SPERMOVA

Spermova. 2014; 4(2): 168 - 171

Artículo de revisión

AVANCES EN REPRODUCCION ASISTIDA EN EQUINOS

Advances in assisted reproduction in equine

*J. S. Rodríguez**
** DVM, MS, Diplo. ACT, Colorado State University, USA.*
E-mail: jacobosrodriguez@yahoo.com.ar
E-mail: Jacobo.Rodriguez@colostate.edu

INTRODUCTION

Reproducción asistida en caballos ha mejorado enormemente en los últimos años con la producción de potrillos de yeguas o padrillos subfértiles o infértiles usando técnicas de reproducción convencionales como son la inseminación artificial o la transferencia de embriones. Debido al alto valor económico de estos animales o la importancia genética de los mismos sin el uso de estos procedimientos la vida reproductiva de estos animales estarían casi terminados.

COLECTA DE OVOCITOS

Una de las técnicas más comunes para la colecta de oocitos es por punción transvaginal de folículos dominantes pre-ovulatorios o de folículos inmaduros. Es importante saber también que los oocitos se pueden colectar de ovarios de animales que por una extrema razón tuvieron que ser eutanasiados.

Los ovocitos colectados de folículos maduros generalmente se colectan entre 2 a 18 hs pre ovulación. Cuando un folículo alcanza como mínimo un tamaño de 35 mm y el útero presenta edema y pliegues endometriales la yegua donante recibe una dosis de gonadotrofina (GnRH análogo) y/o gonadotrofina coriónica humana (hCG). La mayoría de los oocitos son colectados en metafase I y tienen que ser cultivados por al menos 12-16 hs antes de ser transferidos o inyectados con un espermatozoide (ICSI) (Carnevale y Ginther, 1995; Hinrichs *et al.,* 2000) El porcentaje de recuperación varía según la experiencia del operador siendo de entre un 70-80% (Carnevale *et al.,* 2005).

Cuando la yegua donante esta lista para ser aspirada, se la pone en la manga para palpación, se limpia la zona perineal como si fuese a ser inseminada, se evacua la materia fecal del recto y se le administra tartrato de butorphanol (10mg), xilazina (entre 200-250 mg), meglumine de flunixin (10cc), Buscapan (entre 6-8cc). Se introduce el transductor a través de la vagina, a un lado del cérvix, ipsilateral del folículo que se va a aspirar. Luego el operador posiciona el ovario vía transrectal y el folículo es punzado con una aguja de doble orifico, de tamaño 12G que se encuentra adaptada al transductor. Dicha aguja tiene dos vías,

una conectada al medio que se usa para lavar el folículo y la otra vía conectada a la bomba de vacío para recuperar dicho liquido con el contenido folicular. Generalmente se usan entre 60-120 cc de medio de lavaje y el operador necesita masajear el folículo contra la aguja para poder separar la mayor cantidad de células de la pared folicular.

Es sumamente importante posicionar el folículo en forma correcta para evitar la punción del ligamento ovárico, oviducto, estroma ovárico o alguna víscera del tracto digestivo y así evitar futuras complicaciones del animal. La técnica es bastante segura aunque existen riesgos de complicaciones como hemorragias internas, peritonitis o abscesos ováricos (Vanderwall y Woods, 2002). Una vez aspirado el folículo la yegua es colocada en su box sin comida por unas 6 horas. Se puede administrar antibióticos por 3 días pero generalmente no es necesario. Los folículos que son aspirados, desarrollan un cuerpo lúteo normal en un lapso de 5-6 días lo cual generalmente responden bien a la administración de prostaglandinas. Las yeguas comienzan su ciclo estral nuevamente y pueden desarrollar un nuevo folículo dominante listo para ser aspirado nuevamente en 5-8 días después de la administración de prostaglandina.

Cuando folículos inmaduros son aspirados, los folículos deben ser lavados con pequeñas cantidad de líquido y la aguja debe ser rotada durante todo el proceso para permitir la total separación del ovocito de la pared folicular. Una vez recuperados los ovocitos de folículos inmaduros, estos deben se incubados por más tiempo (alrededor de 30hs) y en medios hormonales para permitir su completa maduración antes de ser inyectados (Hinrichs, 2010 y Jacobson *et al.,* 2010).

Debido a que los ovocitos son más susceptibles a los cambios de temperatura que los embriones es importante tener todos los medios y equipamiento a temperatura corporal. Cualquier cambio brusco de la temperatura debe ser evitado. Una vez terminado la aspiración el líquido colectado es dividido en varias placas para comenzar con la búsqueda del ovocito. La mayoría de las veces el ovocito recuperado de folículos maduros está acompañado del cúmulus el cual es de aspecto viscoso y transparente siendo más fácil su identificación con el estereoscopio (Figura 1). En caso de aspirar folículos inmaduros, es necesario filtrar todo el líquido de lavado porque es más difícil la identificación del ovocito ya que el mismo tiene un cúmulus más compacto.

Figura 1. Oocito maduro. Se puede ver al oocitos rodeado del cúmulus y células de la granulosa.

Una vez recuperado el ovocito, este se puede transferir quirúrgicamente en una yegua receptora previamente inseminada resultando el proceso de fertilización en forma natural en el oviducto (Carnevale *et al.,* 2001; 2010). La otra opción puede ser que una vez que se inyecto el ovocito con un espermatozoide (Figura 2), el proceso de fertilización suceda in vitro para luego ser transferido quirúrgicamente en una yegua receptora durante el estadio temprano de división celular. La última opción es que se mantenga ese ovocito en la incubadora después de la inyección espermática hasta el estadio temprano de blastocito y ser transferido no quirúrgicamente en una yegua receptora. La transferencia de ovocitos es primariamente usada en yeguas con severa reducida fertilidad debido a problemas cérvix, útero u oviductos. De lo contrario, los ovocitos destinados para la producción de embriones in vitro, la principal limitante es la disposición de semen. Generalmente se usa semen de padrillos que no están vivos o padrillos con limitada calidad de semen. La transferencia de ovocitos de una yegua

donante al oviducto de una yegua receptora vía laparotomía. La yegua receptora es inseminada entre 12-18 hs antes de la transferencia del ovocito. En estos casos se recomienda usar padrillos fértiles con buena calidad espermática. Para evitar la fertilización del ovocito de la yegua receptoras se pueden usar yeguas que no estén ciclando previa administración de estrógenos. Una vez hecha transferencia del ovocito, se comienza con tratamiento de progesterona para mantener la preñez. En caso de usar una receptora que este ciclando, se debe realizar la aspiración del folículo dominante, colectar el ovocito para después poder inseminar la yegua y transferir el ovocito de la yegua donante. De esta forma se evita obtener una preñez de un ovocito no deseado. El diagnostico de preñez se realiza vía ecografía a los 11-12 días después de la transferencia.

Figura 2. Ovocito en posición para ser inyectado con un espermatozoide.

En el caso de la inyección intracitoplasmática del ovocito, típicamente se usa semen congelado, aunque también se puede usar semen refrigerado (Colleoni *et al.,* 2007). Los ovocitos fertilizados desarrollan el estadio de dos células en 24 hs post inyección. Estos embriones tempranos pueden ser trasferidos en le oviducto quirúrgicamente vía laparotomía en una yegua sincronizada que este ciclando.

Si los embriones no son transferidos quirúrgicamente, se mantienen en incubadora hasta el estadio de mórula o blastocito temprano y pueden ser transferidos a través del cérvix y depositado en el útero por métodos convencionales en una yegua receptora que tenga unos 4-6 días de ovulada. La mayor limitante de esta técnica son los costos y mantenimiento de todo el equipamiento así como también el entrenamiento de un técnico calificado. Si no se quiere invertir en esto, los ovocitos pueden ser transportados a centros especializados donde pueden ser inyectados y cultivados para luego ser transferidos por cualquiera de los dos métodos. Los oocitos pueden ser colectados 20-24 horas después de la estimulación de la donante y transportados en la noche para poder recibirlos en el laboratorio y así ser inyectados en la mañana.

Figura 3. Preparación de la mesa para colectar ovocitos de ovarios de una yegua que ha sido eutanasiada.

Colecta de ovocitos de ovarios de yeguas que han sido sacrificadas

Ovocitos pueden ser colectados de ovarios de yeguas que han sido sacrificadas por diferentes causas, ya sean fracturas, cólicos, problemas respiratorios, etc. Dependiendo de la condición clínica del animal, la calidad de los ovocitos colectados puede variar. Una vez colectados los

ovarios, estos deben ser transportados a temperatura ambiente en cajas de telgopor y ser procesados en menos de 12 horas. Los ovocitos son removidos de los folículos usando curetas quirúrgicas y cultivados por 24-30 horas para la maduración *in vitro* antes de ser inyectados (Carnevale *et al.,* 2003) (ver Figura 4 y 5)
4 (Vanderwall y Woods, 2002)

Figura 4. Presencia de oocitos inmaduros. Nótese la presencia de un cúmulo celular más compacto y oscuro.

CONCLUSIÓN

En conclusión los avances en reproducción asistida han permitido el desarrollo efectivo de potrillos con importante material genético. La incorporación de nuevas técnicas en reproducción pueden ser una limitante por los costos, sin embargo la colecta de ovocitos y el transporte de los mismos puede ser una herramienta de importante recurso para ser incorporado en la práctica por los veterinarios que trabajan en reproducción equina.

REFERENCIAS

- Carnevale EM, Ginther OJ: Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biol Reprod Mono* 1995; 1:209-214.
- Hinrichs K, Betschart RW, McCue PM, et al: Effect of time of follicle aspiration on pregnancy rate after oocyte transfer in the mare. *J Reprod Fertil* (Suppl) 2000; 56:493-498.
- Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Panzani D, et al: Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. *Theriogenology* 2005; 64:519-527.
- Vanderwall DK, Woods GL: Severe internal hemorrhage resulting from transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in a mare. *J Equine Vet Sci* 2002;22:84-86
- Hinrichs K: Application of assisted reproductive technologies (ART) to clinical practice. *Proc Annu Conv Am Assoc Equine Pract* 2010. p. 195-206.
- Jacobson CC, Choi YH, Hayden SS, et al: Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2010; 73:1116-1126.
- Carnevale EM, Squires EL, Maclellan LJ, et al: Use of oocyte transfer in a commercial breeding program for mares with various abnormalities. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218:87-91.
- Carnevale EM, Frank-Guest BL, Stokes JE: Effect of equine oocyte donor age on success of oocyte transfer and intracytoplasmic sperm injection. Anim Reprod Sci 2010; 121S: S258-S259.
- Colleoni S, Barbacini S, Necchi D, et al Application of ovum pick-up, intracytoplasmic sperm injection and embryo culture in equine practice. *Proc Annu Conv Am Assoc Equine Pract* 2007. p. 554-559.
- Carnevale EM, Maclellan LJ, Coutinho da Silva MA, et al: Pregnancies attained after collection and transfer of oocytes from ovaries of five euthanatized mares. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 222:60-62.