

Marenzi, María Inés

Aspectos operativos en transferencia embrionaria equina y análisis del potencial de la tecnología de criopreservación

**Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria
Facultad de Ciencias Agrarias**

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Marenzi, M. I. 2015. Aspectos operativos en transferencia embrionaria equina y análisis del potencial de la tecnología de criopreservación [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en:
<http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/aspectos-operativos-transferencia-embrionaria.pdf> [Fecha de consulta:.....]



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA

Facultad de Ciencias Agrarias

Ingeniería en Producción Agropecuaria

**Aspectos operativos en transferencia embrionaria equina y
análisis del potencial de la tecnología de criopreservación**

**Trabajo final de graduación para optar por el título de:
Ingeniero en Producción Agropecuaria**

Autor: María Inés Marenzi (05-090029-9)

Profesor Tutor: Ph.D., M.Sc. Marina J. Sansiñena, Ing. P. A.

Fecha: 30 de Noviembre de 2015

Resumen

La transferencia embrionaria equina es una técnica de reproducción asistida aplicada en animales cuya descendencia es valiosa y en los cuales se desea aumentar su índice reproductivo. Es una práctica muy utilizada en la actualidad que se expande y mejora día tras día pero que, sin embargo, no es perfecta. Uno de sus principales inconvenientes es la falta de receptoras ya sea debido a la insuficiente cantidad o al inadecuado estado fisiológico a la hora de realizar la transferencia, motivo por el cual se plantea como solución en este trabajo la posibilidad de aplicar la técnica de criopreservación.

Al realizarse este estudio se busca adquirir experiencia práctica en el procedimiento de transferencia embrionaria equina, realizar una comparación de resultados en términos de cantidad de embriones obtenidos y preñeces logradas en el establecimiento El Silencio ubicado en Santa Lucía (localidad de San Pedro, provincia de Buenos Aires), y evaluar los nichos en los cuales se podría aplicar la criopreservación. Con este fin se llevó a cabo una revisión bibliográfica del tema y una descripción detallada del procedimiento de transferencia realizada a campo.

En el caso de El Silencio, el porcentaje de embriones recuperados se encuentra dentro del 55-67% y su éxito de transferencia es del 61-71%, resultando en un porcentaje total de éxito de preñez del 37-47%, motivo por el cual podemos concluir que el establecimiento se encuentra dentro de los porcentajes internacionales esperados para esta práctica e inclusive por arriba de la media. A su vez, se observa que los resultados podrían ser aun mejores si en los momentos de falta de receptoras se tuviera como opción a la vitrificación pudiendo esperar que se obtengan resultados similares a los ideales (30% de éxito) en esta práctica también.

Contenido

Resumen	2
Introducción	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DEL TEMA	7
Características del desarrollo del embrión equino	7
Transferencia embrionaria de embriones equinos	9
<i>Técnica de recuperación y transferencia de embriones</i>	9
- <i>Metodología de la recuperación del embrión</i>	9
- <i>Factores que afectan la recuperación del embrión</i>	11
- <i>Metodología de la transferencia del embrión</i>	11
- <i>Factores que afectan la transferencia del embrión</i>	13
<i>Manejo de las donantes y receptoras</i>	13
- <i>Criterios de selección de donantes</i>	13
- <i>Criterios de selección de receptoras</i>	14
- <i>Sincronización</i>	15
Criopreservación de embriones equinos	19
<i>Refrigeración</i>	19
- <i>Metodología de la refrigeración del embrión</i>	19
- <i>Comparación del proceso de Refrigeración vs Transferencia embrionaria</i>	21
<i>Criopreservación</i>	22
- <i>Congelamiento</i>	22
<i>Metodología del congelamiento del embrión</i>	23
- <i>Vitrificación</i>	23
<i>Metodología de la vitrificación del embrión</i>	23
- <i>Dificultades en la criopreservación</i>	24
- <i>Análisis del tema</i>	25
Costo de la transferencia embrionaria y de la criopreservación equina	26
PRÁCTICA A CAMPO	28
Descripción de instalaciones	28
Descripción de manejo de donantes	31
Descripción de procedimiento	32
<i>Lavaje uterino</i>	32
<i>Recuperación y transferencia del embrión</i>	34

Resultados	38
<i>Resultados por temporada</i>	38
- <i>Temporada 2010-2011</i>	38
- <i>Temporada 2011-2012</i>	40
- <i>Temporada 2012-2013</i>	43
- <i>Temporada 2013-2014</i>	45
<i>Comparación entre temporadas</i>	47
- <i>En función de los días</i>	47
- <i>En función de los valores absolutos</i>	50
<i>Discusión de resultados</i>	55
Conclusiones	57
Anexo	58
Bibliografía	60
Índice de Figuras, Gráficos y Tablas	63

Introducción

La transferencia embrionaria en la yegua es una de las técnicas de reproducción asistida más ampliamente utilizada en la actualidad y su desarrollo mejora día a día. El proceso de transferencia embrionaria equina consiste en la recuperación de embriones del útero de una yegua donante y su transferencia e implantación en el tracto genital de una yegua receptora. Para tal fin, ambas deberán presentar ovulación sincronizada. En general, las yeguas son capaces de producir como máximo, un potrillo por año mientras que los padrillos pueden originar docenas y hasta cientos de potrillos por año. Por consiguiente, los padrillos tienen una influencia genética mucho mayor en la descendencia. Si bien la transferencia embrionaria no es capaz de corregir esta diferencia, sí es capaz de permitir la obtención de más de un potrillo por año de una yegua y por lo tanto, propagar más su genética.

Las técnicas de recolección y transferencia embrionaria en los caballos se desarrollaron por primera vez en la década del '70, obteniéndose los primeros potrillos mediante el uso de esta técnica en Japón en 1973 (Oguri y Tsutsumi, 1973) y en Cambridge en 1975 (Allen y Rowson, 1975). La técnica no comenzó a ser ampliamente utilizada hasta la década del '80 debido a que existía la necesidad de mantener a las yeguas receptoras en el mismo lugar donde se realizaban las recolecciones de embriones. Hacia fines de los 80's fue descrita la técnica de enfriamiento de embriones equinos lo que permitió el desarrollo de un método práctico de refrigeración y transporte de los embriones equinos por corto tiempo (24 h). Este avance dio solución en parte, a esta limitante.

Las aplicaciones de esta técnica son variadas e incluyen:

1. La obtención de potrillos de yeguas viejas y valiosas, pero infértiles.
2. La obtención de potrillos de yeguas jóvenes (2 años), para permitirles alcanzar su pleno crecimiento y desarrollo.
3. La obtención de potrillos de yeguas en actividad deportiva, evitando la necesidad de interrumpir su performance.
4. La obtención de potrillos de yeguas subfértiles o infértiles.
5. La obtención de un mayor número de potrillos por yegua por año.
6. La obtención de potrillos de yeguas con problemas de salud de índole no reproductivo, para no afectar su bienestar durante la gestación.
7. La obtención de potrillos sanos previniendo defectos genéticos mediante el análisis de ADN embrionario.
8. La recuperación de especies equinas en peligro de extinción mediante la gestación de los potrillos en yeguas domésticas.
9. La utilización de la técnica como herramienta de investigación como por ejemplo de factores de desarrollo e inmunológicos, factores que afectan la función cardiovascular postnatal o rasgos únicos de desarrollo del embrión equino.

En el año 2002 la Asociación de Cuarto de Milla americano, el registro más grande de Estados Unidos, aprobó el registro ilimitado de potrillos provenientes del uso de la transferencia embrionaria, motivo por el cual el uso de esta técnica aumentó considerablemente. En Argentina, esta técnica alcanzó una escala comercial a principios de los 90's cuando fue desarrollada como medio para obtener descendencia a partir de las mejores yeguas petiso de polo, sin terminar con su carrera deportiva (Pashen *et al.*, 1993; Riera y McDonough, 1993).

El Haras “El Silencio” (establecimiento situado en Santa Lucía, provincia de Buenos Aires) realiza la crianza de caballos Cuarto de Milla. En él se comenzó con la técnica de transferencia embrionaria en el año 2007 como método para aumentar su índice reproductivo. Durante el período de entrenamiento y aprendizaje de la tecnología en este haras, pude observar un problema recurrente: en muchas ocasiones (particularmente en el comienzo y fin de la temporada reproductiva equina) aunque se tienen yeguas donantes y se logran recuperar embriones de los lavajes uterinos, existe una escasez de yeguas receptoras ciclando y por lo tanto es imposible transferir esos embriones recuperados. Como solución a este inconveniente y como método para aumentar la efectividad del proceso, en este trabajo se propone el análisis teórico de la tecnología de criopreservación como una alternativa para el aprovechamiento de estos embriones.

En este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Adquirir experiencia práctica en el procedimiento de transferencia embrionaria equina, con énfasis en los aspectos de laboratorio y embriología.
- Realizar una comparación de resultados en términos de cantidad de embriones obtenidos y preñeces logradas entre las cabeza/cola vs. centro de temporada reproductiva equina.
- Evaluar los nichos en la actividad de transferencia embrionaria equina en los cuales se podría aplicar la criopreservación.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DEL TEMA

Características del desarrollo del embrión equino

Bezard *et al* (1989) describieron en su estudio, a partir de 24 ovocitos y embriones equinos recuperados en 32 lavajes uterinos, el desarrollo del embrión equino a las 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas pos ovulación. A las 6 horas, observaron que todos los ovocitos, se encontraban rodeados por células del cúmulus y que poseían solo 1 célula en su interior; a pesar de esto, no se podía determinar si eran ovocitos fertilizados o no. A las 12 horas, observaron que los ovocitos recuperados habían perdido suficientes células del cúmulus para distinguir una célula y levemente 2 cuerpos polares. A las 24 horas, los embriones se encontraban con 2 células visibles; a las 48 horas, los embriones tenían entre 4 y 6 células; a las 72 horas, tenían entre 8 y 11 células visibles y a las 96 horas, tenían entre 8 y 12 células. Todos ellos fueron embriones recuperados y desarrollados *in vivo*. A lo largo de todo este tiempo, los embriones se encuentran en el oviducto. Entre los días 5 $\frac{1}{2}$ y 6, los embriones equinos son transportados a través del oviducto hacia el útero (Freeman *et al.*, 1991), encontrándose en estadios de desarrollo de mórula compacta (masa compacta de blastómeras, con una zona pelúcida prominente y con un tamaño aproximadamente de 220 μm) a blastocito temprano (comienza la formación de fluido que llena la cavidad del blastocele y el adelgazamiento de la zona pelúcida; presenta un tamaño aproximadamente de 290 μm). Luego de entrar al lumen uterino, el tamaño del embrión crece exponencialmente hasta blastocito expandido: la cavidad del blastocele se encuentra totalmente formada y el macizo celular interno (el futuro embrión-feto), puede ser diferenciado de la capa trofoblástica externa (futura placenta) (D. Vanderwall, 2000). En este momento, una capa de mucina como una envoltura embrionaria, es depositada en la superficie interna de la zona pelúcida de los blastocistos tempranos, coincidente con la expansión del blastocele. La cápsula está constituida por una glucoproteína elástica y resistente que envuelve el blastocisto entre los días 6 y 22 (Allen y Stewart, 2001). La cápsula mantiene la configuración esférica del embrión y acumula los componentes de las secreciones exócrinas de las glándulas endometriales (leche uterina), como los nutrientes para el embrión móvil; de esta forma el embrión libera la señal antiluteolítica de reconocimiento materno de la gestación a toda la superficie del endometrio (G. A. Palma, 2008).

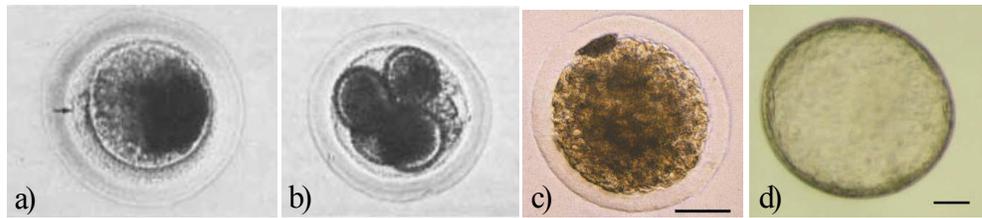


Figura 1: Distintos estadios del embrión equino. a) Día 0: 12 hs post ovulación (160X). Fuente: *Chronology of equine fertilization development in vivo and in vitro and embryonic* (Bezard *et al.*, 1989); b) Día 2: 48 hs post ovulación (160X). Fuente: *Chronology of equine fertilization development in vivo and in vitro and embryonic* (Bezard *et al.*, 1989); c) Día 6: Mórula indiferenciada (barra de referencia de 50µm). Fuente: *Equine embryo transfer: review of developing potential* (T. A. E. Stout, 2006); d) Día 7: Blastocisto expandido de grado 1 (barra de referencia de 50µm). Fuente: *Equine embryo transfer: review of developing potential* (T. A. E. Stout, 2006).

A continuación en la Tabla 1 podemos observar la variación de tamaño aproximado que va sufriendo el embrión equino en su desarrollo.

Tabla 1. Diámetro de los embriones equinos recuperados del lumen uterino			
Días Pos-ovulación	Número de Embriones	Diámetro embrionario (mm)	
		Promedio	Rango
6	121	0,208	0,132-0,756
7	144	0,406	0,136-1,460
8	142	1,132	0,120-3,980
9	41	2,220	0,730-4,520

Fuente: Adaptado de Squires EL, Cook VM, Voss JL. *Collection and transfer of equine embryos*. Bulletin No. 1. Ft. Collins, CO: Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory, 1985. - CSU -

Los embriones equinos pueden ser recuperados entre los días 6 y 9 pos ovulación, sin embargo los días óptimos para llevar a cabo luego la transferencia embrionaria, son el séptimo y el octavo. En el caso de la congelación del embrión, el día óptimo es el sexto.

Transferencia embrionaria de embriones equinos

Técnica de recuperación y transferencia de embriones

- Metodología de la recuperación del embrión

El lavado uterino transcervical es el método que se utiliza para la recuperación de embriones equinos para la transferencia embrionaria. Considerando el día de ovulación como el día 0, el lavaje se lleva a cabo entre los días 7 y 8 porque el embrión no entra al útero desde el oviducto hasta el día 6-7 (Battut *et al.*, 1997 y 2001). Los días anteriores a éstos, las tasas de recuperación son mucho menores y en los días posteriores, el embrión se torna de un tamaño mayor lo cual lo vuelve más susceptible a daños a consecuencia de su manejo (McKinnon y Squires, 1988; Carnevale *et al.*, 2000). Aunque los embriones son más fáciles de identificar en el 8vo día, la recuperación al 7mo día es preferible ya que el embrión es más chico y por lo tanto menos susceptible a traumas debidos a la recolección y al proceso de transferencia (Blanchard *et al.*, 1998 y 2003). Los embriones no son recuperados en el día 9 porque el porcentaje de transferencia exitosa es generalmente más bajo que para aquellos recuperados en los días 7 u 8 (D. Vanderwall, 2000).

Para comenzar el proceso de lavaje, es importante poner en condiciones a la donante. Ésta es colocada en la manga, con su cola atada y elevada, sus cuartos traseros y la zona del periné son preparados mediante lavado y desinfección teniendo importante cuidado en que sean bien enjuagados y secados para evitar la contaminación del embrión a causa de los residuos de estos productos (Blanchard *et al.*, 2003). Inmediatamente antes del lavado uterino, la donante debe ser examinada por palpación y ecografía transrectal; los ovarios deben ser examinados en busca de cuerpo lúteo, si hay más de uno, hay una mayor posibilidad de embriones múltiples (McKinnon *et al.*, 2011). Una vez lista la yegua, el operador, con su mano y brazo cubiertos por un guante plástico estéril y lubricado con un gel estéril, pasa la punta del catéter (o la sonda) delicadamente a través del cérvix hasta la zona posterior del cuerpo uterino; Blanchard *et al.* (1998, 2003) recomiendan el uso de un catéter de silicona para recuperación embrionaria (con un balón en la punta) de 80 o 150 cm de largo. Luego el balón del catéter se llena con 60-80 cm³ de agua, aire o solución salina estéril y se tracciona hacia atrás, contra el orificio cervical interno, para lograr un correcto sellado entre el cuello y el cuerpo uterino y de esta forma prevenir la pérdida de líquido. 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 - 37° C), conteniendo 1% (v/v) de suero fetal bovino o albúmina de suero bovino para prevenir que el embrión se pegue a la silicona o al plástico del material utilizado (T. A. E. Stout, 2006). El problema de la albúmina, según McKinnon *et al.* (2011), es que tiende a formar burbujas o espuma en la superficie del medio recuperado y por lo tanto dificulta la búsqueda posterior del embrión. Según D. Vanderwall (2000) la solución también debe contener penicilina (100 unidades/ml) y estreptomina (100 µg/ml). El útero es llenado con 1 a 2 litros

de DPBS en cada lavado dejando que éste ingrese por gravedad; su contenedor se conecta al catéter mediante un tubo, y se lo coloca en altura para que la solución fluya. El líquido debe mantenerse en el útero por al menos 3 minutos antes de ser removido. A continuación se le permite al líquido salir y pasar a través de un filtro para embriones con poros de 0,70-0,75 μm ; es importante que el filtro no rebase ni se quede sin líquido para que el embrión recuperado se encuentre siempre bañado en solución y no se reseque; los filtros son ahora diseñados para prevenir ambos problemas. Después del primer lavado el útero es masajeador a través del recto durante los subsiguientes lavados, esto puede ayudar a que el embrión quede suspendido en el medio y a aumentar la recuperación total del líquido. El líquido que pasa por el filtro es recolectado para evaluar cuánto se recuperó; la mayoría (> 90%) del líquido de lavado debería ser recuperado y estar libre de restos celulares o de sangre (D. Vanderwall, 2000), de no ser así, según Blanchard *et al.* (1998, 2003) se pueden administrar 20 UI de oxitocina intravenosa para ayudar a la evacuación del mismo del útero. La recuperación de líquido 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 del catéter (D. Vanderwall, 2000). Mientras existen diferentes tipos de sistemas de lavado en uso, la mayoría de los operadores opta por un sistema cerrado con una pieza Y central, de esta forma el medio de lavado circula hacia el catéter uterino por una línea y, luego de abrir o cerrar los clamps en las líneas correspondientes, el líquido saldrá por otra vía la cual se dirige directamente al filtro (T. A. E. Stout, 2006).

Una vez finalizado el lavado, en el laboratorio, el contenido del filtro es vaciado en una caja de Petri estéril con cuadrícula para proceder a la búsqueda y es enjuagado con DPBS. El líquido recuperado es revisado utilizando una lupa a un aumento de 10x – 25x; debido a su peso relativo, los embriones viables se hundirán al fondo de la placa lo que facilitará su visualización; los embriones de 8 días usualmente se ven a simple vista. Los embriones identificados son aspirados utilizando pajuelas de 0,25 o 0,5 cm^3 unida a una jeringa, pipetas capilares de vidrio de 25 μl , o cualquier otro instrumento adosado a una jeringa, y son transferidos a una pequeña placa para el enjuagado del embrión. Allí es lavado como mínimo por 3 pasajes sucesivos en gotas de 1 ml de medio DPBS con 10% de suero fetal bovino esterilizado según Blanchard *et al.* (1998) por pasaje por filtro de 0,22 μ , con el fin de ayudar a diluir cualquier microorganismo que pudiera haber sido introducido durante la recuperación embrionaria o que se hubiera encontrado con anterioridad en el útero de la donante (T. A. E. Stout, 2006); luego el embrión se coloca en el mismo medio en una placa de Petri para ser evaluado a mayor aumento (40 - 80x) y calificado usando la escala de 1 (excelente) a 4 (pobre): según G. A. Palma (2008) la mayor parte de los procedimientos de evaluación embrionaria tienen en cuenta los rasgos morfológicos como la uniformidad de tamaño celular, la forma del embrión, su color y dimensiones. Según T. A. E. Stout (2006) también se los clasifica por su estado de desarrollo embrionario en mórula tardía, blastocisto temprano o blastocisto expandido.

Cada vez que se tome un embrión con un tipo de estos capilares o pajuelas para su manipulación, 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 debería ser realizado bajo lupa para evitar accidentes (D. Vanderwall, 2000). En todos los casos el material y los medios utilizados deben ser estériles.

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; Blanchard *et al.* (1998) recomiendan que este procedimiento se lleve a cabo dentro de 1 hora luego de la recuperación del embrión, 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 de temperatura rápidos y/o extremos (D. Vanderwall, 2000). A lo largo de toda la evaluación del embrión, es importante que éste sea mantenido tibio (35-38°C) y que los materiales utilizados estén precalentados (D. Morel, 2003).

- *Factores que afectan la recuperación del embrión*

Según Squires *et al.* (1999) los factores que afectan la recuperación embrionaria incluyen: el día de recuperación, el número de ovulaciones, la edad de la donante y la calidad del semen con que fue servida la yegua. Sin embargo el principal factor que afecta a la recuperación es el estado reproductivo de la donante. Las hembras viejas con pobre historia reproductiva, producen menos embriones y a causa de patologías uterinas o del oviducto y al aumento de muertes embrionarias tempranas, se logra una menor recuperación en este tipo de animales. Carnevale *et al.* (1995) reportaron que ovocitos defectuosos provenientes de donantes viejas, son una causa de reducción de fertilidad. Los ovocitos recolectados de donantes mayores a 20 años de edad y transferidos a receptoras jóvenes, resultaron en vesículas embrionarias en 8 de 26 casos contra 11 de 12 preñeces obtenidas de donantes jóvenes (J. Bezard, 1992). En cuanto al semen utilizado, generalmente las donantes inseminadas con semen fresco tienen mayor posibilidad de proveer un embrión que aquellas que lo son con semen congelado (Squires *et al.*, 1999).

- *Metodología de la transferencia del embrión*

La transferencia embrionaria no quirúrgica involucra la deposición del embrión dentro del cuerpo del útero. Para comenzar, el embrión recuperado debe ser colocado en una pipeta de inseminación o en una pajuela de inseminación artificial de 0,25 o 0,5 ml (Blanchard *et al.*, 2003). En cualquiera de los casos, la elección del tamaño de la pajuela o el tipo de pipeta a utilizar, es según la preferencia del operador pero también está influenciada por el tamaño del embrión; un embrión pequeño es

fácil de levantar con una pajuela de 0,25 ml pero uno grande, posiblemente no entre en ese tamaño de pajuela (D. J. Jasko, 2002). En el caso de cargarlo en una pipeta de inseminación, primero debe tomarse una jeringa, cargarla con 5-6 ml de aire y asegurarla correctamente al final de la pipeta; luego el medio y el embrión deben ser cargados, en 0,2-0,4 ml, siguiendo la siguiente secuencia: medio, aire, medio conteniendo al embrión, aire, medio, aire. Este procedimiento de carga minimiza los movimientos del embrión dentro de la pipeta y ayuda a asegurar que el embrión sea descargado en el útero en el momento indicado (Blanchard *et al.*, 2003) ya que la primer columna de medio sirve para lubricar la salida de la pipeta mientras que la tercera asegura la salida del embrión (T. A. E. Stout, 2006).

Para realizar la transferencia, la receptora es colocada en un brete, sedada y luego se prepara el área perineal como fue descrito para la recolección embrionaria. Previo a la transferencia debe ser examinada por palpación y ecografía transrectal: debe presentar buen tono uterino y un cuello uterino bien cerrado lo que indica una concentración de progesterona circulante aceptable; tiene que haber un cuerpo lúteo y preferentemente, algo de desarrollo folicular; la textura del útero debe ser uniforme, sin edema ni fluido (McKinnon *et al.*, 2011). El operador se coloca un guante plástico estéril en el brazo y encima un guante de látex estéril, coloca gel lubricante estéril en el dorso de su mano y sobre la vulva de la yegua. El extremo del instrumento de transferencia (cubierto por una camisa sanitaria estéril) es colocado 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 0,5 cm; en este momento se quita la camisa sanitaria y se procede a adelantar el instrumento hacia la luz del cuerpo uterino (D. Vanderwall, 2000). A continuación el embrión es expulsado lentamente de la pipeta, utilizando el aire precargado en la jeringa (Blanchard *et al.*, 1998). Lo esencial de este procedimiento es asegurar que la pipeta entre al útero sin recoger contaminantes de la vulva o la vagina de la receptora y causando el mínimo trauma posible al canal cervical y al endometrio (T. A. E. Stout, 2006). El embrión puede ser depositado en el cuerpo uterino o en alguno de los cuernos uterinos; para depositar el embrión en el cuerno el instrumento es guiado por palpación transrectal. 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 (D. Vanderwall, 2000).

Por otro lado, si se utiliza una pajuela de inseminación artificial de 0,5 ml, debe utilizarse un tubo flexible uniendo una jeringa de 3 a 6 ml con el extremo de la pajuela que contiene un tapón de algodón y policloruro de vinilo (PVC) en polvo. Se procede a la carga del embrión y del medio mediante la aspiración por medio de la jeringa, respetando el mismo orden que se mencionó para la pipeta, teniendo en cuenta que el tapón debe ser mojado; de esta forma se establece un sellado en el extremo de la pajuela que se encuentra unida a la jeringa (Blanchard *et al.*, 1998 y 2003). A continuación el embrión es depositado en el útero de la misma forma que se explicó anteriormente excepto porque la pajuela es primero colocada en una pistola de inseminación plástica desechable o en una de acero inoxidable reusable; en ambos

casos se utiliza una camisa sanitaria plástica estéril para cubrir los instrumentos de transferencia (D. Vanderwall, 2000).

- *Factores que afectan la transferencia del embrión*

Según T. A. E. Stout (2006) los factores que afectan el éxito de la transferencia embrionaria son principalmente la calidad del embrión, la técnica de transferencia utilizada (depende de la experiencia y el manejo que tenga el operador) y la sincronización entre la donante y la receptora (la cual se tratará más adelante). Dentro de la técnica, las 2 principales causas son la contaminación bacterial del útero dominado por progesterona (W. R. Allen, 2005) y/o los disturbios hormonales iniciados por el exceso de dilatación o manipulación del cérvix y dirigidos por oxitocina (Handler *et al.*, 2003) o por la PGF_{2α} liberada (Kask *et al.*, 1997). Como resultado, muchos operadores tratan a las yeguas con antibióticos sistémicos pre y post transferencia, sin embargo las altas tasas de preñez alcanzadas por operadores experimentados en ausencia de tratamiento antibiótico, sugieren que estos tratamientos son innecesarios si la técnica es llevada a cabo suavemente. Es igualmente posible que la falla de un operador inexperto a la hora de depositar el embrión en la cavidad uterina sea porque la pipeta no ha llegado a avanzar a través de cuello uterino o porque el embrión queda adherido en la pipeta de transferencia y es removida con ella al quitarla. (T. A. E. Stout, 2006)

Manejo de las donantes y receptoras

La transferencia embrionaria comienza normalmente por la sincronización de ovulación de las yeguas donantes con las receptoras, seguido por la inseminación o el servicio de estas donantes. El útero de la donante es comúnmente lavado 7 u 8 días pos ovulación y el embrión recuperado es transferido a la receptora quirúrgica o no quirúrgicamente.

En condiciones ideales (personal con experiencia, uso de donantes, receptoras y padrillos fértiles, entre otras cosas) podría esperarse un porcentaje de recuperación del 50-70 % y un éxito en la transferencia del 50-70 %, resultando un porcentaje total de éxito de preñez del 25-50 % por ciclo (Blanchard *et al.*, 1998 y 2003).

- *Criterios de selección de donantes*

Al hablar de las yeguas, no es lo mismo hacer una selección de donantes que de receptoras; tanto unas como otras, deben poseer distintas características.

Existen diversas causas que pueden llevar a considerar a una yegua como una buena candidata para ser donante, sin embargo para ello primero el animal debe poseer un alto valor ya sea genético, económico, deportivo, etc. Algunas hembras subfértiles pueden ser buenas candidatas: yeguas que quedan preñadas y sufren una temprana muerte embrionaria en forma repetida, yeguas con fibrosis periglandular

endometrial generalizada, distensión glandular quística o quistes endometriales, yeguas con enfermedades cervicales irreparables o aquellas con abortos habituales inexplicables podrían generar descendencia a partir del uso de esta técnica (Blanchard *et al.*, 1998 y 2003).

La transferencia embrionaria también puede ser una opción para aquellas yeguas que paren tarde en la temporada reproductiva. Esta técnica aporta la ventaja de producir preñeces durante ese mismo año permitiéndole a la donante reingresar temprano al siguiente año reproductivo. En aquellos animales que se encuentran en competición, les da la posibilidad de que éstos sigan compitiendo ya que solo es necesario retirarlos por 1 o 2 semanas de las competencias para que den un potrillo (Blanchard *et al.*, 1998 y 2003).

Por último, es necesario realizar un examen completo de evaluación reproductiva de la donante para saber si puede ser usada en un programa de transferencia embrionaria. Si se identifican anomalías que necesitan tratamiento como por ejemplo, una endometritis bacteriana, deben ser tratadas antes de utilizar al animal en el programa (D. Vanderwall, 2000). Debe conocerse también su historia reproductiva y fertilidad, la localización del padrillo o del semen con que será inseminada y la guía de registros de la raza (Squires *et al.*, 1999). Con respecto a este último punto, debe tenerse en cuenta que algunas asociaciones permiten el registro de más de un potrillo por yegua por año mientras que otras no. Incluso en aquellas que sólo permiten el nacimiento de un potrillo por yegua por año, es posible su uso para facilitar la preñez de yeguas jóvenes, antes del tiempo aconsejable (2 años de edad), dándoles la posibilidad a su vez de adelantar el comienzo de su vida reproductiva evitando los problemas causados por una preñez temprana (Camillo *et al.*, 2000). Además, puede ser posible registrar más de un potrillo obtenido por transferencia durante el mismo año si la yegua es cruzada con padrillos de distintas razas y distintos registros de raza (Blanchard *et al.*, 1998 y 2003).

De cualquier forma, la principal consideración a tener en cuenta es que la descendencia del animal sea valiosa, debe tenerse en cuenta cuál es el valor potencial de ese potrillo.

- Criterios de selección de receptoras

La selección y el manejo de la receptora es posiblemente uno de los factores más importantes que afectan el éxito de un programa de transferencia embrionaria. Desde el punto de vista reproductivo, las receptoras deben presentar ciclos estrales normales, estar libres de anomalías uterinas y ováricas así como presencia de líquido o aire en el útero, o presencia de quistes uterinos o tumores ováricos; no deben tener historial de problemas reproductivos (D. Vanderwall, 2000; Squires *et al.*, 1999). A su vez, se requiere que el cuello uterino no esté dañado ni que sea muy tortuoso ya que la imposibilidad de atravesar el cuello uterino o la necesidad de ayudar al paso de la pipeta digitalmente, son las causas más comunes de fracaso a la

hora de lograr una preñez si el operador no tiene la suficiente experiencia o cuando son pocas las receptoras disponibles. El tono uterino y cervical a la hora de la transferencia también son indicadores útiles a tener en cuenta para la elección de la receptora; un pobre tono está asociado con una menor tasa de preñez y por lo tanto, un mayor porcentaje de preñeces no alcanzadas (Carnevale *et al.*, 2000; T. A. E. Stout, 2006). En general se requiere que sea un animal de fertilidad comprobada, al menos una cría, antes de incorporarla al plantel.

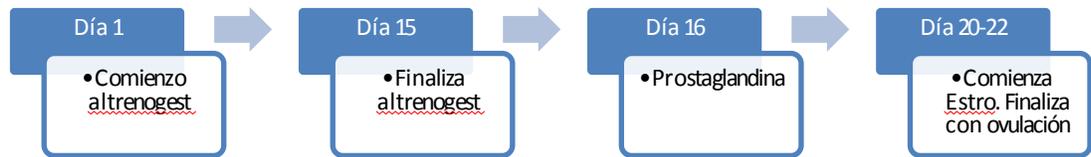
Por otro lado, es importante considerar el *frame* del animal, debe ser similar o mayor que la donante; de no tenerse en cuenta este concepto, puede verse afectado el desarrollo tanto intrauterino como el post natal del feto, pudiendo tener consecuencias como sub o sobredesarrollo los cuales pueden repercutir y mantenerse a lo largo de la vida del animal, sin poder ser revertidos (Allen *et al.*, 2004). También debe ser estudiado el desarrollo muscular, la salud dental y la visión de la receptora, al igual que el buen estado y desarrollo mamario, para proporcionar buena calidad y cantidad de leche al potrillo. Por último debe ser de carácter dócil y fácil de manejar, debe presentar historial de buena lactancia y buena habilidad materna. (Mc Kinnon *et al.*, 2011)

- Sincronización

Para llevar a cabo la transferencia embrionaria es indispensable que las yeguas donante y receptora presenten ovulación sincronizada; lo ideal es que la receptora ovule 1 día antes o hasta 2 días después que la donante (según D. Vanderwall (2000) y T. A. E. Stout (2006) puede ser hasta 3 días después, o sea del +1 al -3). Si uno posee una manada grande de receptoras de la cual se pueden seleccionar yeguas que estén naturalmente sincronizadas, entonces no es necesario utilizar un protocolo hormonal para inducir la sincronización de la ovulación. De no ser así, pueden utilizarse distintos protocolos hormonales pero en cualquiera de los casos, los productos deben ser administrados a las yeguas receptoras, 1 día después de aplicadas a las donantes. Por otro lado, también es recomendable realizar la sincronización de la yegua donante con 2 yeguas receptoras; de esta forma si una sincronización falla, se tiene la otra, y además se proveen 2 receptoras en el caso de recuperar embriones mellizos. (Blanchard *et al.*, 1998 y 2003)

Pueden usarse varios procedimientos para lograr la sincronización de las hembras en los programas, entre los cuales se incluyen (i) los progestágenos (altrenogest), (ii) PGF_{2α} o uno de sus análogos (G. A. Palma, 2008) y (iii) progesterona y estradiol-17β (Blanchard *et al.*, 1998 y 2003).

DONANTE



RECEPTORA

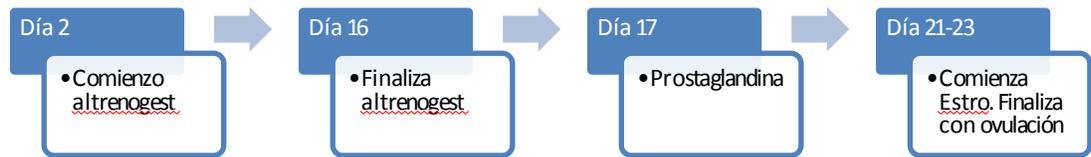


Figura 2: Cronograma de sincronización de donantes y receptoras empleando progestágenos. Fuente: Elaboración propia.

En el caso del uso de progestágenos (Figura 2), éstos pueden darse a las yeguas para alargar la fase lútea de su ciclo de forma artificial (Blanchard *et al.*, 1998, 2003). Comúnmente se administra altrenogest (vía oral) a todas las yeguas por 14-15 días; considerando, en el caso de las donantes, el día 15 como el último día de aplicación, se procede el día 16 a hacer la aplicación de prostaglandina para inducir la luteólisis de cualquier cuerpo lúteo retenido (Blanchard *et al.*, 2003 y Palma, 2008). En el caso de las receptoras, el tratamiento es igual, teniendo en cuenta que, cómo se dijo antes, el tratamiento se lleva a cabo 1 día después. Luego de finalizado este tratamiento se espera que tanto donantes como receptoras entren en celo a los 4-6 días de la inyección de prostaglandina. Según G. A. Palma (2008) tan pronto como se identifique el fin del celo, ya sea en la donante o en la receptora, la otra puede ser inducida a ovular utilizando gonadotrofina coriónica humana (hCG). Un inconveniente que presenta este tratamiento es que los folículos ováricos de las yeguas no están uniformemente regulados y por lo tanto, el intervalo desde la terminación del tratamiento hasta la ovulación, es variable entre yeguas tratadas de la misma manera. (Blanchard *et al.*, 1998, 2003)

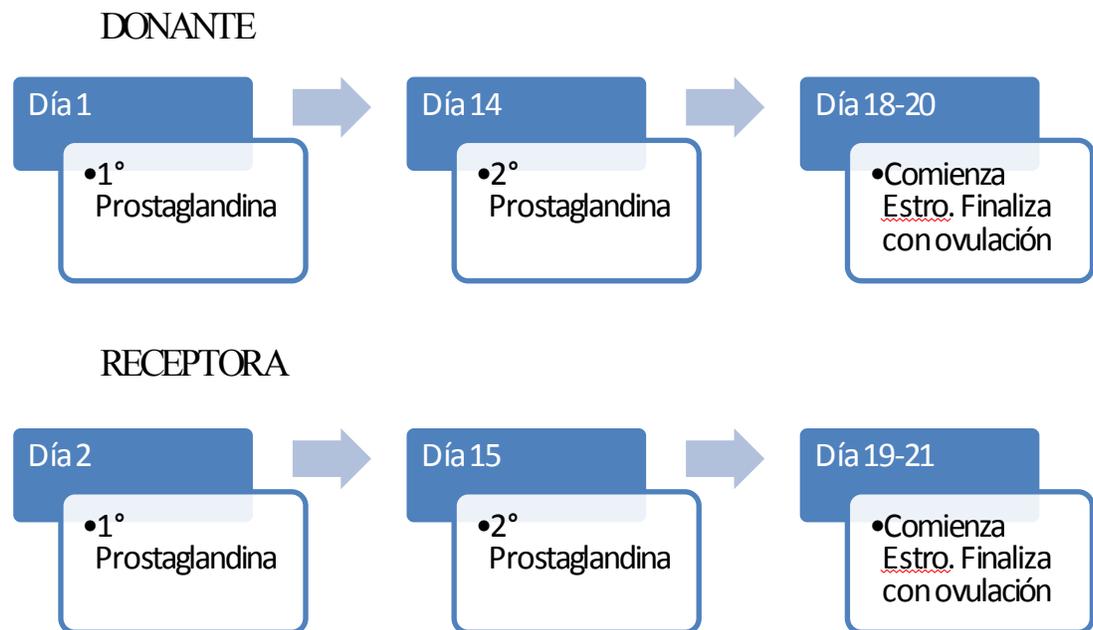


Figura 3: Cronograma de sincronización de donantes y receptoras empleando prostaglandina. Fuente: Elaboración propia.

Blanchard *et al.* (1998, 2003) proponen que las prostaglandinas (Figura 3) son comúnmente administradas 2 veces, con una separación entre aplicaciones de 14 días, realizando la aplicación en la receptora, 1 día después que en la donante. Se espera que las yeguas presenten celo a los 4-6 días de la inyección de prostaglandina y, al igual que con el altrenogest, la ovulación es inducida con hCG en la donante o en la receptora sobre la base del fin del estro de cualquiera de las yeguas (G. A. Palma, 2008). Las prostaglandinas sólo inducen la luteólisis cuando se encuentra presente un cuerpo lúteo maduro y funcional, por lo tanto existe la posibilidad de realizar una única aplicación a donantes y receptoras, siempre y cuando se sepa con seguridad que todas ellas se encuentran en medio de su período de diestro. Para asegurar tasas similares de desarrollo folicular, es ideal que las yeguas que reciben la inyección tengan folículos de tamaños similares (Blanchard *et al.*, 1998 y 2003).

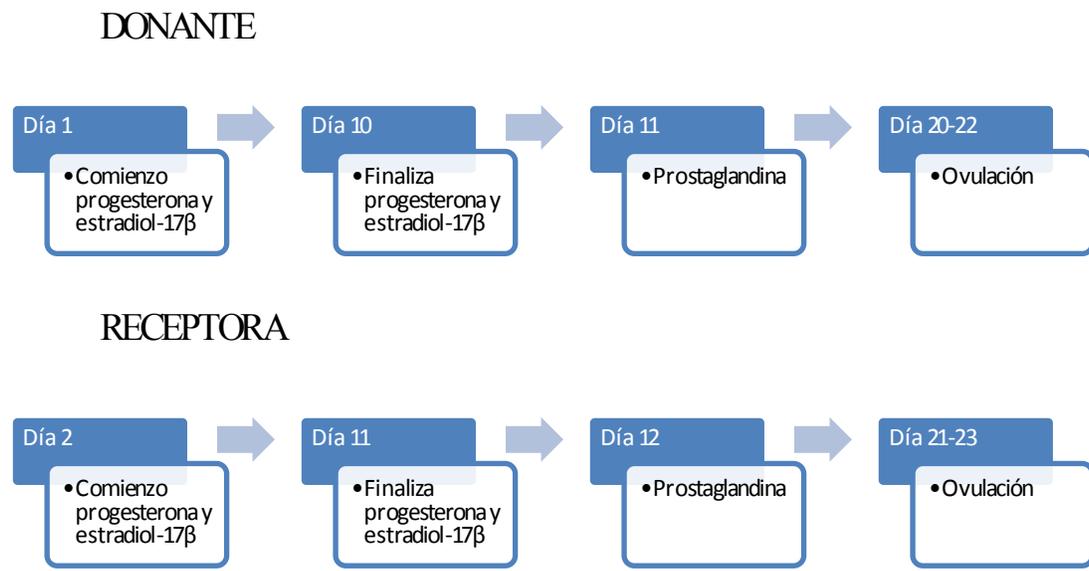


Figura 4: Cronograma de sincronización de donantes y receptoras empleando progesterona y estradiol-17β. Fuente: Elaboración propia.

La sincronización mediante el uso de progesterona y estradiol-17β (Figura 4) es la más efectiva hasta el momento ya que este tratamiento inhibe el desarrollo folicular más uniformemente que el uso de progesterona sola. La progesterona (150 mg) y el estradiol-17β (10 mg) en aceite son administradas intramuscularmente a diario durante 10 días y, al igual que en los casos anteriores, se aplica prostaglandina en el último día de tratamiento. Si además, se aplica hCG cuando se detecta un folículo de 35 mm, aproximadamente el 70-75% de las yeguas van a ovular a los 10-12 días luego de finalizado el tratamiento. La incorporación del estradiol-17β en el tratamiento presentó menor variación en la sincronización de las ovulaciones y promovió el mejor comportamiento del estro post tratamiento. (Blanchard *et al.*, 1998 y 2003)

Si una receptora ovula más de 3 días después de la donante, es aconsejable administrarle progesterona en aceite (300 mg/día) comenzando el día en que ocurre la ovulación. Este tratamiento puede utilizarse para salvar a la receptora en ese ciclo, en el caso de que no se posea otra receptora ovulando sincronizada con la donante. Esta yegua debe mantenerse con el tratamiento de progesterona por al menos 5 días, o hasta que el cuerpo lúteo de la yegua se convierta en completamente funcional. La suplementación con progesterona puede llegar a ser necesaria hasta los 100-150 días de gestación. (Blanchard *et al.*, 2003)

El manejo de la donante incluye el recelo (retajeo) para monitorear la conducta reproductiva y la palpación rectal y ecografía para monitorear la actividad folicular durante el ciclo estral. Durante el celo, la donante es examinada diariamente para evaluar el crecimiento folicular que permite saber el momento óptimo del

servicio o de la inseminación con semen fresco, refrigerado o congelado. La ovulación, como se dijo antes, es inducida utilizando hCG (5 UI/kg. Endovenosa o Intramuscular) o también puede hacerse con la aplicación de agonistas de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH). Se debe recordar que como se dijo con anterioridad, el día de la ovulación es detectado y designado como Día 0. En el caso de las receptoras, también son examinadas diariamente por palpación rectal y ecografía para monitorear el crecimiento folicular y detectar la ovulación (D. Vanderwall, 2000)

Criopreservación de embriones equinos

Refrigeración

Uno de los mayores avances en la tecnología de transferencia embrionaria equina en los últimos años ha sido la posibilidad de enfriar y almacenar embriones a 5° C; este procedimiento habilita la posibilidad de transportar los embriones a los centros donde se encuentran las yeguas receptoras. Según McKinnon *et al.* (2011) las principales ventajas del enfriamiento y transporte de embriones son:

- Las donantes pueden mantenerse y ser manejadas en el lugar mientras que el transporte es necesario solamente en el caso de la recuperación de un embrión;
- El costo de transporte de un embrión es significativamente menor al de la yegua;
- Tener las receptoras en un centro especializado elimina la necesidad de mantener una manada de receptoras en la granja de crianza; las receptoras son generalmente mejor manejadas por personal experimentado;
- El servicio de transferencia embrionaria se encuentra más al alcance de los dueños de las yeguas;
- Las tasas de preñez alcanzadas son generalmente mejores en centros de transferencia embrionaria con personal experimentado.

- Metodología de la refrigeración del embrión

Los embriones recuperados son refrigerados y transportados utilizando el método desarrollado por Carnevale *et al.* (1987) el cual utiliza el medio F-10 de Ham como medio de mantenimiento y refrigeración; éste es previamente gaseado utilizando una mezcla de gases de 90% N₂, 5% O₂, y 5% CO₂, durante 3 a 5 minutos, y siendo posteriormente suplementado con 10% (v/v) suero fetal bovino, penicilina (100 unidades/ml) y estreptomocina (100 µg/ml). Según McKinnon *et al.* (2011) los pasos para el empaquetado del embrión son:

1. El medio F-10 de Ham se calienta a 37° C.
2. Se llena el tubo de plástico de 5 ml con 4,5 ml aproximadamente de medio previamente esterilizado por filtrado.
3. Se transfiere el embrión (luego de ser lavado como mínimo en 3 o 4 gotas de medio) al tubo de plástico. Se enjuaga la pajuela usada para la transferencia y se observa el medio de enjuague bajo microscopio para asegurarse que el embrión no haya quedado en él.
4. Se agrega más medio al tubo hasta completar los 5 ml, se coloca el tapón a presión y se envuelve el tubo en parafilm.
5. Se llena un tubo de centrifuga de 50 ml con medio F-10 de Ham (no filtrado) y se coloca dentro el tubo de 5 ml conteniendo el embrión.
6. La tapa del tubo de 50 ml se coloca tratando de eliminar la mayor parte de aire posible y luego también se envuelve en parafilm.
7. El embrión ya envasado se coloca en un Equitainer (unidad de refrigeración pasiva) que enfría lentamente al embrión hasta 5° C.
8. Se acompaña con la documentación correspondiente incluyendo la descripción del embrión.

En estas condiciones el embrión puede mantenerse viable como mínimo 24 horas, tiempo durante el cual puede ser transportado en forma urgente al centro de transferencia embrionaria (D. Vanderwall, 2000). A modo de ejemplo, a continuación se muestra la figura de un embrión fresco de 7,5 días y uno enfriado de 8 días (Figura 5); en la figura (a) se observa un embrión recuperado en estado natural y se nota la diferencia con la figura (b) en la cual se observa que el embrión sufre una leve contracción o deshidratación a causa del enfriado. En esta última también se hace visible la cápsula que rodea al embrión.

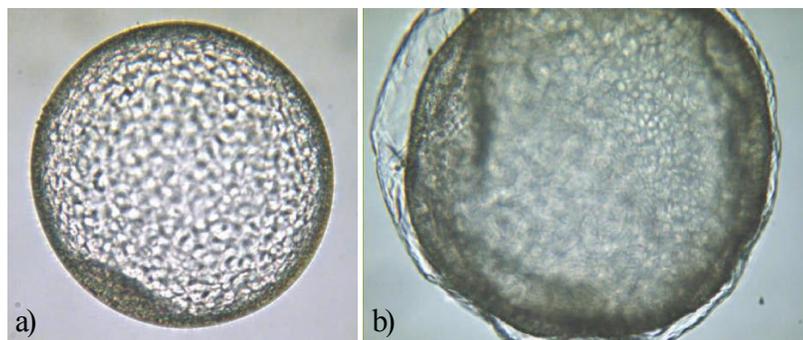


Figura 5: (a) Blastocisto expandido fresco de 7,5 días, previo a la transferencia. (b) Blastocisto expandido enfriado de 8 días, exhibiendo la contracción leve o deshidratación. La cápsula que rodea el embrión es visible. Fuente: McKinnon *et al.* (2011)

El modo de recepción y manipulación de un embrión enviado, según McKinnon *et al.* (2011) es:

1. Se abre el contenedor en un espacio limpio de un laboratorio y se revisa la documentación.
2. Se debe tener medio disponible para el lavado del embrión y el enjuague del tubo plástico.
3. Se abre el tubo de centrifuga y se retira el tubo de 5 ml que contiene al embrión.
4. Suavemente, se invierte el tubo de 5 ml varias veces.
5. Se remueve la tapa del tubo, se apoya boca arriba y se le colocan varias gotas de medio en su interior.
6. Se coloca el contenido del tubo de 5 ml en una placa de Petri estéril.
7. Se colocan varias gotas de medio al tubo y se deja a un lado.
8. Se revisa la placa en busca del embrión.
9. En el caso de no encontrarlo, se enjuaga la tapa y el tubo con medio varias veces ya que ocasionalmente el embrión puede haberse quedado pegado allí.
10. Se lava el embrión a través de por lo menos 3 o 4 gotas de medio previo a la transferencia. Lo ideal es que el medio utilizado aquí sea el mismo que aquel usado para el enfriamiento (F-10 de Ham).

- Comparación del proceso de Refrigeración vs Transferencia embrionaria

Carney *et al.* (1991) reportaron que no hay diferencias significativas en las tasas de preñez entre embriones enfriados y transportados y embriones frescos e inmediatamente transferidos; por otro lado, Carnevale *et al.* (2000) reportaron que la incidencia de las pérdidas embrionarias no son diferentes entre los embriones enfriados y aquellos que fueron transferidos frescos. Con respecto a esto, en su estudio, luego de analizar la transferencia de 622 embriones, McKinnon *et al.* (2011) muestran que no encontraron diferencias en la tasa de preñez a los 16 días entre los embriones de grado 1 que fueron transferidos frescos (79,5%) y los que fueron transferidos luego de ser transportados a 5°C (77,4% y 75% para los transferidos el mismo día y aquellos que fueron transportados durante la noche, respectivamente). Sí se observó una disminución en la preñez a medida que el grado de los embriones era peor. No se encontraron diferencias significativas en la pérdida de preñez entre los días 16 y 50 para embriones transferidos frescos (13,1%) y aquellos enfriados y luego transferidos el mismo día o luego del transporte nocturno (9,5% y 0% respectivamente).

Varios investigadores han notado que los embriones de mayor tamaño toleran mejor el proceso de enfriamiento que los embriones de menor tamaño (McKinnon *et al.*, 2011). Carney *et al.* (1991) reportaron que las transferencias de embriones pequeños resultaron en menores porcentajes de preñez en comparación con aquellos

de mayor tamaño cuando la información de los embriones frescos y los enfriados fueron combinados. La transferencia de 22 embriones enfriados de $\leq 250 \mu\text{m}$ de diámetro resultaron en 59 % de preñez mientras que la transferencia de 105 embriones de diámetro $>250 \mu\text{m}$ resultaron en $\geq 80\%$ de preñez. Por otro lado, Moussa *et al.* (2003, 2004) notaron que embriones $>400 \mu\text{m}$ pueden tener una mayor viabilidad que aquellos $<400 \mu\text{m}$ luego de 24 horas de enfriamiento, basados en un número promedio de células muertas/ mm^2 para cada categoría de tamaño de embrión.

Según Squires *et al.* (1999) el transporte de embriones es comúnmente utilizado en Estados Unidos pero no en Europa, Australia o América del Sur, posiblemente por la proximidad de los caballos.

Criopreservación

El único medio para preservar un embrión a largo plazo, es la criopreservación. Ésta permite disociar tanto el tiempo como el lugar de la recolección de embriones y la transferencia de los mismos. Sus ventajas incluyen la habilidad de importar y exportar embriones equinos a lo largo de todo el mundo, de tener un banco de material genético de hembras valiosas y de disminuir el costo de las transferencias mediante la reducción del número de receptoras que deben ser mantenidas (Hudson *et al.*, 2006).

La primera preñez lograda a partir de un embrión equino congelado fue en 1981 aunque abortó antes de término; el primer nacimiento fue reportado en 1982 por Yamamoto *et al.*

Los dos métodos, el congelamiento y la vitrificación, parecen permitir la criopreservación solamente de embriones pequeños (diámetro $<300 \mu\text{m}$). Las desventajas en el proceso de congelamiento lento son que el control del enfriamiento requiere tiempo y equipo especializado mientras que la vitrificación, es un procedimiento rápido que requiere tener habilidad para la movilización de embriones en altas concentraciones de soluciones crioprotectoras en el momento preciso y para cargarlos luego en las pajuelas con la cantidad exacta de cada solución (McKinnon *et al.*, 2011)

- Congelamiento

El congelamiento consta del uso de concentraciones relativamente bajas de crioprotectores y rangos controlados de enfriamiento para deshidratar las células durante la congelación y así prevenir la cristalización de hielo intracelular. El hielo intracelular daña tanto las membranas como las organelas y esta se cree que es una de las principales causas del descenso en la supervivencia de los embriones (Oberstein *et al.*, 2000).

Metodología del congelamiento del embrión

Según McKinnon *et al.* (2011) los pasos para llevar a cabo el congelamiento son:

1. El glicerol, el crioprotector usado con mayor frecuencia, se incorpora a temperatura ambiente en 1 a 5 pasos, cada uno de 5 a 20 min, de concentraciones en aumento hasta una concentración final de 10% v/v (~1.3 M) o 1.5 M.
2. Luego se toma al embrión en 50 µl, en una pajuela de 0,25 ml.
3. Se enfría la pajuela de temperatura ambiente a -6 o -7°C en aproximadamente 3°C/min.
4. Luego de la inducción a la formación de hielo a -6 o -7°C, la pajuela se lleva en 0,3°C-0,5°C/min hasta -30°C, -33°C o -35°C; se sumerge y se almacena en nitrógeno líquido.
5. Para el descongelado, la pajuela se pone en agua a 37°C por 30 a 60 segundos y se recupera el embrión.
6. El crioprotector se diluye mediante el pasaje del embrión a través de sucesivos baños con concentraciones decrecientes desde 10% hasta 0% o desde 1,5 M a 0 M, en 4-6 pasos de 5 a 10 minutos.

El almacenaje en nitrógeno líquido se presume que es indefinido (Skidmore *et al.*, 1990). Previo a la transferencia, durante el descongelado, es posible tener que hacer el agregado de sacarosa para ayudar a la rehidratación y así prevenir las alteraciones osmóticas del procedimiento (Morel, 2003).

- Vitrificación

Una alternativa al enfriamiento convencional lento es el procedimiento ultra rápido conocido como vitrificación. Ésta consiste en un corto tiempo de incubación en altas concentraciones de crioprotectores seguido por sumergido directo en nitrógeno líquido para prevenir la formación de cristales de hielo (Araujo *et al.*, 2010). En los últimos tiempos este proceso ha recibido mucha atención ya que es simple, se logra en poco tiempo y no requiere equipos caros. Además, la dilución de los crioprotectores puede ocurrir en la pajuela y por lo tanto el embrión puede ser transferido a la receptora sin ser removido de esta misma (Hudson *et al.*, 2006).

Metodología de la vitrificación del embrión

Según Araujo *et al.* (2010) los pasos a seguir para llevar a cabo la vitrificación son:

1. Las soluciones vitrificantes se colocan a temperatura ambiente en un platillo con 4 pocillos y el embrión se traslada del 1 al 3 permaneciendo 5 minutos en los 2 lros y 45 segundos en el 3ro.

2. Del 3er pocillo se carga en el centro de una pajuela de 0,25 ml, separado por 2 burbujas de aire del diluyente.
3. Se sella la pajuela de ambos lados.
4. Se coloca la pajuela en una copa de plástico refrigerada, rodeada por nitrógeno líquido durante 1 minuto (según Hudson *et al.* (2006) esto permite que el nitrógeno líquido rodee a la copa y se produzca una mezcla de aire frío y vapor de nitrógeno alrededor de la pajuela a una temperatura de -190°C)
5. Se sumerge la pajuela en el nitrógeno líquido y se almacena.
6. Para el descongelado, la pajuela se mantiene en el aire por 10 segundos y luego se sumerge en un baño de agua a 22°C por otros 10 segundos.
7. La pajuela se sacude 5-7 veces para asegurar la mezcla de las soluciones.

A la hora de llevar a cabo la vitrificación, Hudson *et al.* (2006) utilizaron una primera solución vitrificante (VS-1) que contenía 1,5 M de glicerol, una VS-2 que contenía 1,4 M de glicerol y 3,6 M de etilenglicol y una VS-3 que consistía en 3,4 M de glicerol y 4,6 M de etilenglicol (donde el embrión pasó 50-60 segundos). Ellos cargaron el embrión en la pajuela de la siguiente manera: 90 µl de diluyente que contaba de 0,5 M de galactosa con solución salina fosfatada, una burbuja de aire de 5-10 µl, 30 µl de VS-3 conteniendo al embrión, una segunda burbuja de aire y por último, otros 90 µl del diluyente. De esta manera, ellos obtuvieron un porcentaje general de preñez para embriones vitrificados del 70%.

En la especie equina, según Castanheira *et al.* (2004), el agregado de crioprotectores no permeables (macromoléculas y azúcares) a las soluciones vitrificantes que contienen etilenglicol, mejora la morfología y el porcentaje de células viables luego del descongelado. Araujo *et al.* (2010) vitrificaron mórulas y blastocistos tempranos en su estudio, logrando tasas de preñez similares a las descritas en la bibliografía y demostraron que este procedimiento puede ser utilizado con éxito bajo condiciones de campo en operaciones comerciales.

- Dificultades en la criopreservación

Los embriones equinos parecen tolerar mejor el proceso de congelación y descongelación cuando se encuentran en un estadio de mórula/blastocisto temprano y con un diámetro ≤ 300 µm. Aunque los embriones recuperados en los días 6 a 6,5 están en el rango de tamaño aceptable para la criopreservación, las tasas de recuperación de éstos son mucho menores a aquellas que se obtienen en los días 7 a 8. Por desgracia, los embriones que se recuperan en el día 7 u 8 de la gestación son de 400 a 1200 µm de diámetro y al ser más grandes son menos tolerantes a los procesos de congelación y descongelación (McKinnon *et al.*, 2011).

Según McKinnon *et al.* (2011) los blastocistos y blastocistos tempranos equinos son mucho más grandes y están compuestos por un mayor número de células

que los embriones de otras especies en las mismas etapas de desarrollo. A su vez, estas células contienen importante cantidad de grandes vesículas y copiosos lípidos almacenados en gotas de varios tamaños (Bruyas *et al.*, 1993 y Flood *et al.*, 1992). Este gran tamaño podría ser causante de su alta sensibilidad a la criopreservación y de este modo explicar por qué las criopreservaciones exitosas se obtuvieron sólo con los embriones más pequeños (McKinnon *et al.*, 2011).

El blastocisto equino se expande rápidamente durante sus primeros días en el útero, pasando de un diámetro medio de 200 μm en el día 6 después de la ovulación, a 400 μm en el día 7, y más de 800 μm en el Día 8 (Betteridge *et al.*, 1982). A partir de la entrada del embrión al útero, éste comienza a ser cubierto por la cápsula elástica. Según Choi *et al.* (2011) la dificultad en la criopreservación está relacionada con la presencia de esta cápsula, con el estado de diferenciación del embrión, con la gran cantidad de líquido dentro del blastocele, o simplemente con el tamaño total del embrión. Algunos estudios (Bruyas *et al.*, 2000 y Legrand *et al.*, 1999) han sugerido que la cápsula puede impedir el acceso apropiado de los crioprotectores al embrión resultando en lesiones osmóticas en las células embrionarias y/o insuficiente crioprotección debido a una concentración inadecuada de crioprotectores dentro de los embriones.

En cuanto a los embriones de diámetro $>300 \mu\text{m}$, Choi *et al.* (2011) han llevado a cabo un estudio en el cual pudieron concluir que los blastocistos equinos expandidos, hasta un diámetro de 650 μm , pueden producir preñeces normales luego de su criopreservación usando técnicas de colapso del blastocele antes de la vitrificación. Basados en las altas tasas de preñez asociadas con una mayor pérdida de líquido del blastocele encontrado en sus estudios sobre la viabilidad de blastocistos de diámetro $\geq 300 \mu\text{m}$ luego de la biopsia y vitrificación vs la viabilidad de los embriones sometidos a biopsia de trofoblasto y a una suave aspiración de líquido del blastocele desde la periferia del trofoblasto antes de la vitrificación, ellos infirieron que fue una disminución en el volumen, en lugar de sólo la penetración de la cápsula y/o trofoblasto, permitiendo el acceso del crioprotector, lo que le dio soporte a la alta viabilidad después del procedimiento. A pesar de estos resultados, es necesario seguir estudiando este tema para avanzar y lograr implementarlo a nivel comercial.

- Análisis del tema

Según la bibliografía, los resultados obtenidos en procesos de vitrificación son muy variados y hasta muchos de ellos, al no ser los esperados, no son publicados. A continuación se muestra una tabla de resultados a partir de los trabajos publicados desde 1994 a 2007 en la cual se observa claramente la diferencia de éxito entre embriones de diámetro $>300 \mu\text{m}$ obtenidos a partir del día 7 y los embriones de menor tamaño (diámetro $<300 \mu\text{m}$) obtenidos en los días 6-6,5. De todas formas, se estima que estos valores son altos ya que muchas de las experiencias fallidas no han sido publicadas y por lo tanto hay muy poca información al respecto. Según la Dra.

Marina J. Sansiñena, la tasa de preñez para embriones vitrificados se encuentra alrededor del 30%.

Tabla 2. Éxito de preñez según tamaño de embriones vitrificados			
Diámetro embrionario (µm)	Días Pos-ovulación	Nº preñeces logradas/ n° transferencias realizadas	Preñeces logradas/ transferencias realizadas
<300	6-6,5	75/132	56,8%
>300	7-8	6/66	9%

Fuente: Elaboración propia a partir de McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E. and Varner D.D. *Equine Reproduction*, United Kingdom, Wiley-Blackwell, 2nd Edition, 2011, Table 305.4: Results of embryo transfer of vitrified-warmed equine embryos published from 1994 to 2007.

De la lectura de esta tabla 2 se infiere, a pesar de que el resultado de preñeces logradas en embriones de diámetro <300 µm sea de 56,8% o según los datos aportados por la Dra. Marina J. Sansiñena del 30%, valores considerablemente diferentes, que el porcentaje de preñez logrado con embriones de 6-6,5 días supera ampliamente aquel logrado con aquellos de 7-8 días. Por consiguiente la recomendación sería utilizar para el proceso de vitrificación embriones de diámetro <300 µm.

Costo de la transferencia embrionaria y de la criopreservación equina

Teniendo en cuenta que, como dijimos anteriormente, el porcentaje total de éxito de preñez en condiciones ideales de transferencia es de 25-50% por ciclo y que la tasa de preñez para embriones vitrificados se encuentra alrededor del 30% (dato proporcionado por la Dra. Marina J. Sansiñena) podemos estimar que mediante la utilización de la vitrificación como complemento de la transferencia, el porcentaje de preñez logrado por ciclo podría ser mayor. Una cuestión importante a tener en cuenta para incorporar esta práctica es la relación costo/beneficio para lo cual deberían tenerse en cuenta los siguientes datos:

- Hoy en día se pagan entre u\$s 1600 y 2000 por preñez lograda mediante transferencia embrionaria (dato proporcionado por Dr. Eduardo Martínez).
- El costo de la criopreservación es de aproximadamente u\$s 100 por embrión (dato proporcionado por la Ing. P.A. Marina J. Sansiñena).
- El costo de la sincronización de 2 receptoras con 1 donante con prostaglandina y GnRH es de aproximadamente entre u\$s 8 y 10,5 (dato proporcionado por Dr. Eduardo Martínez).

Considerando un costo de u\$s 15 por lavaje (u\$s 10 de sincronización y u\$s 5 más por gastos de lavaje) para las transferencias, un costo de u\$s 105 por lavaje (u\$s 100 de criopreservación y u\$s 5 más por gastos de lavaje) para la vitrificación y un pago promedio de u\$s 1800 por preñez lograda, se confeccionó el siguiente cuadro:

Tabla 3. Costos de transferencia embrionaria y vitrificación.				
	Preñez (%)	Costo por lavaje (u\$s)	Costo por preñez (u\$s)	Ganancia por preñez lograda (u\$s)
Transferencia	50	15	30	1770
Vitrificación	30	105	350	1450

Fuente: Elaboración propia a partir de datos analizados anteriormente.

Teniendo en cuenta el 50% de éxito en las transferencias (condiciones ideales), con un costo aproximado de 30 u\$s por preñez, se estima una ganancia por preñez de 1770 u\$s, lo que demuestra que el costo equivale a casi 2% del precio de la preñez. A su vez, teniendo en cuenta el 30% de éxito en la vitrificación, con un costo aproximado de 105 u\$s, se estima una ganancia de 1450 u\$s por preñez lograda. Se puede observar que este gasto equivale al 19% de la ganancia que se obtendría por cada preñez extra lograda y este dato es solamente el pago relacionado a la preñez, pero también sería interesante tener en cuenta el valor genético, económico, deportivo, etc. que puede llegar a tener ese animal y las ganancias que posteriormente se podrían obtener de él por ejemplo en competición. Por este motivo es que la criopreservación debe verse como la principal solución al problema de la falta de receptoras.

PRÁCTICA A CAMPO

Descripción de instalaciones

El Haras “El Silencio” es un establecimiento situado en la localidad de Santa Lucía, partido de San Pedro, provincia de Buenos Aires. En él se realiza la crianza de caballos Cuarto de Milla y se comenzó a desarrollar la técnica de transferencia embrionaria en el año 2007 como método para aumentar su índice reproductivo, para lo cual se cuenta con un encargado a cargo del manejo de las yeguas, su selección y sincronización, sus 2 colaboradores a cargo del cuidado de los animales y un veterinario a cargo del manejo de laboratorio y la transferencia propiamente dicha.

Para llevar a cabo la práctica de la transferencia embrionaria el campo cuenta con una manga donde se realizan los lavajes sobre las donantes y las posteriores transferencias sobre las receptoras. Ésta se encuentra en muy buen estado y sigue un diagrama como el que se observa a continuación:

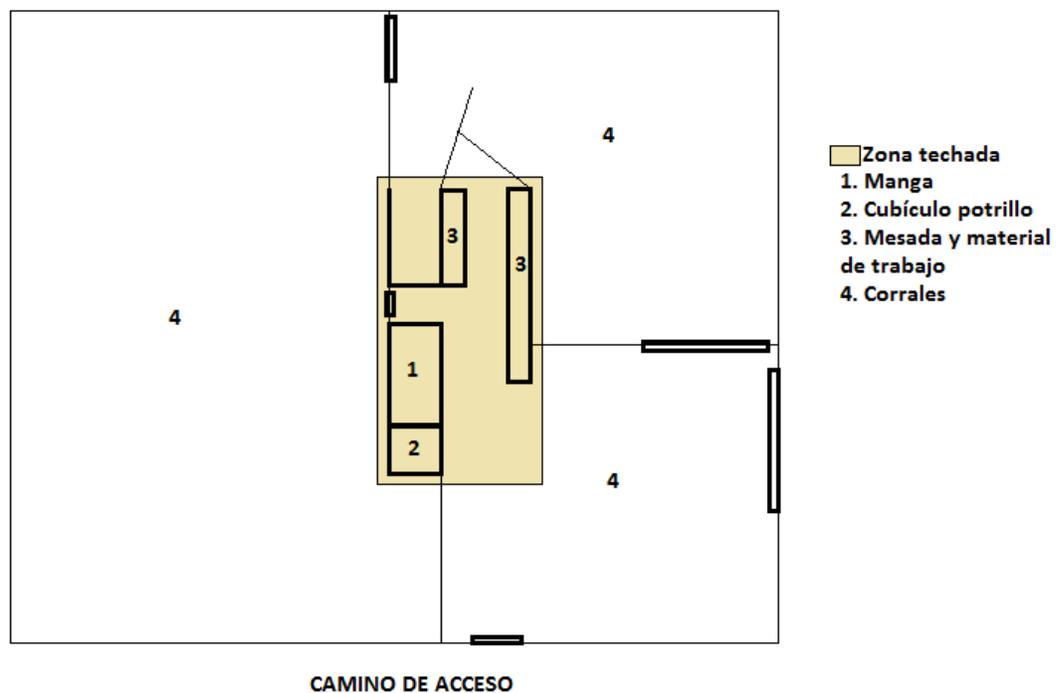


Figura 6: Diagrama de la manga en Haras El Silencio. Fuente: Elaboración propia.

En el diagrama (Figura 6) se muestra la organización de la manga donde el n° 1 es la manga propiamente dicha donde se trabaja con la yegua; el n° 2 es donde se coloca, al trabajar con las receptoras, al potrillo que nació de la transferencia del año anterior mientras se trabaja sobre la yegua, para así mantener su calma; el n° 3 son los

lugares designados a material de trabajo como ser guantes, medicamentos, etc.; y el n° 4 hace referencia a los corrales donde se colocan a los animales pre y post tratamiento. Como se puede observar, toda la zona de la manga se encuentra techada y protegida para poder trabajar inclusive en condiciones adversas de tiempo.

Es importante destacar cuál es el camino de acceso porque por él se circula hacia el laboratorio. Esto es un gran problema que posee el establecimiento: el laboratorio se encuentra a 250 metros aproximadamente de la manga, motivo por el cual, al hacer el manejo del material y de los embriones desde y hacia la manga, todo debe trasladarse en auto o camioneta intentando mantener las condiciones del embrión, lo más estables posible. Es un trabajo que se logra hacer pero que se facilitaría muchísimo el manejo si el laboratorio estuviera más cerca.

El laboratorio en sí se encuentra muy bien equipado y presenta adecuadas condiciones para poder realizar la manipulación de los embriones y el proceso de recuperación de los mismos sin mayores inconvenientes.



Figura 7: a) Laboratorio de trabajo; b) Mesada limpia y lista para trabajar. Fuente: Elaboración propia.

El material de trabajo con el que se cuenta en el laboratorio incluye (Figura 8):

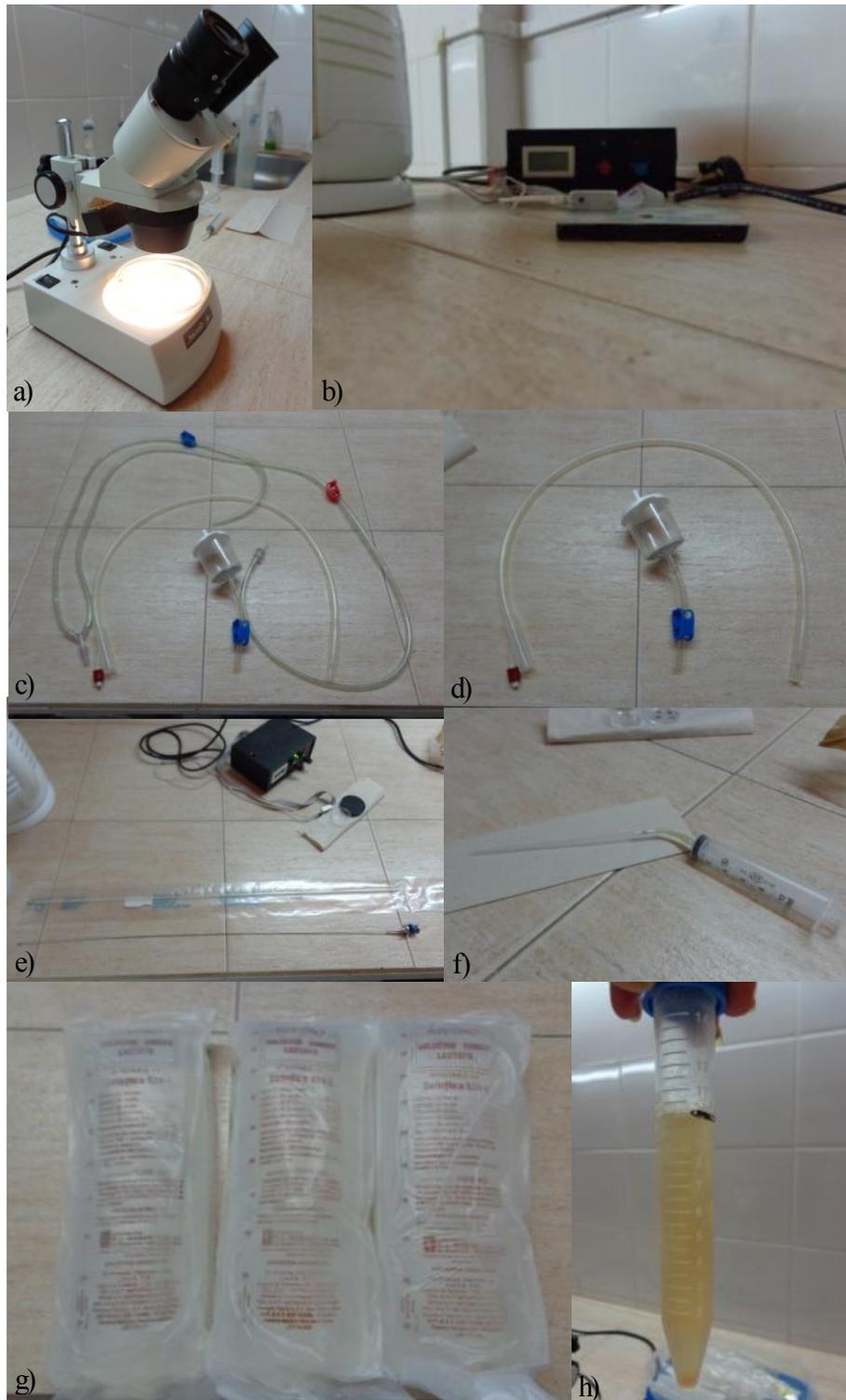


Figura 8: a) Lupa para búsqueda y recuperación del embrión; b) Platina térmica; c) Tubo de silicona de 3 vías, catéter de silicona y filtro de recuperación; d) Filtro y catéter de silicona; e) Vaina estéril y pistola de inseminación de acero inoxidable; f) Jeringa unida a 1 pajuela para la movilización de los embriones; g) Sachets de solución ringer lactato; h) Albúmina bovina. Fuente: Elaboración propia.

Además se cuenta con placas de petri de 2 tamaños, las más grandes con cuadrícula para realizar la revisión del líquido de lavaje recuperado y las más pequeñas para realizar los lavajes del embrión, jeringas para enjuague y remoción de la espuma del filtro y solución salina amortiguada con fosfatos puro o modificado (DPBS) con 1% de albúmina de suero bovino para llevar a cabo el enjuague de los embriones recuperados.

Descripción de manejo de donantes

En lo que respecta a la sincronización de celos, en El Silencio se utiliza el tratamiento con prostaglandina. Para las donantes se sigue el siguiente esquema de trabajo:



Figura 9: Cronograma de tratamiento de donantes de “El Silencio”. Fuente: Elaboración propia.

Las prostaglandinas (Figura 9) son administradas 2 veces, con una separación de 14 días entre aplicaciones, esperando que las yeguas presenten celo a los 4-6 días de la segunda inyección. Al momento del celo, las donantes comienzan a ser seguidas por ecografía siendo ésta realizada al principio 1 vez por día y luego mañana y tarde hasta detectar la ovulación. Cuando se detecta un folículo mayor o igual a 35 mm, se induce la ovulación con GnRH. A continuación la donante es llevada a servicio el cual se realiza por servicio natural o por inseminación artificial.

Inmediatamente antes del lavado uterino, la donante es examinada por palpación y ecografía transrectal; los ovarios son examinados en busca de cuerpo lúteo, si hay más de uno, hay una mayor posibilidad de embriones múltiples lo cual se avisa a la hora del lavaje para tener especial atención en la búsqueda de más de un embrión.

Descripción de procedimiento

Lavaje uterino

Este proceso comienza con la preparación del material en el laboratorio para luego ser llevado a la manga. En primer lugar, se procede a calentar los 3 litros de solución ringer lactato en agua caliente.



Figura 10: Aspiración de líquido del sachet de solución ringer lactato; una jeringa llena de solución y otra lista para la aspiración de espuma. Fuente: Elaboración propia.

Luego se toma uno de los sachets de 1 litro y se aspiran (Figura 10), con una jeringa como se muestra en la foto, 60 ml de solución para dejar en el laboratorio para el posterior lavado del filtro. También se deja una jeringa preparada para la aspiración posterior de espuma.



Figura 11: Albúmina bovina y su agregado a la solución ringer lactato. Fuente: Elaboración propia.

A continuación se toman 3 ml de albúmina bovina y se inyectan en el mismo sachet de ringer (Figura 11) para prevenir que el embrión se pegue a la silicona o al plástico del material utilizado. Éste será el primer sachet en ser conectado y pasado por el sistema de lavaje.



Figura 12: Tubo de silicona de 3 vías conectado al filtro, al sachet y al catéter, listo para llevar a hacer el lavaje. Fuente: Elaboración propia.

Como último paso antes de ir a la manga, se arma el sistema de lavaje (Figura 12). Esto consiste en la unión del tubo de silicona de 3 vías con una Y central con la solución ringer lactato por un lado, con el catéter de silicona que se introducirá dentro del útero de la donante por otro y con el filtro en tercer lugar. Una vez que todo se encuentra conectado, se deja circular un poco de solución por el sistema para corroborar que este funciona bien y que se encuentra correctamente conectado.

Para comenzar el proceso de lavaje, la donante es llevada a la manga, su cola es elevada y atada y sus cuartos traseros, junto a la zona del periné, son lavados y secados para evitar la contaminación del embrión. Una vez lista, el encargado cubre su mano y brazo con un guante plástico, éste es lubricado con gel, y entonces pasa la punta del catéter delicadamente a través del cérvix hasta la zona posterior del cuerpo uterino. A continuación, se carga una jeringa con 60-80 cm³ de aire (según el tamaño del útero de la yegua) y se procede a llenar el balón del catéter el cual, al ser traccionado hacia atrás, sella el orificio cervical interno y previene la pérdida de líquido. Una vez colocado el catéter, se comienza con el lavado propiamente dicho, se abre el clamp de la vía que proviene de la solución ringer (mientras los otros 2 permanecen cerrados) y se llena el útero con 1 litro aproximadamente de líquido el cual ingresa por gravedad. Luego se cierra esa vía y se abre aquella que lleva al filtro permitiendo que el líquido pase por él y que se recupere a su vez en una probeta para así tener un control de la cantidad de solución que sale (recordemos que es importante al finalizar el lavado que todo o la gran mayoría del líquido sea recuperado para no producir una infección en la donante al permanecer en el útero). Es importante controlar que el filtro no rebase ni se quede sin líquido para que el embrión recuperado se encuentre siempre bañado en solución y no se reseque. Este proceso de entrada y salida de la solución del útero se repite 2 veces más. En estas repeticiones el útero es masajeadó a través del recto lo cual ayuda a que el embrión quede suspendido en el medio y que el total del líquido pueda ser recuperado. Al finalizar el pasaje de líquido, se dejan alrededor de 200 cm³ en el último sachet de solución sin pasar, los cuales se utilizarán para enjuagar internamente el sistema luego de desinflar el balón y quitar el catéter del útero. Una vez finalizado el lavaje, el filtro se lleva al laboratorio.

Recuperación y transferencia del embrión

El filtro llega al laboratorio conectado al tubo de 3 vías (Figura 13), es desacoplado de éste y se procede a enjuagarlo con la solución ringer lactato que se había reservado previamente en una jeringa.



Figura 13: Llegada del filtro al laboratorio y enjuagado del mismo. Fuente: Elaboración propia.

Como se comentó anteriormente, el filtro llega con espuma en la superficie a causa del uso de la albúmina bovina. Esta debe ser removida (Figura 14) para no interferir en el proceso posterior de búsqueda del embrión bajo la lupa.



Figura 14: Filtro antes (a) y después (b) de ser removida la espuma de la superficie. Fuente: Elaboración propia.

El siguiente paso a llevar a cabo es trasvasar el líquido restante del filtro a una placa de petri con cuadrícula para ser analizado bajo la lupa y así poder recuperar el embrión (Figura 15). El foco debe ser hecho en el fondo de la misma ya que por su peso relativo los embriones viables tienden a hundirse. A continuación se muestran algunas fotos como ejemplo de embriones encontrados en la solución de lavado siendo este líquido transparente y limpio.

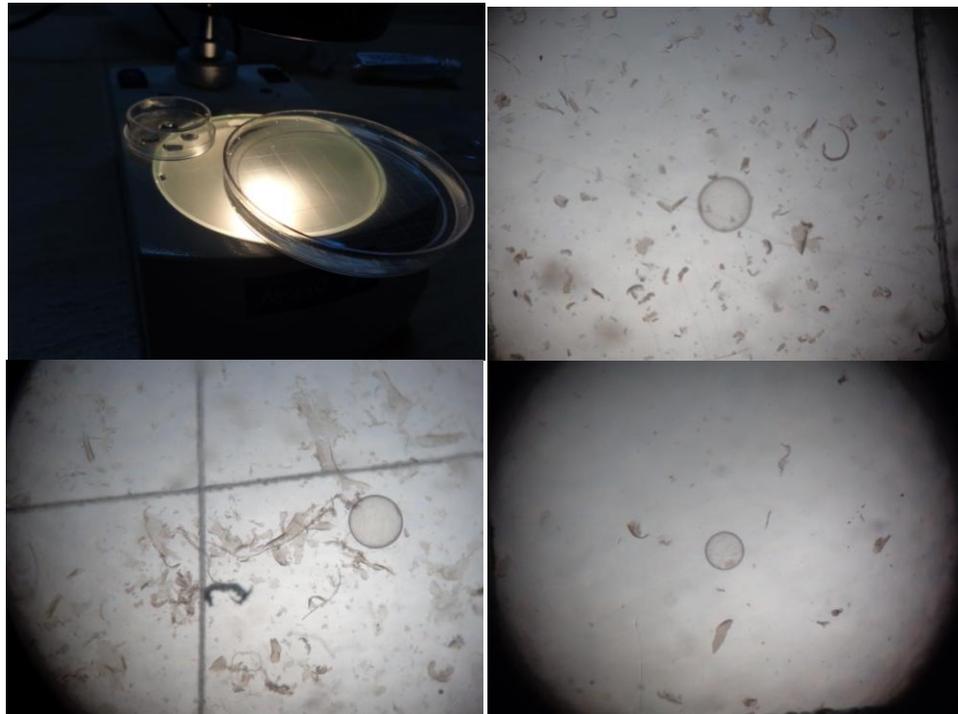


Figura 15: Búsqueda del embrión bajo la lupa y visualización del mismo. Fuente: Elaboración propia.

Si en lugar de este líquido transparente uno encuentra líquido opaco, esto estaría indicando un proceso de endometritis por lo que se da aviso al encargado para que sea tratado y controlado. Si por otro lado se encuentra algo de sangre, esto seguramente esté asociado a un masajeo vigoroso del útero y/o a la manipulación del catéter en la manga.



Figura 16: Solución DPBS con 10% de suero fetal bovino para enjuague y carga de la pajuela. Fuente: Elaboración propia.

El embrión encontrado es aspirado usando una pajuela de 0,5 cm³ unida a una jeringa como se mostró anteriormente y es transferido a una pequeña placa donde se encuentran 4 gotas de solución DPBS (Figura 16) en las cuales se llevará a cabo el enjuague. Como se ve en la imagen anterior, tanto las gotas como la solución que se

utiliza posteriormente para llenar la pajuela de transferencia, se precalientan sobre la platina térmica para así mantener el embrión tibio durante el proceso (35-38°C). El embrión se pasa sucesivamente por las 4 gotas y así es lavado con el fin de ayudar a diluir cualquier microorganismo que pudiera haber sido introducido durante el lavaje de la donante (Figura 17).

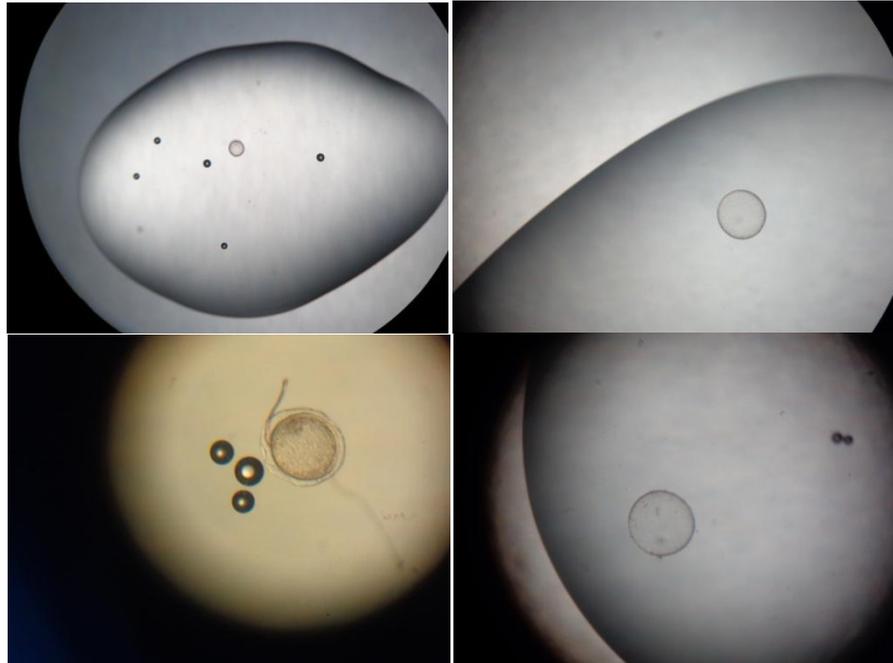


Figura 17: Observación de embriones en las gotas de enjuague. Fuente: Elaboración propia.

El siguiente paso consiste en preparar la pajuela para realizar la transferencia (Figura 18). Se procede al llenado de la misma con la solución precalentada siguiendo el siguiente orden: líquido, aire, líquido, aire, líquido con el embrión, aire, líquido. Si todavía queda lugar, se puede colocar una porción más de líquido como sucede en la pajuela que se observa a continuación. De esta manera, la primera columna de medio sirve para lubricar la salida de la pajuela mientras que las 2 posteriores a la del embrión sirven para asegurar la salida del mismo. Una vez cargada, la pajuela se coloca dentro de la vaina (rodeada a su vez por una camisa sanitaria) y se lleva junto con la pistola de inseminación a la manga.

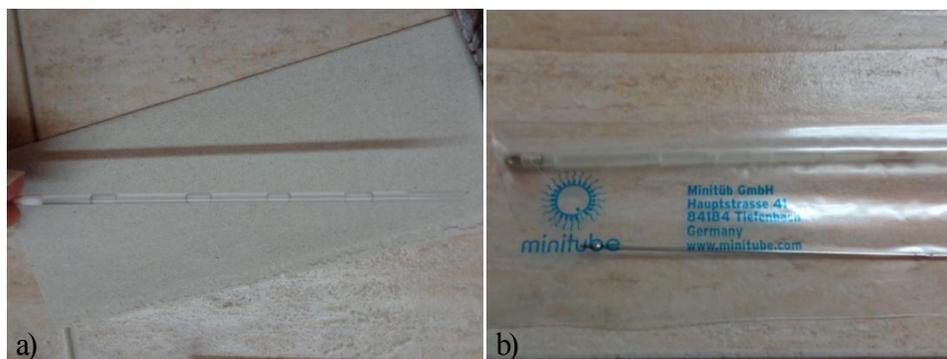


Figura 18: a) pajuela cargada con el embrión; b) Pajuela dentro de la vaina. Fuente: Elaboración propia.

En la manga ya se encuentra la receptora en espera; ésta ovuló el mismo día que la donante, el día anterior (-1, cuerpo lúteo es un día más viejo que el de la donante), o hasta tres días después (+3, es decir, la receptora tiene un cuerpo lúteo tres días más joven que la donante). Al igual que a la donante previo al lavaje, se le eleva y ata la cola y sus cuartos traseros y zona del periné son lavados. El encargado utiliza un guante plástico estéril en el brazo, se coloca gel lubricante estéril en el dorso de su mano y sobre la vulva de la yegua y toma la punta de la vaina en la palma de su mano protegiendo la punta con el pulgar. Introduce la vaina a través de la vagina, la punta de la misma atraviesa el orificio cervical externo y se adelanta hacia la luz del cuerpo uterino. En este momento se ensambla la pistola de inseminación a la vaina y una vez listo se descarga el embrión. Una vez finalizado el proceso, se retira la vaina lentamente.

Por último, la pajuela utilizada se lleva al laboratorio y se corrobora que se haya descargado correctamente (Figura 19).

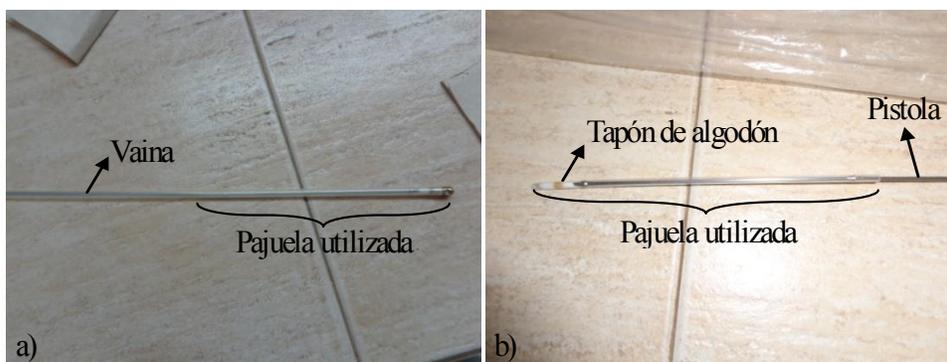


Figura 19: a) Vaina con la pajuela utilizada en su interior; b) Pajuela unida a la pistola luego de ser descargada. Fuente: Elaboración propia.

Resultados

El haras El Silencio aportó los datos de lavajes y transferencias llevadas a cabo desde la temporada 2010-2011 hasta la 2013-2014. A partir de ellas se llevó a cabo el análisis de resultados que a continuación se desarrolla teniendo en cuenta que algunos estudios no se pudieron hacer debido a que estos valores se obtuvieron de una práctica que no fue hecha con el fin de este trabajo sino solo como información interna del establecimiento.

Se analizaron los datos de cada temporada por separado y luego se procedió a la comparación entre temporadas. Con este fin se estableció cuáles son los períodos de cabeza, cuerpo y cola propios del establecimiento:

- Cabeza: desde el comienzo de la temporada reproductiva hasta el 20 de octubre.
- Cuerpo: del 21 de octubre al 15 de enero.
- Cola: del 16 de enero hasta el fin de la temporada reproductiva.

Resultados por temporada

- Temporada 2010-2011

En la temporada 2010-2011 se trabajó con 31 yeguas donantes y se llevaron a cabo 87 lavajes uterinos de los cuales en 49 de ellos (56%) se recuperaron embriones (Gráfico 1).



Gráfico 1: Lavajes de la temporada 2010-2011. Datos obtenidos a partir de la tabla 8 del Anexo. Fuente: Elaboración propia.

De los 49 lavajes recuperados, 5 fueron dobles (se recuperaron 2 embriones en cada lavaje) y 44 fueron simples, lo que representa un 10 y un 90% respectivamente (Gráfico 2).



Gráfico 2: Lavajes recuperados en la temporada 2010-2011. Datos obtenidos a partir de la tabla 8 del Anexo. Fuente: Elaboración propia.

De los 54 embriones recuperados y transferidos 34 generaron preñez (63%), 19 no lo hicieron (35%) y 1 fue abortado (2%), por lo tanto el porcentaje total de éxito de la preñez de esta temporada fue del 39% (Gráfico 3).

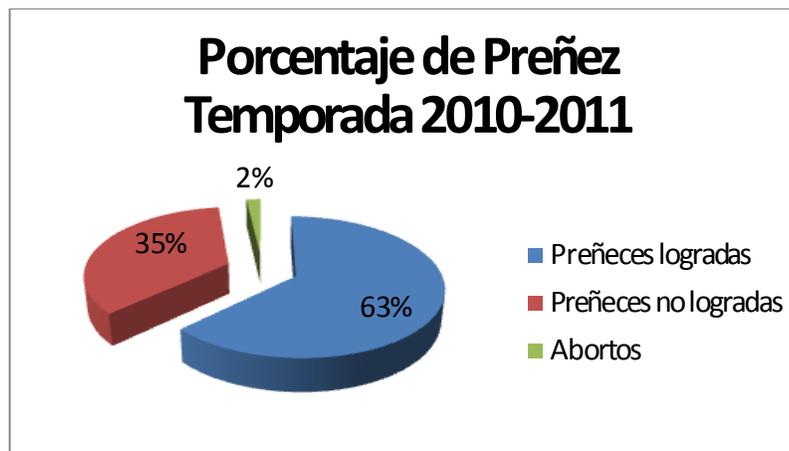


Gráfico 3: Porcentaje de preñez obtenido en la temporada 2010-2011. Datos obtenidos a partir de la tabla 8 del Anexo. Fuente: Elaboración propia.

A continuación se expresa cómo fue la distribución de estos resultados en función de la cantidad de días en los períodos de cabeza (27 días), cuerpo (87 días) y cola (92 días) de la temporada reproductiva (Tabla 4 y Gráfico 4).

	Lavajes realizados	Lavajes recuperados	Embriones recuperados	Preñeces logradas
Cabeza	0,37	0,15	0,15	0,04
Cuerpo	0,70	0,39	0,44	0,32
Cola	0,17	0,12	0,13	0,05

Tabla 4: Resultados obtenidos en función de la cantidad de días por período de la temporada 2010-2011. Fuente: Elaboración propia.

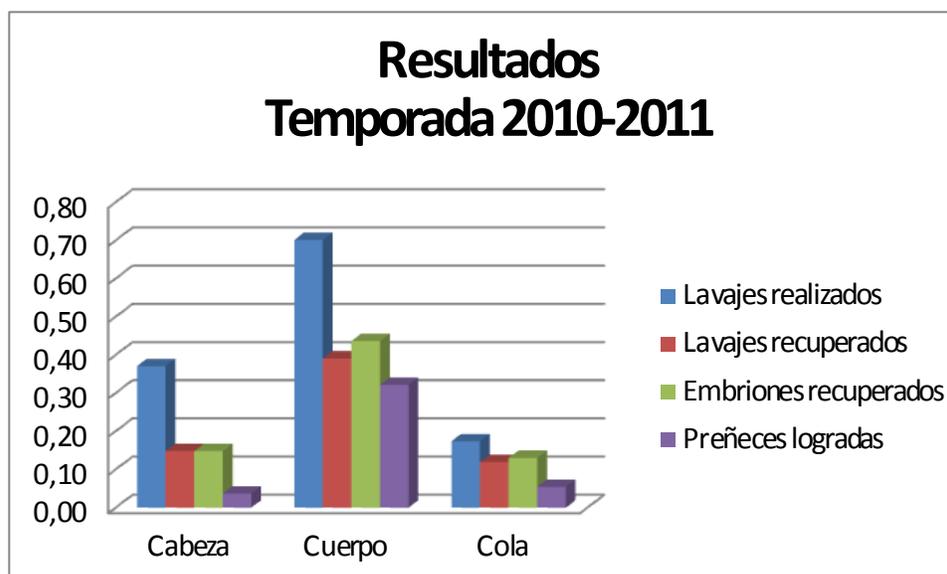


Gráfico 4: Distribución de los resultados en función de la cantidad de días por período, Temporada 2010-2011. Fuente: Elaboración propia.

- Temporada 2011-2012

En la temporada 2011-2012 se trabajó con 27 yeguas donantes y se llevaron a cabo 85 lavajes uterinos de los cuales en 54 de ellos (64%) se recuperaron embriones (Gráfico 5).



Gráfico 5: Lavajes de la temporada 2011-2012. Datos obtenidos a partir de la tabla 9 del Anexo. Fuente: Elaboración propia.

De los 54 lavajes recuperados, 2 fueron múltiples (se recuperaron 2 o más embriones en cada lavaje) y 52 fueron simples, lo que representa un 4 y un 96% respectivamente (Gráfico 6).



Gráfico 6: Lavajes recuperados en la temporada 2011-2012. Datos obtenidos a partir de la tabla 9 del Anexo. Fuente: Elaboración propia.

De los 57 embriones recuperados, 35 generaron preñez (61%), 15 no lo hicieron (26%), 5 abortaron (9%) y 2 fueron vitrificados (4%); estas vitrificaciones se llevaron a cabo en forma de prueba ya que no se disponía de receptoras (Gráfico 7). Según lo comunicado por el establecimiento, estos 2 embriones fueron transferidos en la temporada siguiente (2012-2013) sin lograr preñez, pero no son tenidos en cuenta en este trabajo ya que no se cuenta con el dato preciso de en qué período fue realizada esa transferencia, ni a qué receptora fueron destinados.

El porcentaje total de éxito de la preñez de esta temporada fue del 41%.

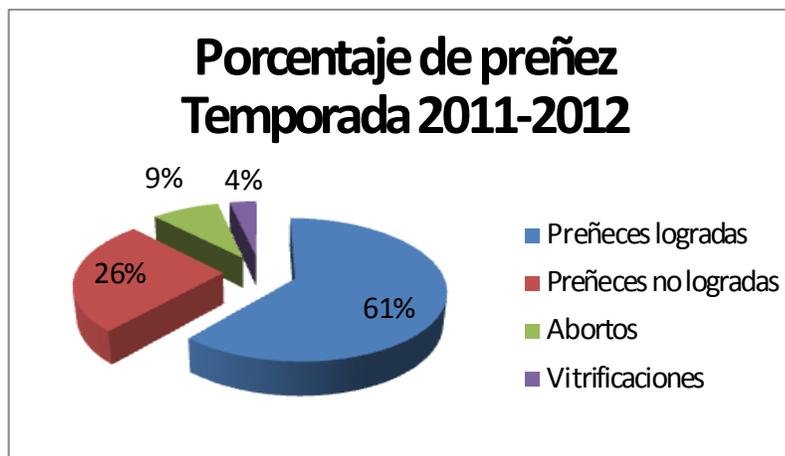


Gráfico 7: Porcentaje de preñez obtenido en la temporada 2011-2012. Datos obtenidos a partir de la tabla 9 del Anexo. Fuente: Elaboración propia.

A continuación se expresa cómo fue la distribución de estos resultados en función de la cantidad de días en los períodos de cabeza (25 días), cuerpo (87 días) y cola (89 días) de la temporada reproductiva (Tabla 5 y Gráfico8).

	Lavajes realizados	Lavajes recuperados	Embriones recuperados	Preñeces logradas
Cabeza	0,28	0,16	0,16	0,12
Cuerpo	0,67	0,43	0,45	0,29
Cola	0,22	0,15	0,16	0,08

Tabla 5: Resultados obtenidos en función de la cantidad de días por período de la temporada 2011-2012. Fuente: Elaboración propia.



Gráfico 8: Distribución de los resultados en función de la cantidad de días por período, Temporada 2011-2012. Fuente: Elaboración propia.

- Temporada 2012-2013

En la temporada 2012-2013 se trabajó con 25 yeguas donantes y se llevaron a cabo 57 lavajes uterinos de los cuales en 34 de ellos (60%) se recuperaron embriones (Gráfico 9).



Gráfico 9: Lavajes de la temporada 2012-2013. Datos obtenidos a partir de la tabla 10 del Anexo. Fuente: Elaboración propia.

De los 34 lavajes recuperados, 4 fueron dobles y 30 fueron simples, lo que representa un 12% y un 88% respectivamente (Gráfico 10).

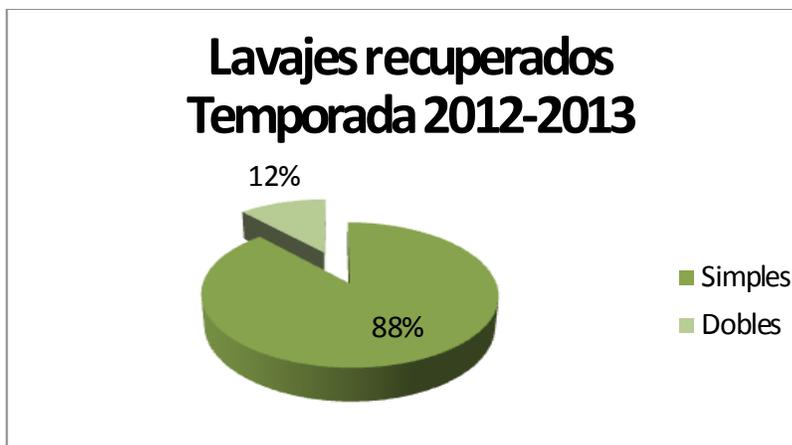


Gráfico 10: Lavajes recuperados en la temporada 2012-2013. Datos obtenidos a partir de la tabla 10 del Anexo. Fuente: Elaboración propia.

De los 38 embriones recuperados y transferidos 27 generaron preñez (71%) y 11 no lo hicieron (29%), por lo tanto el porcentaje total de éxito de la preñez de esta temporada fue del 47%. En este período no se cuenta con el dato de abortos (Gráfico 11).

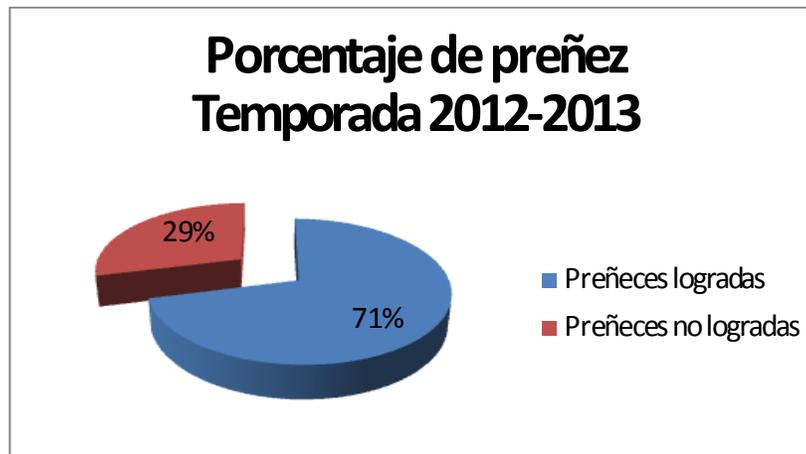


Gráfico 11: Porcentaje de preñez obtenido en la temporada 2012-2013. Datos obtenidos a partir de la tabla 10 del Anexo. Fuente: Elaboración propia.

A continuación se expresa cómo fue la distribución de estos resultados en función de la cantidad de días en los períodos de cabeza (4 días), cuerpo (87 días) y cola (11 días) de la temporada reproductiva (Tabla 6 y Gráfico 12).

	Lavajes realizados	Lavajes recuperados	Embriones recuperados	Preñeces logradas
Cabeza	0,5	0,5	0,5	0,5
Cuerpo	0,57	0,33	0,38	0,26
Cola	0,45	0,27	0,27	0,18

Tabla 6: Resultados obtenidos en función de la cantidad de días por período de la temporada 2012-2013. Fuente: Elaboración propia.

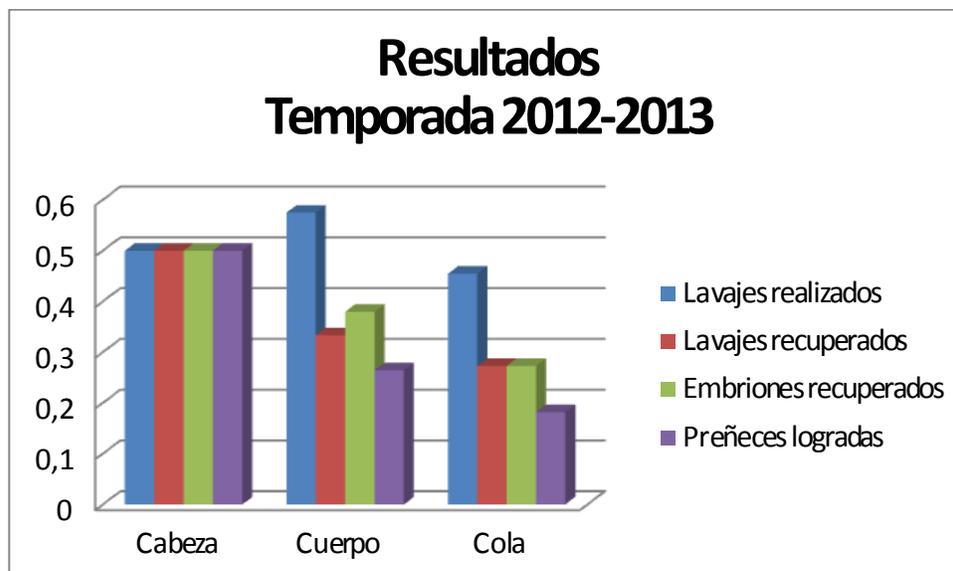


Gráfico 12: Distribución de los resultados en función de la cantidad de días por período, Temporada 2012-2013. Fuente: Elaboración propia.

- Temporada 2013-2014

En la temporada 2013-2014 se trabajó con 23 yeguas donantes y se llevaron a cabo 67 lavajes uterinos de los cuales en 30 de ellos (45%) se recuperaron embriones (Gráfico 13).

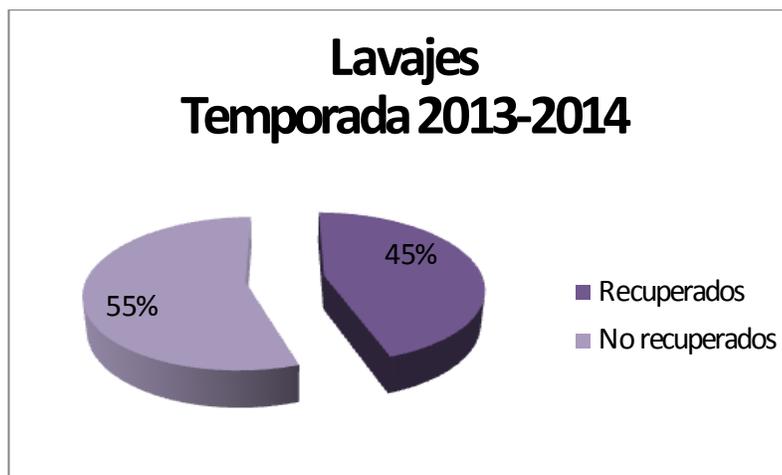


Gráfico 13: Lavajes de la temporada 2013-2014. Datos obtenidos a partir de la tabla 11 del Anexo. Fuente: Elaboración propia.

De los 30 lavajes recuperados, 7 fueron dobles y 23 fueron simples, lo que representa un 23 y un 77% respectivamente (Gráfico 14).



Gráfico 14: Lavajes recuperados en la temporada 2013-2014. Datos obtenidos a partir de la tabla 11 del Anexo. Fuente: Elaboración propia.

De los 37 embriones recuperados y transferidos 25 generaron preñez (68%) y 12 no lo hicieron (32%), por lo tanto el porcentaje total de éxito de la preñez de esta temporada fue del 37%. En este período no se cuenta con el dato de abortos (Gráfico 15).

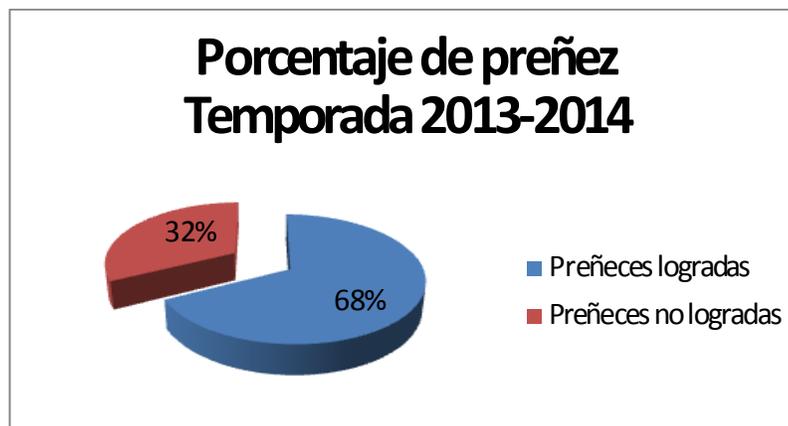


Gráfico 15: Porcentaje de preñez obtenido en la temporada 2013-2014. Datos obtenidos a partir de la tabla 11 del Anexo. Fuente: Elaboración propia.

A continuación se expresa cómo fue la distribución de estos resultados en función de la cantidad de días en los períodos de cabeza (8 días), cuerpo (87 días) y cola (5 días) de la temporada reproductiva (Tabla 7 y Gráfico 16).

	Lavajes realizados	Lavajes recuperados	Embriones recuperados	Preñeces logradas
Cabeza	0,63	0,25	0,38	0,25
Cuerpo	0,63	0,29	0,34	0,23
Cola	1,4	0,6	0,8	0,6

Tabla 7: Resultados obtenidos en función de la cantidad de días por período de la temporada 2013-2014. Fuente: Elaboración propia.

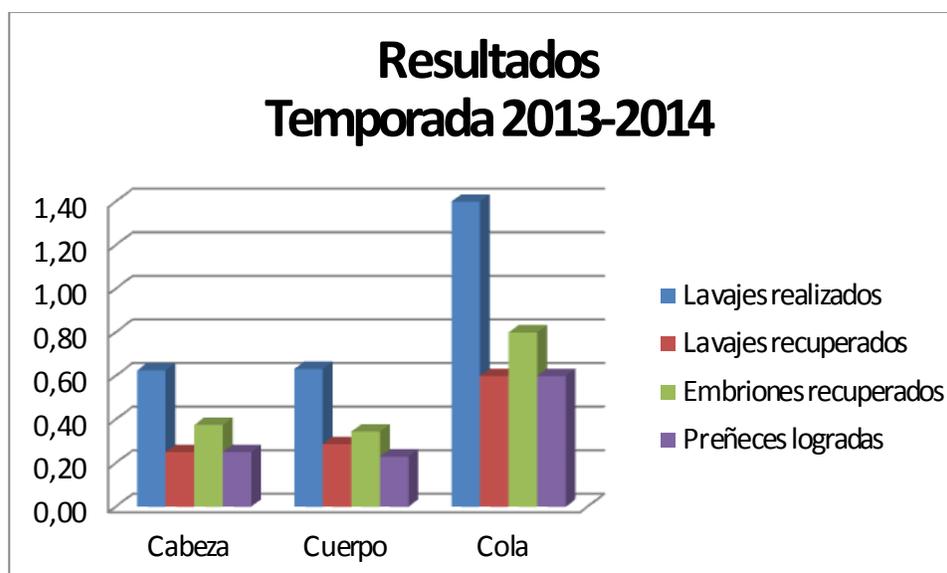


Gráfico 16: Distribución de los resultados en función de la cantidad de días por período, Temporada 2013-2014. Fuente: Elaboración propia.

Comparación entre temporadas

Con el fin de realizar una correcta comparación entre temporadas, se procedió al análisis de las distintas variables en función de la cantidad de días comprendidos en cada período. Por otro lado, con el fin de poder comparar los resultados obtenidos en el establecimiento El Silencio con aquellos bibliográficos presentados anteriormente, se llevó a cabo el análisis de los valores absolutos de cada variable, sin tener en cuenta dichos días.

- En función de los días

La cantidad de lavajes realizados por día (Gráfico 17) varió de una temporada a otra, sin embargo en todas ellas el cuerpo (el cual en todas fue de 87 días) presentó valores similares, desde 0,57 a 0,70. A la hora de analizar la cabeza y la cola los valores varían de manera considerable principalmente por la diferencia en la cantidad de días por período: en las temporadas 2010-2011 y 2011-2012 se observó una distribución similar ya que estos períodos tuvieron casi la misma duración mientras que las temporadas 2012-2013 y 2013-2014 tuvieron sus períodos de cabeza y cola mucho más cortos y por lo tanto la relación de la cantidad de lavajes realizados por día aumentó. Esto se observó claramente en el alto valor alcanzado (1,40) en la cola de la temporada 2013-2014 el cual surge de los 7 lavajes que se hicieron en el lapso de 5 días.

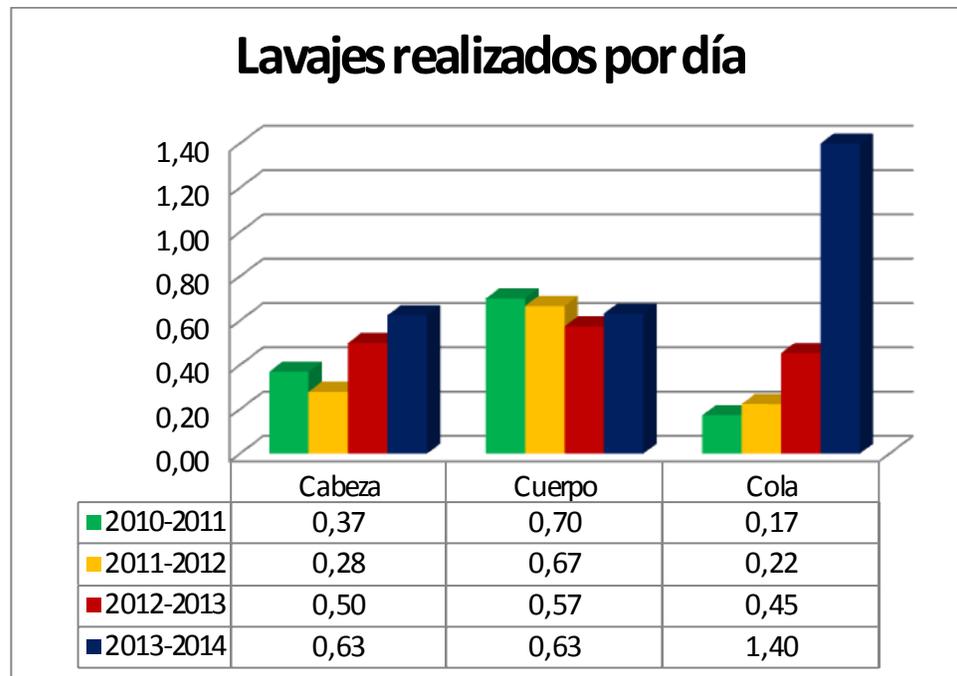


Gráfico 17: Comparación entre temporadas de lavajes realizados por día. Fuente: Elaboración propia.

En cuanto a los lavajes recuperados por día (Gráfico 18), aunque los valores son menores, todas las temporadas volvieron a obtener resultados similares en el cuerpo. En cuanto a la cola, se volvió a ver representado el aumento en las últimas 2 temporadas debido a la disminución en los días manteniendo la misma relación que se observó en los lavajes realizados. En el período de cabeza se observó que la temporada 2012-2013 presentó el mismo valor (0,50) que en los lavajes realizados, eso quiere decir que se recuperó el 100% de los lavajes realizados (2 lavajes recuperados de 2 lavajes realizados) en ese período.

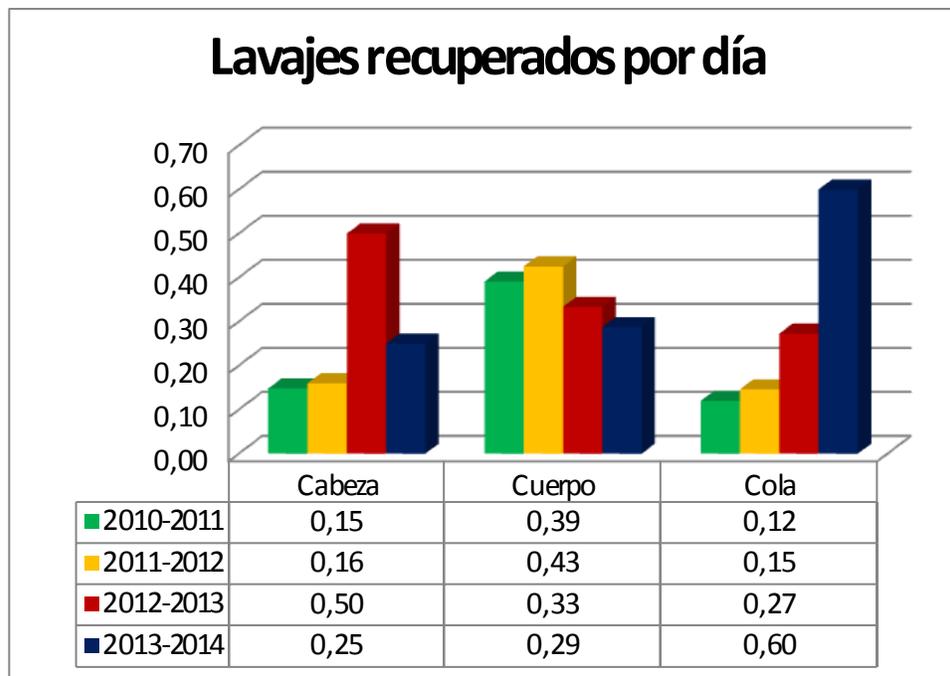


Gráfico 18: Comparación entre temporadas de lavajes recuperados por día. Fuente: Elaboración propia.

Los embriones recuperados (Gráfico 19) presentaron la misma distribución que los lavajes recuperados con la diferencia que los valores por día aumentaron debido a la recuperación doble o múltiple (según la temporada).

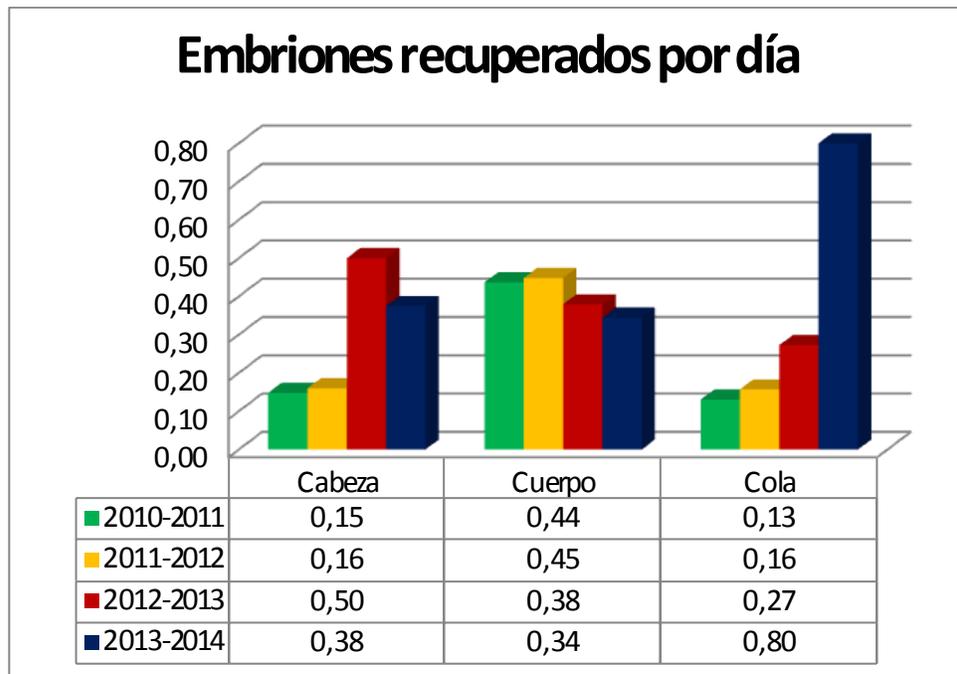


Gráfico 19: Comparación entre temporadas de embriones recuperados por día. Fuente: Elaboración propia.

Las preñeces logradas por día (Gráfico 20) siguieron la misma distribución que se vio para las variables anteriores. Las temporadas 2010-2011 y 2011-2012 presentaron la distribución normal que se esperaba con mejores resultados en su cuerpo y con su cabeza y cola reducidos. La temporada 2012-2013 presentó un gran aumento en su cabeza dado por las 2 preñeces logradas en un período de solo 4 días y al revés se podría decir con que pasó con la temporada 2013-2014 que vio aumentada su cola por las 3 preñeces logradas en un período de solo 5 días.

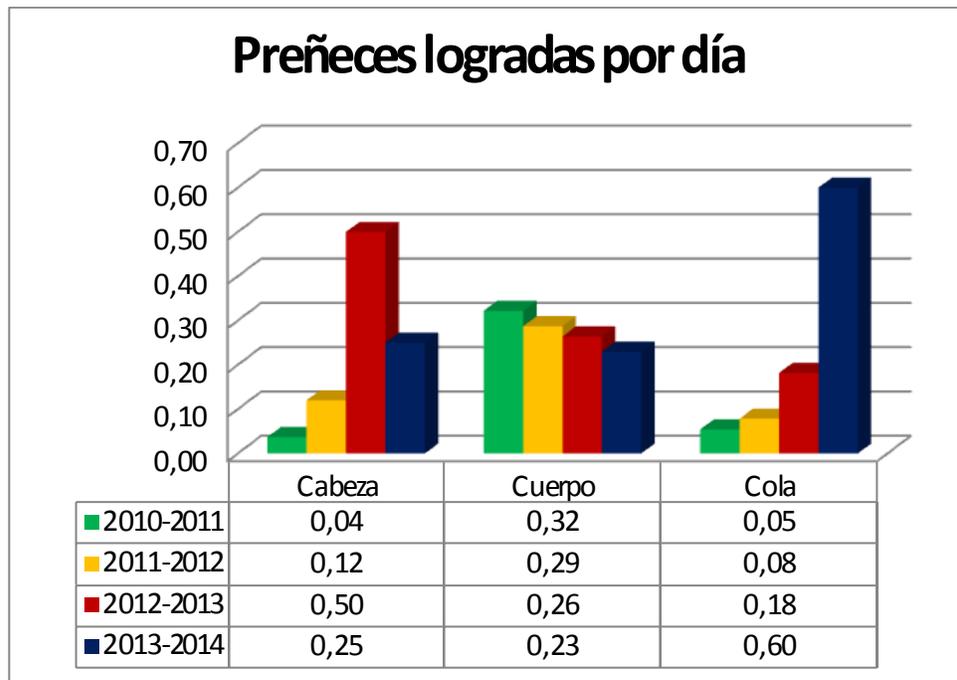


Gráfico 20: Comparación entre temporadas de preñeces logradas por día. Fuente: Elaboración propia.

- *En función de los valores absolutos*

A la hora de analizar los datos sin tener en cuenta los días que corresponden a cada período, se observó que los resultados varían en gran medida.

La cantidad de lavajes realizados varió de una temporada a otra pero en todos los casos la distribución porcentual (Gráfico 21) en cabeza, cuerpo y cola fue similar. En el caso de las temporadas 2010-2011 y 2011-2012, se observó que la cola tuvo un porcentaje de entre 18 y 24% (mayor a las otras 2 que apenas si alcanzaron el 10%) lo que demuestra que la cantidad de lavajes realizados estuvo más concentrado en el cuerpo en las temporadas 2012-2013 y 2013-2014.

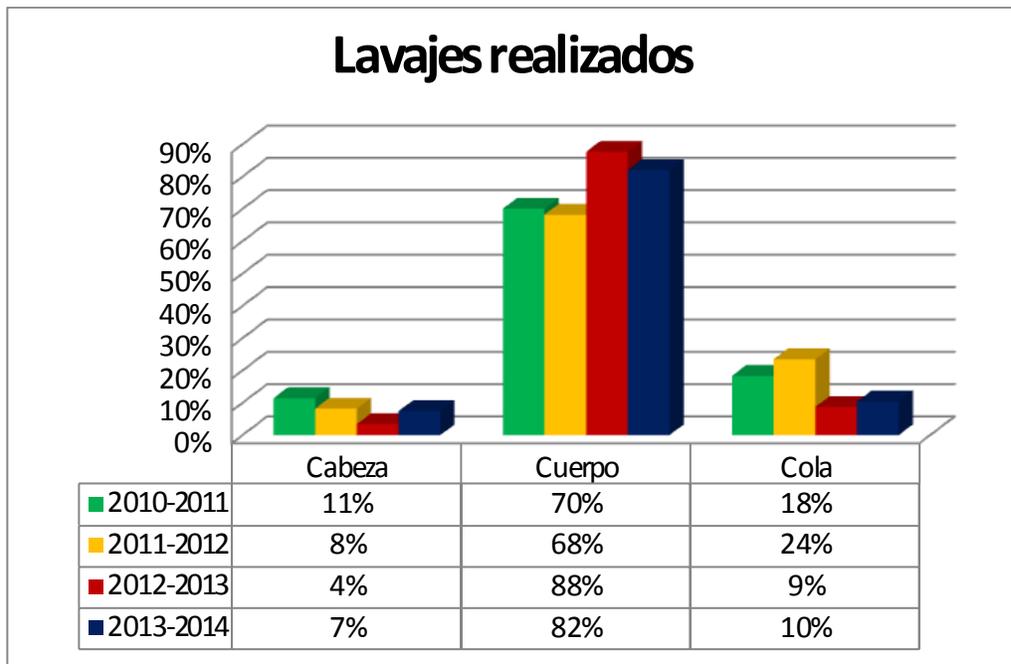


Gráfico 21: Comparación Porcentual: Lavajes realizados. Valores obtenidos a partir de la tabla 12 del Anexo. Fuente: Elaboración propia.

Los porcentajes de lavajes recuperados (Gráfico 22) variaron entre 45 y 64% siendo la última temporada la de menor porcentaje diferenciándose notablemente de las demás; el motivo de este descenso se desconoce. En este caso, al igual que en el caso de los lavajes realizados, se observó la diferencia marcada en la cola entre las 2 primeras temporadas y las 2 restantes. Aquí también se notó que las temporadas 2010-2011 y 2013-2014 lograron un porcentaje más bajo de lavajes recuperados en el cuerpo, sin embargo al considerar el total, la temporada 2010-2011 no se vio tan influenciada por éste ya que compensó con la mayor cantidad de lavajes realizados y recuperados de la cola de temporada.

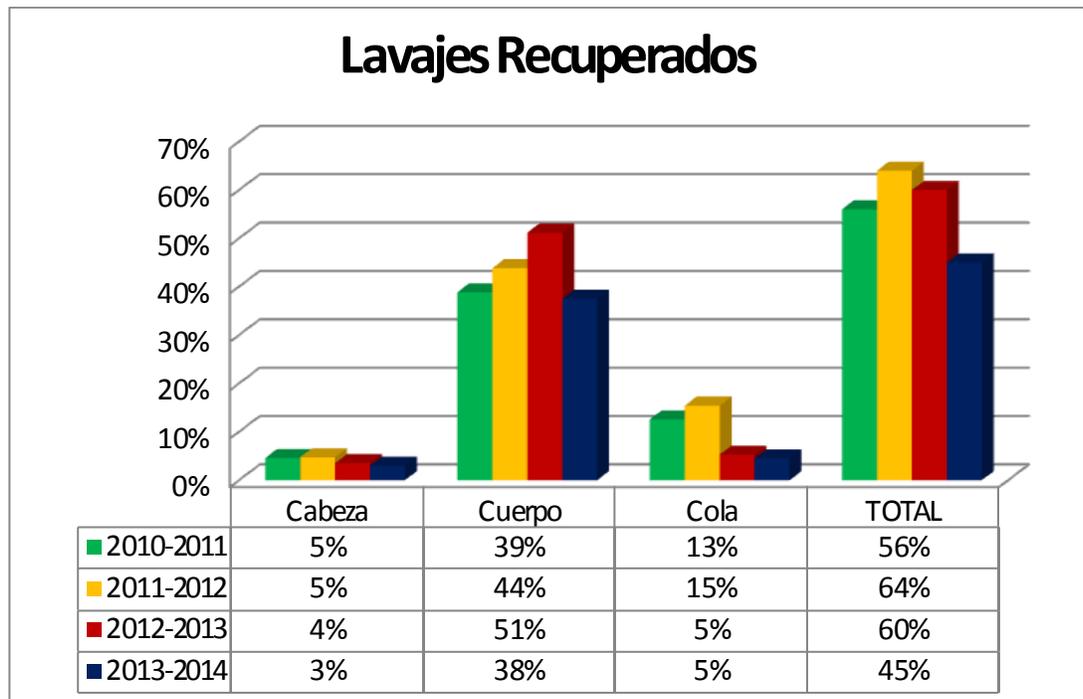


Gráfico 22: Comparación Porcentual: Lavajes Recuperados. Valores obtenidos a partir de la tabla 13 del Anexo. Fuente: Elaboración propia.

Los embriones recuperados (Gráfico 23) presentaron una distribución similar a la de los lavajes recuperados aunque todos aumentaron en mayor o menor medida; su variación la dieron las recuperaciones múltiples que se observaron a lo largo de toda la temporada. El mayor crecimiento se observó en la última temporada en la cual la diferencia entre lavajes recuperados (45%) y embriones recuperados (55%) es de un 10%, lo que pone de manifiesto la importancia de tener ovulaciones múltiples ya que gracias a ellas la efectividad de la transferencia tiene la posibilidad de aumentar en gran medida a pesar del bajo porcentaje de lavajes recuperados.

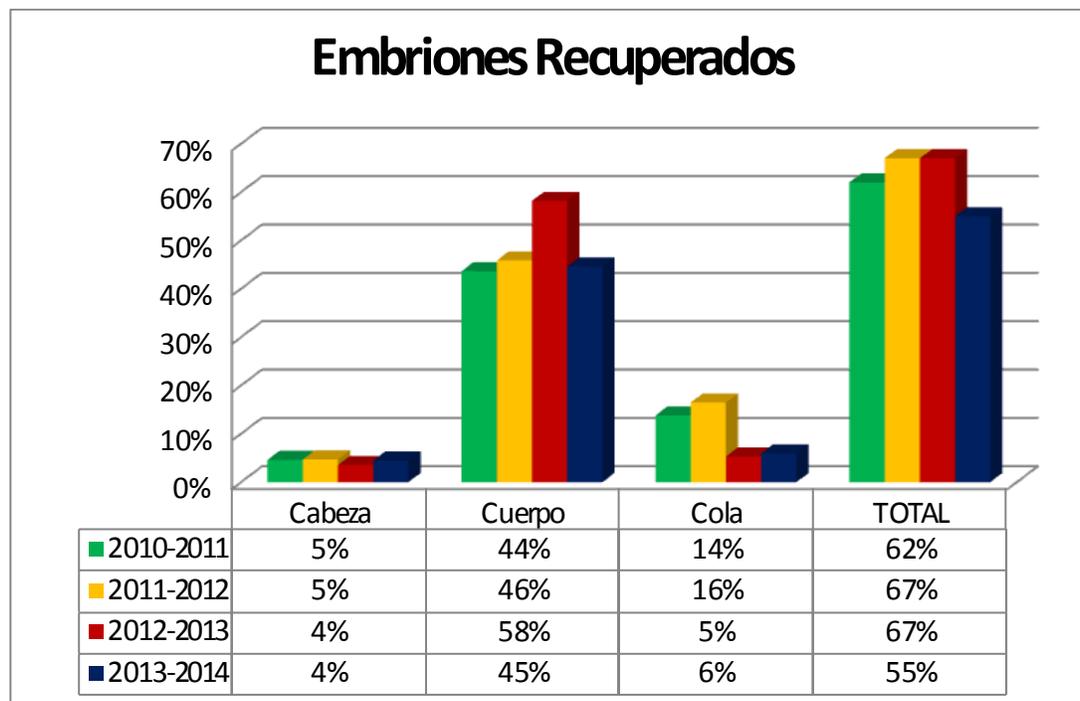


Gráfico 23: Comparación Porcentual: Embriones Recuperados. Valores obtenidos a partir de la tabla 14 del Anexo. Fuente: Elaboración propia.

Cuando se analizó el éxito en la transferencia embrionaria (Gráfico 24) se estableció cuántas preñeces se lograron con respecto a los embriones que fueron recuperados y transferidos. En este caso se pudo notar que las últimas 2 temporadas lograron los mejores resultados de éxito en transferencia, 71 y 68%, aunque fueron las temporadas con menor cantidad de lavajes y embriones recuperados. A su vez, los mayores éxitos en la transferencia se observaron en el cuerpo de la temporada, notando que cuanto mayor es el porcentaje que se desvía hacia la cola de temporada, menor es el porcentaje total de la temporada, no siendo, de todas formas, directamente proporcional.

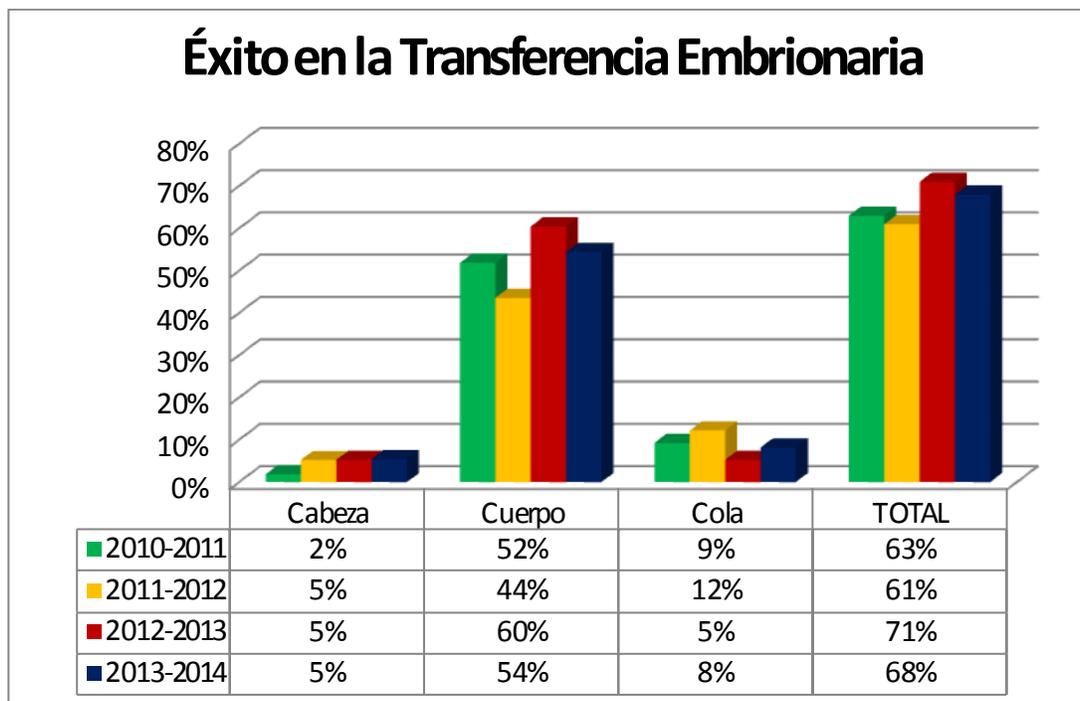


Gráfico 24: Comparación porcentual: Exito en la Transferencia Embrionaria. Valores obtenidos a partir de la tabla 15 del Anexo. Fuente: Elaboración propia.

A pesar de todo esto, el porcentaje a tener en cuenta a la hora de analizar el éxito de esta práctica aplicada en el campo, es el porcentaje total de éxito de preñez por ciclo (Gráfico 25), representando así a las preñeces logradas en función de los lavajes realizados. En este caso “El Silencio” alcanzó porcentajes entre 37 y 47%. Se podría creer que el mayor éxito de preñez logrado (47%ª temporada 2013-2014), es debido al mayor éxito en la transferencia (71%), sin embargo, el peor éxito de preñez logrado (37%ª temporada 2012-2013) coincide con el segundo mejor éxito en la transferencia (68%) lo que nos demuestra que el éxito de preñez por ciclo se encuentra influenciado por toda la cadena de trabajo y no por un único factor.

A continuación se muestra el detalle de cómo fue la distribución de ese porcentaje logrado por temporada y por período.

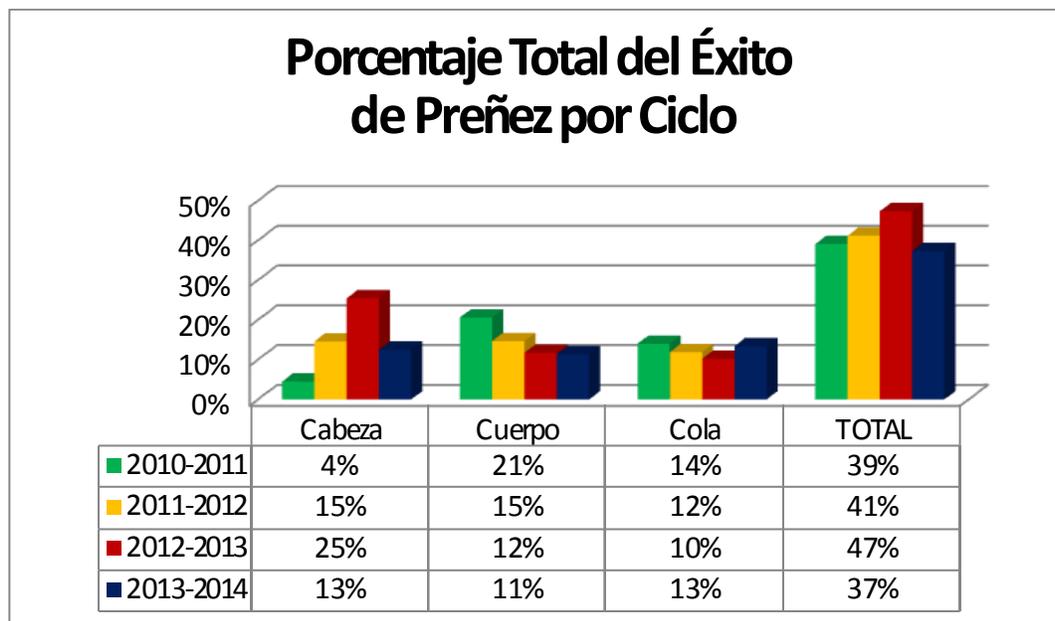


Gráfico 25: Porcentaje Total del Éxito de Preñez por Ciclo. Fuente: Elaboración propia.

Discusión de resultados

La primera diferencia notable que surgió en el análisis realizado es que las primeras 2 temporadas fueron considerablemente más largas (206 y 201 días respectivamente) respecto de las 2 últimas (102 y 100 días respectivamente), diferencia que se dio principalmente por el largo de la cola. Este fin anticipado de las temporadas 2012-2013 y 2013-2014 se produjo principalmente por la falta de receptoras aunque también intervinieron otros factores internos del establecimiento. De cualquier manera, en líneas generales, el fin anticipado no significó una disminución de los resultados finales ya que los lavajes y recuperaciones que se hicieron en esos períodos fueron de mayor eficiencia que aquellos realizados en las temporadas 2010-2011 y 2011-2012.

A la hora de definir el éxito de la transferencia, lo más importante a tener en cuenta es el número de preñeces logradas. Teniendo esto en cuenta, observando que se lograron 34 y 35 preñeces en las temporadas 2010-2011 y 2011-2012 contra 27 y 25 preñeces en las temporadas 2012-2013 y 2013-2014, se podría decir que las 2 primeras fueron las más exitosas. Sin embargo, al tener en cuenta que para las 2 primeras se necesitaron el doble de días que para las últimas 2, se pudo concluir que las temporadas 2012-2013 y 2013-2014 fueron mucho más eficientes; de hecho, como vimos anteriormente, sus porcentajes de éxito de transferencia fueron de 71 y 68% respectivamente y el porcentaje total de éxito de preñez fue de 47 y 37%, muy cercanos a los 39 y 41% de las temporadas 2010-2011 y 2011-2012 (porcentajes que se calcularon sin tener en cuenta la cantidad de días por período). Esto quiere decir que a pesar de haber sido las temporadas más cortas, con menor cantidad de lavajes y

con menores preñeces totales logradas, se obtuvieron muy buenos resultados y hasta sería prudente analizar para el futuro del establecimiento, si es conveniente hacer temporadas más largas que tengan más gastos por mantener la ciclicidad de las yeguas por más tiempo o si es más conveniente acortar la temporada, concentrarla más en el cuerpo y lograr mejores resultados desde este lugar.

Conclusiones

Habiendo analizado el método de transferencia embrionaria equina en profundidad y habiendo llevado a cabo la práctica a campo, pude aprender el funcionamiento de dicho trabajo. Es un método relativamente sencillo de llevar a cabo pero es fundamental el contar con personal capacitado y trabajo en equipo para lograrlo. En el caso de El Silencio, esto es algo muy bien organizado y llevado a cabo mediante el encargado, sus colaboradores y el veterinario, contando con una gran experiencia laboral y una excelente relación interpersonal lo que se ve plasmado en los resultados analizados.

Como hemos visto, en condiciones ideales (personal con experiencia, uso de donantes, receptoras y padrillos fértiles, entre otras cosas) podría esperarse un porcentaje de recuperación del 50-70% y un éxito en la transferencia del 50-70%, resultando un porcentaje total de éxito de preñez del 25-50% por ciclo. Al analizar los datos de El Silencio vemos que su porcentaje de embriones recuperados se encuentra dentro del 55-67% y su éxito de transferencia es del 61-71%, resultando en un porcentaje total de éxito de preñez del 37-47%, motivo por el cual podemos concluir que el establecimiento se encuentra dentro de los porcentajes internacionales esperados para esta práctica e inclusive por arriba de la media.

La criopreservación es una variante muy importante a tener a cuenta a la hora de no tener receptoras disponibles, problema que es habitual al principio y principalmente al fin de la temporada reproductiva. Como hemos visto en este trabajo, los métodos de refrigeración y vitrificación son los más propicios para resolver el problema debido a su relativamente sencilla forma de llevarse a cabo y a su bajo costo. Dado que El Silencio no tiene el contacto para transferir los embriones a receptoras de otros establecimientos dentro de las 24 hs, considero que su mejor opción sería la vitrificación, pudiendo así transferir esos embriones tiempo más tarde a sus mismas receptoras o generando un posible trabajo para el futuro como podría ser vender esos embriones a terceros. De esta manera recordemos que si el 30% de los embriones vitrificados (porcentaje que creo posible de alcanzar en el establecimiento debido a las excelentes condiciones de trabajo ya mencionadas) logran una preñez, entonces el porcentaje de éxito por ciclo reproductivo sería aun mayor y por lo tanto se cumpliría con el objetivo principal del campo de obtener cada vez un mejor índice reproductivo.

Anexo

	Lavajes realizados	Lavajes recuperados	Embriones recuperados	Preñeces logradas	Días por período
Cabeza	10	4	4	1	27
Cuerpo	61	34	38	28	87
Cola	16	11	12	5	92
TOTAL	87	49	54	34	206

Tabla 8: Datos del período 2010-2011. Fuente: Elaboración propia.

	Lavajes realizados	Lavajes recuperados	Embriones recuperados	Preñeces logradas	Días por período
Cabeza	7	4	4	3	25
Cuerpo	58	37	39	25	87
Cola	20	13	14	7	89
TOTAL	85	54	57	35	201

Tabla 9: Datos del período 2011-2012. Fuente: Elaboración propia.

	Lavajes realizados	Lavajes recuperados	Embriones recuperados	Preñeces logradas	Días por período
Cabeza	2	2	2	2	4
Cuerpo	50	29	33	23	87
Cola	5	3	3	2	11
TOTAL	57	34	38	27	102

Tabla 10: Datos del período 2012-2013. Fuente: Elaboración propia.

	Lavajes realizados	Lavajes recuperados	Embriones recuperados	Preñeces logradas	Días por período
Cabeza	5	2	3	2	8
Cuerpo	55	25	30	20	87
Cola	7	3	4	3	5
TOTAL	67	30	37	25	100

Tabla 11: Datos del período 2013-2014. Fuente: Elaboración propia.

	Cabeza	Cuerpo	Cola	TOTAL
2010-2011	10	61	16	87
2011-2012	7	58	20	85
2012-2013	2	50	5	57
2013-2014	5	55	7	67

Tabla 12: Comparación cuantitativa de lavajes. Fuente: Elaboración propia.

	Cabeza	Cuerpo	Cola	TOTAL
2010-2011	4	34	11	49
2011-2012	4	37	13	54
2012-2013	2	29	3	34
2013-2014	2	25	3	30

Tabla 13: Comparación cuantitativa de lavajes recuperados. Fuente: Elaboración propia.

	Cabeza	Cuerpo	Cola	TOTAL
2010-2011	4	38	12	54
2011-2012	4	39	14	57
2012-2013	2	33	3	38
2013-2014	3	30	4	37

Tabla 14: Comparación cuantitativa de embriones recuperados. Fuente: Elaboración propia.

	Cabeza	Cuerpo	Cola	TOTAL
2010-2011	1	28	5	34
2011-2012	3	25	7	35
2012-2013	2	23	2	27
2013-2014	2	20	3	25

Tabla 15: Comparación cuantitativa de preñeces. Fuente: Elaboración propia.

Bibliografia

- ~ Allen W.R., Wilsher S., Turnbull C., Stewart F., Ousey J., Rossdale P.D. and Fowden A.L. *Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero.* Reproduction 2002.
- ~ Allen W.R., Wilsher S., Tiplady C. and Butterfield R.M. *The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III Postnatal growth.* Reproduction, 2004.
- ~ Allen W.R. *The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding.* Reprod. domest. Anim. 2005.
- ~ Araujo G.H.M., Rocha Filho A.N., Burns S.D., Burns C.M., Moya-Araujo C.F. and Meira C. *Pregnancy rates after vitrification, warming and transfer of equine embryos.* Animal Reproduction Science, 2010.
- ~ Battut I., Colchen S., Fieni F., Tainturier D. and Bruyas J.F. *Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation.* Equine vet. J., Suppl. 1997.
- ~ Battut I., Grandchamp des Raux A., Nicaise J.L., Fieni F., Tainturier D. and Bruyas J.F. *When do equine embryos enter the uterine cavity? An attempt to answer.* In: Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Havemeyer Foundation Monograph Series 3, Eds: T. Katila and J.F. Wade, R&W Publications, Newmarket, 2001.
- ~ Betteridge K.J., Eaglesome M.D., Mitchell D., Flood P.F., Bériault R. *Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens.* J Anat, 1982.
- ~ Bezaud J. *In vitro fertilization in the mare.* Poland, Proc Int Sci Conf Biotechnics in Horse Reprod, Agricultural University of Krakow, 1992.
- ~ Blanchard T.L., Varner D.D. and Schumacher J. *Manual of Equine Reproduction.* United States of America, Mosby, 1998.
- ~ Blanchard T.L., Varner D.D., Schumacher J., Love C.C., Brinsko S.P. and Rigby S.L. *Manual of Equine Reproduction.* United States of America, Mosby, 2nd Edition, 2003.
- ~ Bruyas J-F., B'ézard J., Lagneaux D., Palmer E. *Quantitative analysis of morphological modifications of day 6.5 horse embryos after cryopreservation: differential effects on ICM and trophoblast cells.* J Reprod Fertil, 1993.
- ~ Bruyas J-F., Sanson J-P., Battut I., Fieni F., Tainturier D. *Effect of sucrose in diluting glycerol or ethylene glycol after thawing of frozen day 6.25 horse embryos.* J Reprod Fertil Suppl, 2000.
- ~ Camillo F., Vannozzi I., Rota A., Romagnoli S. and Aria G. *Comparison of Embryo Recovery Rates From Two Years Old and Mature Mares.* Italy, Departamento de Clínica Veterinaria, Universidad de Pisa, 2000.
- ~ Carnevale E.M., Squires E.L. and McKinnon A.O. *Comparison of Ham's F10 with CO₂ or Hepes buffer for storage of equine embryos at 5 C for 24 H.* J Anim Sci. 1987.

- ~ Carnevale E.M. and Ginther O.J. *Defective oocytes as cause of subfertility in old mares*. Biol Reprod Monogr, 1995.
- ~ Carnevale E.M., Ramirez R.J., Squires E.L., Alvarenga M.A., Vanderwall D.K. and McCue, P.M. *Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer*. Theriogenol. 2000.
- ~ Carnevale E.M., Eldridge-Panuska W.D., Caracciolo di Brienza V., Seidel G.E.Jr and Squires E.L. *Embryo development rates after vitrification and transfer of equine embryos*. Brasil, Proceedings of the 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Havemeyer Foundation, 2004.
- ~ Carney N.J., Squires E.L., Cook V.M., Seidel G.E.Jr and Jasko D.J. *Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh vs cooled transported equine embryos*. Theriogenology, 1991.
- ~ Castanheira P.N., Amaral D.C.G., Vasconcelos A.B., Arantes R.M.E., Stahlberg R. and Lagares M.A. *Cryopreservation of equine embryos by vitrification*. Brasil, Proceedings of the 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Havemeyer Foundation, 2004.
- ~ Choi Y.H., Velez I.C., Riera F.L., Roldán J.E., Hartman D.L., Bliss S.B., Blanchard T.L., Hayden S.S. and Hinrichs K. *Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts*. Elsevier Inc, 2011.
- ~ Davies Morel, M.C.G. *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. United Kingdom, CABI Publishing, 2nd Edition, 2003.
- ~ Flood P.F., Betteridge K.J., Dicoce M.S. *Transmission electron microscopy of horse embryos, 3–16 days after ovulation*. J Reprod Fertil Suppl, 1992.
- ~ Handler J., Königshofer M., Kindahl H., Schams D. and Aurich C. *Secretion patterns of oxytocin and PGF2 α -metabolite in response to cervical dilatation in cyclic mares*. Theriogenol. 2003.
- ~ Hudson J., McCue P.M., Carnevale E.M., Welch S. and Squires E.L. *The Effects of Cooling and Vitrification of Embryos From Mares Treated With Equine Follicle-Stimulating Hormone on Pregnancy Rates After Nonsurgical Transfer*. Journal of Equine Veterinary Science, 2006.
- ~ Jasko D.J. *Comparison of pregnancy rates following non-surgical transfer of day 8 embryos using various transfer devices*. Theriogenol. 2002.
- ~ Kask K., Odensvik K. and Kindahl H. *Prostaglandin F2 α release associated with an embryo transfer procedure in the mare*. Equine vet. 1997.
- ~ Legrand E., Bencharif D., Battut I., Taintureir D., Bruyas J-F. *The effect of glycerol IM on frozen horse embryos; localization of damaged cells*. In: Proceedings of the 15th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association, Lyon, 1999.
- ~ McKinnon A.O. and Squires E.L. *Morphologic assessment of the equine embryo*. J. Am. vet. med. Ass. 1988.
- ~ McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E. and Varner D.D. *Equine Reproduction*. United Kingdom, Wiley-Blackwell, 2nd Edition, 2011.
- ~ Morel D. *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. UK, CABI Publishing, 2nd Edition, 2003.

- ~ Moussa M., Duchamp G., Mahla R., Bruyas J-F. and Daels P.F. *In vitro and in vivo comparison of Ham's F-10, Emcare holding solution and ViGro Holding Plus for the cooled storage of equine embryos*. Theriogenology, 2003.
- ~ Moussa M., Tremoleda J.L., Duchamp G., Bruyas J-F., Colenbrander B., Bevers M.M. and Daels P.F. *Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5°C*. Theriogenology, 2004.
- ~ Moussa M., Duchamp G., Daels P.F. and Bruyas J-F. *Effect of embryo age on the viability of equine embryos after cooled storage using two transport systems*. J Equine Vet Sci, 2006.
- ~ Oberstein N., O'Donovan M.K., Bruemmer J.E., Seidel G.E. Jr., Camevale E.M. and Squires E.L. *Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods*. Colorado State University, Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 2000.
- ~ Palma, G.A. *Biología de la reproducción*. Repro Biotec, 2ª Edición, 2008.
- ~ Skidmore J.A., Boyle M.S. and Allen W.R. *A comparison of two different methods of freezing horse embryos*. Journal of Reproduction and Fertility, Supplement 44, 1990.
- ~ Squires E.L., McCue P.M. and Vanderwall D. *The Current Status of Equine Embryo Transfer*. Colorado State University, Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999.
- ~ Stout T.A.E. *Equine embryo transfer: review of developing potential*. Netherlands, Department of Equine Sciences, University of Utrecht, 2006.
- ~ Vanderwall D. *Current Equine Embryo Transfer Techniques*. Department of Animal and Veterinary Science, Northwest Equine Reproduction Laboratory, University of Idaho, Moscow, Idaho, USA. 2000.
- ~ Yamamoto Y., Oguri N., Tsutsumi Y. and Hachinohe Y. *Experiments in the freezing and storage of equine embryos*. J Reprod Fertil Suppl, 1982.

Índice de Figuras, Gráficos y Tablas

Figura 1: Distintos estadios del embrión equino	8
Figura 2: Cronograma de sincronización de donantes y receptoras empleando progestágenos	16
Figura 3: Cronograma de sincronización de donantes y receptoras empleando prostaglandina	17
Figura 4: Cronograma de sincronización de donantes y receptoras empleando progesterona y estradiol-17 β	18
Figura 5: (a) Blastocisto expandido fresco de 7,5 días, previo a la transferencia. (b) Blastocisto expandido enfriado de 8 días, exhibiendo la contracción leve o deshidratación. La cápsula que rodea el embrión es visible	20
Figura 6: Diagrama de la manga en Haras El Silencio	28
Figura 7: a) Laboratorio de trabajo; b) Mesada limpia y lista para trabajar	29
Figura 8: a) Lupa para búsqueda y recuperación del embrión; b) Platina térmica; c) Tubo de silicona de 3 vías, catéter de silicona y filtro de recuperación; d) Filtro y catéter de silicona; e) Vaina estéril y pistola de inseminación de acero inoxidable; f) Jeringa unida a 1 pajuela para la movilización de los embriones; g) Sachets de solución ringer lactato; h) Albúmina bovina.	30
Figura 9: Cronograma de tratamiento de donantes de “El Silencio”	31
Figura 10: Aspiración de líquido del sachet de solución ringer lactato; una jeringa llena de solución y otra lista para la aspiración de espuma	32
Figura 11: Albúmina bovina y su agregado a la solución ringer lactato	32
Figura 12: Tubo de silicona de 3 vías conectado al filtro, al sachet y al catéter, listo para llevar a hacer el lavaje	33
Figura 13: Llegada del filtro al laboratorio y enjuagado del mismo	34
Figura 14: Filtro antes (a) y después (b) de ser removida la espuma de la superficie	34
Figura 15: Búsqueda del embrión bajo la lupa y visualización del mismo	35
Figura 16: Solución DPBS con 10% de suero fetal bovino para enjuague y carga de la pajuela	35
Figura 17: Observación de embriones en las gotas de enjuague	36
Figura 18: a) pajuela cargada con el embrión; b) Pajuela dentro de la vaina	37
Figura 19: a) Vaina con la pajuela utilizada en su interior; b) Pajuela unida a la pistola luego de ser descargada	37
Gráfico 1: Lavajes de la temporada 2010-2011	38
Gráfico 2: Lavajes recuperados en la temporada 2010-2011	39
Gráfico 3: Porcentaje de preñez obtenido en la temporada 2010-2011	39
Gráfico 4: Distribución de los resultados en función de la cantidad de días por período, Temporada 2010-2011	40

Gráfico 5: Lavajes de la temporada 2011-2012	41
Gráfico 6: Lavajes recuperados en la temporada 2011-2012	41
Gráfico 7: Porcentaje de preñez obtenido en la temporada 2011-2012	42
Gráfico 8: Distribución de los resultados en función de la cantidad de días por período, Temporada 2011-2012	42
Gráfico 9: Lavajes de la temporada 2012-2013	43
Gráfico 10: Lavajes recuperados en la temporada 2012-2013	43
Gráfico 11: Porcentaje de preñez obtenido en la temporada 2012-2013	44
Gráfico 12: Distribución de los resultados en función de la cantidad de días por período, Temporada 2012-2013	44
Gráfico 13: Lavajes de la temporada 2013-2014	45
Gráfico 14: Lavajes recuperados en la temporada 2013-2014	45
Gráfico 15: Porcentaje de preñez obtenido en la temporada 2013-2014	46
Gráfico 16: Distribución de los resultados en función de la cantidad de días por período, Temporada 2013-2014	46
Gráfico 17: Comparación entre temporadas de lavajes realizados por día	47
Gráfico 18: Comparación entre temporadas de lavajes recuperados por día	48
Gráfico 19: Comparación entre temporadas de embriones recuperados por día	49
Gráfico 20: Comparación entre temporadas de preñeces logradas por día	50
Gráfico 21: Comparación Porcentual: Lavajes	51
Gráfico 22: Comparación Porcentual: Lavajes Recuperados	52
Gráfico 23: Comparación Porcentual: Embriones Recuperados	53
Gráfico 24: Comparación porcentual: Éxito en la Transferencia Embrionaria	54
Gráfico 25: Porcentaje Total del Éxito de Preñez por Ciclo	55
Tabla 1: Diámetro de los embriones equinos recuperados del lumen uterino	8
Tabla 2: Éxito de preñez según tamaño de embriones vitrificados	26
Tabla 3: Costos de transferencia embrionaria y vitrificación	27
Tabla 4: Resultados obtenidos en función de la cantidad de días por período de la temporada 2010-2011	40
Tabla 5: Resultados obtenidos en función de la cantidad de días por período de la temporada 2011-2012	42
Tabla 6: Resultados obtenidos en función de la cantidad de días por período de la temporada 2012-2013	44
Tabla 7: Resultados obtenidos en función de la cantidad de días por período de la temporada 2013-2014	46
Tabla 8: Datos del período 2010-2011	58
Tabla 9: Datos del período 2011-2012	58
Tabla 10: Datos del período 2012-2013	58
Tabla 11: Datos del período 2013-2014	58
Tabla 12: Comparación cuantitativa de lavajes	58

Tabla 13: Comparación cuantitativa de lavajes recuperados	59
Tabla 14: Comparación cuantitativa de embriones recuperados	59
Tabla 15: Comparación cuantitativa de preñeces	59