuperar del día 6 al día 9 pos-ovulación, lo más recomendable es hacerlo entre los días 7 a 8 para su transferencia inmediata. Los embriones que son más pequeños que el normal para su edad o los que tienen anomalías morfológicas, también dan lugar a tarifas más bajas de gestación. Las tasas de preñez de embriones grado 1 se encuentran entre 70-75% mediante transferencia no quirúrgica. (6,39,51)

Tabla 1 Efecto del día del lavado en la tasa de recuperación embrionaria.

Referencia	Día pos-ovulación			
	Día 6 (%)	Día 7 (%)	Día 8 (%)	Día 9 (%)
Luliano (33)	21/32 (66)	68/90 (76)	50/61 (82)	----
Castleberry (13)	3/13 (23)	15/22 (68)	4/8 (50)	----
Squires (48)	86/137 (63)	73/96 (76)	218/293 (74)	43/53 (81)
Meira (38)	70/127 (55)	23/41 (56)	----	----
Wade y Gallagher (55)	----	26/45 (58)	31/47 (66)	----
Bowen (9)	12/23 (52)	----	25/31 (81)	----
Fleury y Alvarenga (15)	----	106/215 (49)	388/669 (58)	18/33 (55)
Total	192/332 (58)	311/509 (61)	716/1109 (65)	61/86 (71)

▲ Adaptada de (1)

Los embriones no son recuperados en el día 9 porque el porcentaje de transferencia exitosa es generalmente más bajo que para los embriones recuperados en los días 7 u 8. (6,50)

Los investigadores han determinado que los embriones recogidos para ser congelados deberán ser recuperados cuando son pequeños (<225 micras) y por lo tanto deberán ser recolectados al día 6 post-ovulación. (12,30, 51)

Las tasas más bajas de recuperación en el día 6 pueden ser debido a dos razones principales: fallas en la obtención del embrión en el líquido de drenaje uterino debido a su mayor peso específico y falla de algunos embriones para entrar al útero en el día 6; también se mencionan la falla del técnico para identificación del embrión en el medio y posible pérdida durante el proceso de recuperación. (51)

➤ **Personal Técnico**

Cuando se coloca el catéter en el cuerpo del útero previo a ser inflado, debe hacerse con cuidado ya que si se realiza inadecuadamente esta maniobra se produce una dilatación de cérvix y una pérdida de líquido a la vagina con posible pérdida del embrión, por lo que es importante la habilidad del técnico.

➤ **Eficacia del semental**

La calidad del semen usado para inseminar yeguas también afecta la recuperación del embrión. Generalmente las yeguas inseminadas con semen fresco son más probables que produzcan un embrión que las inseminadas con semen que ha sido congelado. La recuperación de embriones ha sido también empleada como procedimiento diagnóstico para evaluar la fertilidad de sementales o bien para asesorar en tratamiento seminales, como; tipo de diluyente, semen refrigerado y semen congelado. (51,53)

➤ **Tipo de yegua**

La edad de la yegua y el número de ovulaciones son dos factores importantes, la recuperación embrionaria es significativamente más baja en yeguas viejas. Las causas de la recuperación reducida del embrión de estas yeguas más viejas incluyen la patología uterina y oviductal y la muerte embrionaria temprana que es mayor en hembras con antecedentes de infertilidad en comparación con hembras normales. Reportan que es más frecuente la recuperación de embriones múltiples en cada ciclo de hembras pura sangre y Warm Blood, comparadas con yeguas árabes o cuarto de milla. (5, 6, 47, 49,51)

Intentos repetidos de recuperación embrionaria.

El intervalo entre la recuperación de embriones y el estro puede ser acortado con algún tipo de prostaglandinas en el día que se efectuaran los lavados uterinos. La administración de prostaglandinas en el día de la recuperación embrionaria no solo asegura el retorno al estro sino que también previene que se establezca la preñez en hembras en las que no fueron recogidos los embriones. En suma podemos mencionar que el proceso facilita aproximadamente 2 intentos adicionales de recuperación por estación. Se ha llegado a la conclusión que la probabilidad de obtener un embrión de una yegua normal en un intento cualquiera es independiente a los resultados del intento anterior. Con la aplicación de prostaglandinas, se han efectuado intentos de recuperación embrionaria en hembras donantes en una estación reproductiva, sin efectos adversos sobre la fertilidad. (7,51,57)

g) TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

La transferencia embrionaria puede ser realizada en forma quirúrgica o no quirúrgica sin importar si el embrión es transferido inmediatamente después de ser recuperado o después de ser refrigerado. Históricamente la transferencia embrionaria quirúrgica ha dado los mejores y más consistentes resultados de preñez, aproximadamente 70 a 75% una semana después de la transferencia. Actualmente la transferencia no quirúrgica tiene más popularidad y reportes recientes de esta técnica han demostrado un porcentaje de éxito igual y hasta superior al obtenido con la transferencia quirúrgica. (15,27)

1) TÉCNICA QUIRÚRGICA

La transferencia quirúrgica es realizada con la yegua en estática, mediante laparotomía por el flanco, utilizando sedación y tranquilización en conjunto con anestesia local. Se realiza una técnica quirúrgica convencional se exterioriza el cuerno uterino a través de la incisión en el flanco(Fig.10), se perfora la superficie usando una aguja y luego se agranda la incisión hasta la luz uterina. El embrión contenido en un pequeño volumen de medio (<25 ml) en una pajueta o en otro tipo de capilar, es depositado en la luz uterina (Fig.11 y12). El orificio en el cuerno uterino no es necesario suturarlo, el útero es colocado nuevamente en el interior del abdomen y la pared abdominal es suturada con la técnica estándar. Debido a la movilidad del embrión equino en el lumen uterino, este puede ser transferido en el cuerno uterino del mismo lado o en el lado contrario a la ovulación. (6,14)



Figura 10. Transferencia embrionaria quirúrgica. El cuerno uterino ha sido exteriorizado a través de la incisión por el flanco.

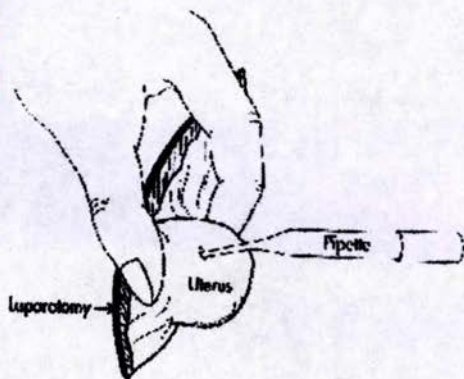


Figura 11 y 12. Transferencia quirúrgica. El embrión es depositado en el útero de la yegua receptora.

2 TÉCNICA NO QUIRÚRGICA

La transferencia embrionaria no quirúrgica es usualmente realizada utilizando: 1) pipeta de inseminación artificial estándar, 2) pistola de inseminación plástica desechable, o 3) pistola de inseminación de acero inoxidable reusable. En todos los casos se utiliza una camisa sanitaria plástica estéril para cubrir los instrumentos de transferencia. Para realizar la transferencia no quirúrgica, la yegua es colocada en un brete, sedada si es necesario y luego se prepara el área perianal como fue descrito para la recolección embrionaria. El operador se coloca un guante plástico estéril en el brazo y encima un guante de látex estéril. Se coloca gel lubricante estéril en el dorso de la mano del operador y sobre la vulva de la yegua. La punta del instrumento de transferencia (cubierto por la camisa sanitaria estéril) es colocada en la palma de la mano y la punta es protegida por el pulgar. El instrumento es colocado a través de la vagina y la punta introducida en el orificio cervical externo aproximadamente 5 cm y en este momento se adelanta hacia la luz del cuerpo uterino. Se debe tener cuidado de no realizar una manipulación excesiva del cérvix ya que puede provocar la liberación de $\text{PGF}_2\alpha$ y existe el riesgo de lisar el cuerpo lúteo y consecuentemente perder la gestación. El embrión puede ser depositado en el cuerpo uterino o en alguno de los cuernos uterinos. Para depositar el embrión en el cuerno uterino el instrumento es guiado por palpación rectal. Una vez ubicado correctamente el instrumento de transferencia es retirado lentamente de manera que la punta no sea obturada por la pared del endometrio mientras se descarga el embrión. (6,7,36,51,57)

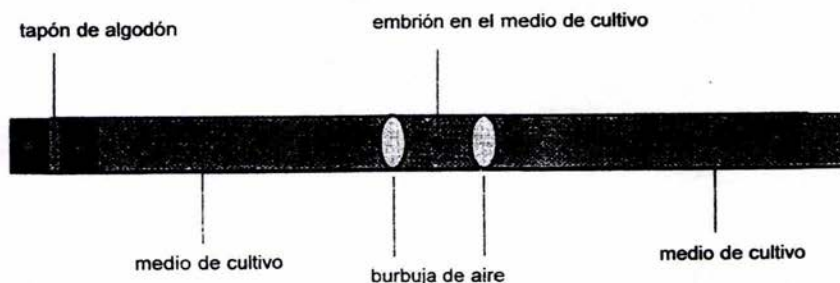


Figura 13. Esquema del envasado del embrión para la transferencia no quirúrgica

g) GESTACIÓN EN LA YEGUA RECEPTORA.

Una vez que se realiza la transferencia del embrión a la yegua receptora en condiciones apropiadas éste continúa con su desarrollo. En la yegua el blastocisto conserva la forma esférica durante su crecimiento, en condiciones normales llega al útero alrededor del sexto día después de la ovulación y se puede detectar con el ultrasonido a partir del décimo día. En caso de transferencia embrionaria es en éste momento cuando se deposita el embrión en el útero de la yegua receptora que al ser sincronizada la ovulación con respecto a la yegua donadora se encuentra en desarrollo su cuerpo lúteo, por lo que las condiciones uterinas son adecuadas para que haya el reconocimiento de la gestación y se continúe con éste proceso. Una vez en el útero, entre los días 11 y 14 de desarrollo mientras alcanza un diámetro de 15 mm la vesícula embrionaria comienza la migración embrionaria intrauterina que consiste en que el blastocisto equino se mueve por todo el útero. La vesícula embrionaria está en constante movimiento y recorre todo el interior del útero desde el cuello hasta los extremos de ambos cuernos, este movimiento cesa entre los días 15 y 17 debido a la presión que ejerce una pared uterina cada vez más hipertrofiada sobre una vesícula embrionaria que no deja de crecer, la vesícula embrionaria se detiene en una de las bases de los cuernos, después de la fijación ya se podrá reconocer el embrión que ocupa siempre la parte ventral del blastocisto, con la vesícula vitelina localizada dorsalmente. El movimiento intrauterino de los blastocistos y su disposición espaciada a lo largo de los cuernos es esencial para su supervivencia. (14,40,41)

En la yegua la adhesión del embrión con el endometrio es muy tardía (24 a 40 días). Las vellosidades primarias se ramifican y dan microcotiledones que unen firmemente el trofoblasto al endometrio. La implantación se completa hasta mediados del cuarto mes. (14,41)

El blastocisto debe inhibir la secreción uterina de la prostaglandina F_{2a} (PGF_{2a}) cuya actividad luteolítica produce la regresión del cuerpo lúteo y el cese de la producción de progesterona. (14,18)

Entre los días 25 y 35, algunas células trofoblásticas de una discreta zona anillada del corion, se multiplican en forma rápida invadiendo profundamente el endometrio materno entre los días 36-38 para formar unas protuberancias conocidas como copas endometriales. Estas copas secretan grandes cantidades de una hormona gonadotrófica (GCe o PMSG) dentro de la sangre materna, que en conjunción con FSH promueve la aparición de CL accesorios, los cuales se forman de folículos que sufren crecimiento hasta el tamaño preovulatorio. La GCe comienza a aumentar sus valores séricos al tiempo de la adhesión placentaria, alcanzando valores picos entre los días 60 y 80, para declinar a valores basales cerca del día 120 de gestación. La actividad lútea decae nuevamente hacia la mitad de la gestación y la placenta asume este rol. La unidad feto-placenta sintetiza grandes cantidades de progesterona a partir de precursores maternos y de otros sintetizados por las gónadas fetales. (3,41)

La información es escasa acerca de los mecanismos de reconocimiento materno precoz de la preñez en la yegua, de cómo el útero mantiene al embrión y cuales son los mecanismos que evitan el rechazo materno de los antígenos embrionarios, se supone que el blastocisto equino puede estar protegido del rechazo inmunitario por la presencia de glucoproteínas en la zona pelúcida y de la cápsula celular. Se comprobó la presencia de un factor con efecto inmunosupresor como resultado de proteínas específicas de la preñez conocido como factor de preñez temprana (FPT), éste se encuentra presente en la yegua 48 horas después de la cópula, actúa suprimiendo la formación de linfocitos y por lo tanto contribuye a la prevención del rechazo inmunológico del embrión, evitando la intervención de los linfocitos. En rumiantes se ha reportado la presencia de la PGE_2 y de Interferón TAU que intervienen en la regulación del sistema inmunológico de la madre para evitar un rechazo de los embriones y posiblemente también tengan actividad en la yegua. (3,40)

Algunos de los factores que afectan las tasas de preñez de la transferencia embrionaria son los siguientes:

- **Factores del embrión:** La edad, tamaño y calidad del embrión.
- **Factores de la yegua receptora:** la habilidad de la yegua receptora para gestar, la sincronización con la donadora y su estado nutricional.
- **Método de transferencia:** en un principio las mejores tasa de preñez se obtuvieron con la transferencia quirúrgica, actualmente con la técnica no quirúrgica se han obtenido resultados similares e inclusive mejores. (4,6,51)

Algunas de las razones propuestas por las que se obtenían resultados inferiores con la técnica no quirúrgica son:

- 1)- Respuesta inflamatoria local transitoria debido a contaminaciones bacterianas.
- 2)- Expulsión del embrión debido a la estimulación cervical inductora de contracciones uterinas mediadas por prostaglandinas.
- 3)- Lesiones traumáticas inducidas por la pipeta utilizada para efectuar la transferencia.
- 4)- Daño sufrido por el embrión durante su transferencia. (51)

➤ **Otros factores:** Hay un efecto significativo de la habilidad del técnico en las tasas de preñez en la transferencia de embriones no quirúrgica, otro factor es la estacionalidad, es importante hacer notar que independientemente del año o del método de transferencia, las tasas de preñez han sido más elevadas durante julio y agosto, esto es una sugerencia para aumentar las tasas de preñez y puede estar relacionado con el estado nutricional de las yeguas reproductoras. (4,51)

i) CONSERVACION DE EMBRIONES EQUINOS.

Embriones refrigerados

Actualmente los embriones equinos se pueden refrigerar 5 °C y transportar para su transferencia en las siguientes 24 horas, este sistema reduce la presión de sincronización sobre las receptoras ampliando el margen de días para la transferencia. Los resultados obtenidos con embriones refrigerados por 12 a 30 hrs. en medio y recipientes especiales son semejantes a los transferidos directamente y en algunos países es una práctica rutinaria. Los embriones equinos se refrigeran utilizando el método desarrollado por Carneval (1987), que utiliza al medio F-10 de Ham como medio de mantenimiento y refrigeración. Previo a la utilización del medio éste debe ser amortiguado utilizando una mezcla de gases; 90 % N₂, 5% O₂, y 5% CO₂ gaseando el medio durante 3 a 5 minutos (Fig. 14). Luego el medio es suplementado con 10% suero fetal bovino, penicilina y estreptomycin. Debido a que el medio F-10 de Ham debe ser gaseado antes de ser usado y esto requiere de un tanque para mezcla de gases con su válvula reguladora, muchos médicos veterinarios que realizan transferencia de embriones solicitan que el centro de transferencia embrionaria les envíe el medio F-10 de Ham ya gaseado antes de la recuperación del embrión. El intervalo entre la colección y la transferencia de embriones almacenados es generalmente de 12 a 30 horas. Desafortunadamente si un embrión no se recupera de la donante programada, el F-10 de Ham que había sido gaseado no se puede almacenar y utilizar posteriormente. Por lo tanto, varios investigadores están trabajando para identificar un medio de cultivo para transportar embriones equinos que no requiera ser gaseado. (12,47)

Para envasar el embrión, se esteriliza el medio F-10 de Ham por filtrado y se coloca en tubos de 5 ml con tapa a presión, dejando un espacio de aire en la parte superior. Después se transfiere cuidadosamente al embrión dentro del medio, el tapón es colocado a presión y el tubo es envuelto en parafilm. En seguida se llena un tubo de centrífuga de 50 ml con medio F-10 de Ham (no filtrado) y se coloca dentro el tubo de 5 cc conteniendo el embrión. La tapa del tubo de 50 ml es colocada tratando de

eliminar la mayor parte de aire posible y luego es envuelto en parafilm. El embrión ya envasado es colocado en un Equitainer (Fig. 15) que enfría lentamente al embrión hasta 5 °C. En estas condiciones el embrión puede mantenerse viable como mínimo 24 horas, durante este tiempo puede ser transportado por una línea aérea comercial o enviado en forma urgente hasta el centro de transferencia embrionaria. (6,22,23)



Figura 14. Gaseado de la botella de 100 cc de medio F-10 de Ham con la mezcla gaseada de 90% N₂, 5% O₂, y 5% CO₂ durante 3 a 5 minutos.



Figura 15. Equitainer para transporte de embriones refrigerados.

Embriones congelados

El primer nacimiento de un potrillo producto de un embrión equino criopreservado a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ fue reportado en 1982 por investigadores japoneses, de un embrión colectado en el día 6. (31)

El objetivo de la crioconservación es la interrupción del metabolismo celular por un tiempo determinado, durante el cual los embriones se mantiene en anabiosis artificial. La actividad metabólica de los embriones conservados y almacenados en nitrógeno líquido a $(-196\text{ }^{\circ}\text{C})$ es prácticamente cero, puesto que a esa temperatura no es posible ningún movimiento molecular. El momento más crítico en la crioconservación de embriones es el congelado y descongelado, ya que es en ese instante cuando suceden muchos procesos físico-químicos regidos por las diferencias de temperatura y transporte de agua entre las células y el medio. (20)

Cuando los embriones equinos se van a destinar a la congelación, el día de la recolección debe fijarse en forma precisa de manera que se puedan coleccionar mórulas en el día 6, con un tamaño aproximado de 152 micras. Los blastocistos temprano, maduros y expandidos sufren mayor daño en el congelamiento y por lo mismo disminuye su fertilidad, la dificultad que existe en la recolección es que al día 6 puede haber embriones que todavía no hayan descendido al útero de la yegua.

La transferencia de embriones equinos congelados se ha retrasado en comparación con los embriones de los bovinos por razones biológicas y artificiales debido a que con los métodos de congelación que se han usado los porcentajes de fertilidad aún no son los esperados. (47,57)

La mayoría de asociaciones de registro de equinos no han aprobado el registro de potros de la transferencia de embriones que han sido congelados. Además, porque la superovulación no se utiliza rutinariamente, hay muy pocas ocasiones donde los embriones adicionales se obtienen. En cuanto a lo biológico, el embrión equino es el

único que forma una membrana celular de proteína llamada la cápsula, que impide la penetración del crioprotector y hace que congelar blastocistos tempranos y blastocistos expandidos sea más difícil. Legrand y colaboradores investigaron si la cápsula embrionaria impedía congelar de embriones equinos. El primer experimento evaluó la relación entre el grosor de la cápsula y el daño durante la congelación. Estos trabajadores divulgaron que el número de células muertas era directamente proporcionado al grosor de la cápsula y que la cápsula interfiere previniendo la entrada del glicerol en las células embrionarias. (30,47)

La mayoría de los embriones que se congelan en algunos países hasta la fecha no están siendo exportados pero se están almacenando como manera de preservar el material genético (banco de embriones). Es probable que esta tecnología se amplíe en el futuro al cambiar las restricciones de las Asociaciones de criadores, así como el desarrollo de las técnicas para la superovulación que se puedan utilizar de manera rutinaria en la yegua. También parece ser que la manera más factible y económica de mover el material genético a través del mundo es en un estado de criopreservación. Si bien actualmente hay algunos resultados promisorios en cuanto a la congelación de embriones equinos, ésta técnica no ha alcanzado un nivel de desarrollo y difusión muy amplios, pero se sigue investigando para hacerla más eficiente. (12, 30,31,34,47)

Embriones Vitrificados: La vitrificación de embriones es una variante de la criopreservación en la que se utilizan altas concentraciones de crioprotectores que evitan la formación de cristales que son deletéreos para los embriones y en general los protocolos utilizan curvas de descenso térmico muy bruscas que no necesitan maquinas congeladoras especiales, lo que disminuye notablemente los costos operativos de esta técnica. Hochi y Col. en 1994 reportaron la primera preñez en equinos luego de transferir embriones vitrificados. (31)

VI. ANÁLISIS DE LA INFORMACION

La eficiencia reproductiva en los equinos se ha beneficiado en los últimos años por la aplicación de tecnologías como la inseminación artificial y la transferencia de embriones que alcanzaron gran difusión e impacto en aquellos sistemas productivos que han aprobado y regulado su uso. Un buen ejemplo de esto son los caballos de polo y de salto dónde yeguas de alto rendimiento, después de terminar la temporada o inclusive durante los periodos de competición, pasan como donadoras a centros de transferencia de embriones. De esta manera se han podido obtener múltiples descendientes de yeguas en entrenamiento sin interferir en su carrera deportiva. Hasta el momento solo en algunos países, razas de caballos deportivos están aprovechando las ventajas de la transferencia de embriones que permite maximizar la difusión y preservación de calidad genética. (6,31,51)

La transferencia de embriones es una técnica de reproducción asistida que ha tenido un amplia difusión y aplicación comercial en la especie bovina en comparación con los equinos; la diferencia es que en los bovinos existen métodos para hacer que haya múltiples ovulaciones y se pueden obtener hasta 8 embriones por lavado, a diferencia de los equinos que solo se obtienen uno en el 70 % de las expectativas, esto ha hecho que la transferencia de embriones en equinos no sea tan comercial, otra limitante es que con los métodos para congelamiento de embriones equinos los porcentajes de preñez aún son bajos, actualmente solo existe métodos disponible en algunos países para refrigerar y transportar los embriones para su transferencia en las próximas 30 horas de su recolección. (6, 19,20)

La transferencia de embriones se inicia con la selección de las donadoras y receptoras, las cuales deben ser de preferencia jóvenes y con buena salud reproductiva, posteriormente se debe lograr la sincronización entre estas, este es uno de los procedimientos más costosos ya que se recomiendan al menos dos receptoras por donadora y solo se ocupa una, en caso de que la recolección no sea exitosa entonces,

serán 2 receptoras las que no se utilicen, al menos que haya otra donadora que coincidan con la sincronización de las receptoras, si hubiera un método adecuado para la congelación de embriones esto no sería necesario ya que la transferencia se podría llevar a cabo siguiendo el ciclo estral de la yegua receptora. Después de la sincronización, tomado como día 0 el día de la ovulación la yegua donadora, la cual se insemina o se le da monta, se realiza la recolección embrionaria 7 u 8 días después de la ovulación. En cuanto al método de recolección este no ha tenido cambios en los últimos años y se realiza por vía trans-cervical con una sonda foley o con un catéter adaptado, posteriormente se busca el embrión y se evalúa de 1 a 5; solo se recomienda transferir los embriones grado 1 y 2, se envasa para su transferencia inmediata o para refrigerarlo y enviarlo a otro centro de transferencia.

La técnica de transferencia no quirúrgica es la más usada debido a que es más práctica y se ha mantenido sin cambios últimamente: La técnica quirúrgica cada vez se realiza menos ya que con la técnica no quirúrgica se han tenido los mismos resultados e inclusive hay reportes de resultados más altos, la transferencia de embriones en equinos en general es una técnica que esta en vías de desarrollo y que se ha limitado por las restricciones de las asociaciones y por aspectos biológicos, como la ineficacia para inducir ovulaciones y las bajas tasas de preñez con embriones congelados lo que hace que su aplicación comercial aún sea limitada. (6,47)

Las transferencias embrionarias tienen el potencial de aumentar la eficiencia reproductiva de la especie, pero es conveniente remarcar sus limitaciones, dado que a veces las expectativas puestas sobre ellas han sido infundadas. Las principales indicaciones incluyen: 1) aumentar el número de potrillos por año en yeguas seleccionadas, 2) producir potrillos de yeguas en competición, 3) producir potrillos en yeguas que no puedan gestar por problemas no reproductivos, por ejemplo fracturas de pelvis, etc. *Lossino (2002)* considera que bajo condiciones ideales (donantes, receptoras, padrillos fértiles y personal capacitado), se puede esperar una tasa de recuperación de embriones del 50 a 80 % y una tasa de transferencias exitosas del 50 a

80 %, lo que determinaría un porcentaje de preñez total del 25 al 65 %. Por ésta técnica es posible obtener, en promedio 4 ó mas potrillos por año de la misma yegua, pero existen evidencias en Argentina de una yegua de polo de la que se obtuvieron 10 preñeces en la misma temporada reproductiva.

Se considera que trabajando con yeguas y sementales fértiles los porcentajes de recuperación embrionaria son de alrededor del 50 al 60 %. los porcentajes de preñez sobre embriones transferidos a yeguas receptoras fértiles son de aproximada mente el 50% por lo que la eficiencia global de esta técnica es del 25 al 30% lo que es igual 1 potrillo por cada 4 lavados. Estos son los valores mínimos en condiciones de manejo adecuados de acuerdo a *Riera (2001)*.

Vázquez (2001) menciona que las expectativas de éxito de transferencia de embriones en yeguas sanas y fértiles son de entre 60 y 70 % de recuperación de un embrión por lavado o por ciclo y las probabilidades de gestación se encuentran entre el 45 y 75 %. Hablando en términos más sencillos para obtener una gestación por transferencia embrionaria, se requiere un promedio de tres lavados, recuperándose 2 embriones y que uno de estos produzca una gestación. Por su parte *Langneaux (1999)* reporta resultados de recolección de 40-50% con gestaciones del 65%.

Aunque los reportes de porcentajes de recuperación son variables dependiendo de diversos factores que pueden ir desde 45% hasta 75% incluso un poco más, actualmente podemos considerar que el porcentaje promedio de recuperación en condiciones apropiadas es de 50 a 70%, en cuanto a los porcentajes de gestación los reportes también son muy variables, en la actualidad un rango de 50 al 70% de gestación es aceptable trabajando en condiciones adecuadas y con animales con fertilidad normal. Podemos considerar que en general el porcentaje da eficiencia de esta técnica es de un 30 a 50% como máximo. (6,28, 31,42, 54)

VII. CONCLUSIONES

La transferencia de embriones en equinos es una técnica de reproducción asistida que ha beneficiado la eficiencia reproductiva en algunas razas equinas que están aprovechando las ventajas de esta técnica y es una alternativa para obtener más descendientes de yeguas de alto valor genético.

Los avances que se han tenido son: la posibilidad de transportar embriones equinos refrigerados para transferirlos obteniendo resultados satisfactorios y mayores porcentajes de gestación con la técnica de transferencia no quirúrgica; los cuales son similares a la transferencia quirúrgica lo que hace que el uso de ésta última sea cada vez menor, debido a que la anterior es más práctica y menos costosa.

La transferencia de embriones en equinos aún tiene limitantes como son: las restricciones por parte de algunas asociaciones de criadores para la aplicación ésta técnica, no hay método eficaz para inducir la superovulación en yeguas y atraso en el desarrollo de métodos para la aplicación comercial de embriones equinos congelados; debido a lo anterior se requiere que haya menos restricciones y más trabajos como éste que permitan estar al tanto de los avances en las técnicas de reproducción asistida y así lograr mayor difusión e investigaciones que ayuden a superar las limitantes y desarrollar métodos que disminuyan los costos de ésta técnica para que pueda tener una aplicación rutinaria en equinos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar J, Woods G.L: Embryo transfer in horse: indications, technique and expected outcomes. *Current Therapy in Large Animal. Theriogenology: Philadelphia Co.* 1997; 208-213.
2. Allen E: Fertilidad y Obstetricia Equina, Editorial Acribia, Zaragoza España 1999.
3. Allen WR.. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy: *Reproduction*, 2001 121(4):513-527.
4. Angiano J.E: Pérdidas Embrionarias y Anormalidades en la Preñez Temprana. *Primer Encuentro de Médicos Veterinarios Relacionados con al Reproducción en México.* Monterrey N. L. México 2001.
5. Ball B.A, Little T.V, Weber J. A: Survival Of Day-4 embryos from young, normal mares and sufertile mares after transfer to normal recipient mares. *Journal of Reproduction and Fertility* 1989; 85: 187-209.
6. Ball B: A: *Recent Advances In Equine Reproduction. International Veterinary Information Service.* Ithaca, New York USA. 2000.
7. Barrera M. J: Experiencias en la transferencia de embriones en el criadero militar de ganado de Santa Gertrudis, Chihuahua. *V curso internacional de reproducción equina.* México 2003.
8. Boeta A. M: *Uso de Hormonas en la reproducción equina. Acontecer Equino* Vol. 1 No. 7 Nov.- Dic. 1998.
9. Bowen M.J, Salsbury J.M: Non-surgical embryo auto-transfer in the mare. *Journal Vet. Equine* 1985; 3: 100-102.
10. Bowling A.T, Ruvinsky A: *The genetics of the horse.* CABI Publishing. N.Y. USA 2000.
11. Buxadé C: *Producción Equina y de Ganado de Lidia.* Tomo IX. Ediciones Mundi-Prensa México 1996.

12. Carnevale E.M, Squires E.L, Mckinnon A.O: Comparison of Ham's F-10 with CO₂ or Hepes Buffer for storage of equine embryos at 5 °C for 24 H. *Journal Animal Science* 1987; 65: 1775-1781.
13. Castleberry R.S, Shneider H.J, Griffin J.L: Recovery and transfer of equine embryos. *Therigenology* 1980;13 :90 (abstract).
14. Climent S, Sarsa M, Domínguez L, Muniesa P, Terrado J: *Manual de Anatomía y Embriología de Los Animales Domésticos*. Editorial Acribia S. A. Zaragoza España 1998.
15. Fleury J.J, Alvarenga M.A: Effects of collection day on embryo recovery and pregnancy rates in a nonsurgical equine embryo transfer program. *Therigenology* 1999; 51:91-104.
16. Friedich N.K: *Crianza de caballos* Centro de Estudios Agropecuarios. Editorial Iberoamerica S A de C V. 2001.
17. Galli C: *Primer yegua clonada* Laboratorio di Tecnologie della Riproduzione. Italia 2003.
18. Gondard P.J: *Ecografía Veterinaria*. Editorial Acribia S. A. Zaragoza España 2000.
19. Gordon I: *Reproducción controlada del ganado vacuno y búfalos*. Editorial Acribia España 1999.
20. Gorch A: *Transferencia de embriones en ganado vacuno*. Editorial Acribia Zaragoza España 1997.
21. Hafez E.S: Hafez B: *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. Editorial McGraw Hill México 2002.
22. Hernández M.D: *La yegua y el semental*. *Catálogo de Sementales* 2002. 7-12.
23. Hernández M.D: *Impacto de la eficiencia reproductiva en el mejoramiento genético de los equinos*. *A caballo*. 21: Vol. 3 Ene.-Feb.1999. 29-31.
24. Hernández M.D: *Últimos Avances en Reproducción Equina*. *A caballo*. 23: Vol. 3 May-Jun. 1999.
25. Hernández M.D: *Inseminación artificial en el caballo*. *A caballo*. 15: Vol. 3 Mar. 1998.

26. Hernández M.D: Inseminación artificial en el caballo. A caballo 16: Vol. 3 Abr-May. 1998.
27. Jasko D.J: Comparison of pregnancy rates following nonsurgical transfer of day 8 equine embryos using various transfer devices. Theriogenology. 2002: 58 713-715. (abstract).
28. Lagneaux D, Duchamp G: Le transfert d'embryons chez les équidés. 1999 INRA Prod. Anim. 12: 344-345.
29. Laneher B, Dickson D, Schumacher J: Manual of Equine Reproduction. Musby Missouri USA. 1998.
30. Legrand E, Bencharif I, Barrier B. I, Delajanrraud H, Corniere C, Fiéni F, Tainturier D, Bruyas J.F: Comparison of pregnancy rate for day 7-8 equine embryos frozen in glicerol with or without previous enzymatic tratament of their capsule. Theriogenology. 2002: 58: 721-723 (abstract).
31. Losinno L, Aguilar J: Producción Equina, Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria , Universidad Nacional de Río Cuarto Argentina. Notas de la AACCP 2002.
32. Loy R.G, Pemstein R, Ocanna D, Duglas R.H: Control of ovulation in ciclyng mares whit ovarian steroides and prostaglandin. Theriogenology. 1981; 15: 191-199.
33. Luliano M.F, Squires E.L, CooK V.M: Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. Journal Animal Scince. 1985;60:258-253.
34. Maclellan L. J, Carnevale E.M, Coutinho da Silva, McCue P.M, Seider G.E, Squires E.L: Cryopreservation of small and large equine embryos pre-trated whit cytochalasin-B and/or trypsin. Theriogenology. 2002: 58: 717-720.
35. McCue P.M: Squires E.L: Diagnostic Techniques and Assisted Reproductive Technology. Veterinary Clinics of North America.Equine Pract. 1996;12;1-11.

36. McKinnon A. O, Voss J.L: Equine Reproduction Lea & Febiger U.S.A. 1993.
37. Medina V: Técnicas y criterios de inseminación artificial en el equino con semen frío y congelado. Primer Encuentro de Médicos Veterinarios Relacionados con al Reproducción en México. Monterrey N.L. México 2001.
38. Meira C, Alvarenga MA, Papa F.O: Cryopreservation of equine embryos using glicerol and 1,2-propaneidol as cryoprotectants. Equine Veterinary Journal 1993,15: 64-66.
39. Morel D: Equine Reproductive Phisyology. Breeding and Study Management. CABI Publishing N.Y. USA. 1999.
40. Neely D.P, Hillman R: Reproducción Equina. Emisferio Sur. Monterde Uruguay 1991.
41. Noden D, De Lahunta A: Embriología de los animales domésticos. Editorial Acribia. Zaragoza España 1990.
42. Riera F.L: Transferencia embrionaria en equinos. Anuario de la Asociación Argentina de Criadores de Caballos de Polo. Argentina 2001.
43. Rossdale P: Cría y reproducción del caballo. Editorial Acribia Zaragoza España 1991.
44. Samper J. C: Equine Breeding Magnagement and Artificial Insemination. W. B. Saunders Company. U.S.A 2000.
45. Sandoval L: Manejo y evaluación del envío de semen. Primer Encuentro de Médicos Veterinarios Relacionados con al Reproducción en México. Monterrey N. L. México 2001.
46. Scott M.A: Transporte de semen en la yegua. Primer Encuentro de Médicos Veterinarios Relacionados con al Reproducción en México. Monterrey N. L. México 2001
47. Squires E.L, Carnevale E.M, McCue P.M, Bruemmer J.E: Embryo technologies in the horse. Theriogenology. 2003: 59;151-170.
48. Squires E.L, Garcia R.H, Ginther O.J: Factors affecting success of equine embryo transfer. Equine Veterinary Journal 1985: 3; 92-95.

49. Squires E.L, McClain M.G, Ginther O.J, McKinnon A.O: Spontaneous multiple ovulation in the mare and its effect on the incidence of twin embryo collections. *Theriogenology*. 1987;28;609-614.
50. Squires E.L, Seidel G.E: Collection and transfer of equine embryos. *Animal Reproduction Biotechnology Laboratory Bulletin No. 08*. Colorado State University, Fort Collins, CO; 1995.
51. Van S. D: Clínicas de Norteamérica Práctica Equina. Reproducción. *Intermédica USA*. 1993.
52. Varner D.D, Blanchard T.L, Brinsko S.P: Estrogen, oxytocin and ergot alkaloids uses in reproductive management of mares. *Proc. 38 the Annual AAEP Convention, San Diego CA 1988*: 219-241.
53. Vázquez S. J: Manejo Hormonal de la yegua para la inseminación artificial. *Primer Encuentro de Médicos Veterinarios Relacionados con al Reproducción en México*. Monterrey N. L. México 2001.
54. Vázquez S. J: Transferencia de Embriones en Equinos y sus Perspectivas a Futuro. *Memorias del IV Curso Internacional de Reproducción Equina*. México 2001.
55. Wade J, Gallagher M, Gordon I: Equine embryo transfer in Ireland from research into commercial practice. *Equine Veterinary Journal* 1989; 8;76. (abstract).
56. Woods G. L, White K.L, Vanderwall D.K, Aston K.I, Bunch T.D, Campell K.D, Meerdo L.N: Cloned muled pregnancies produced using nuclear transfer. *Theriogenology* 2002; 58; 779-782.
57. Zarco L, Boeta A.M: Reproducción equina. *Academia de investigaciones en biotecnología de la reproducción*. México D. F. 1995.