



Facultad de Ciencias Veterinarias

-UNCPBA-

Una posible causa de mortalidad embrionaria temprana en el trasplante embrionario equino

Caldentey, Fernando José; Perkins, Gustavo; Uslenghi, Gastón.

Agosto, 2017

Tandil

Una posible causa de mortalidad embrionaria temprana en el trasplante embrionario equino

Tesina de la Orientación Producción Animal, presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Veterinario del estudiante: Caldentey, Fernando José

Tutor: **M.V. Perkins, Gustavo.**

Director: **Vet. Uslenghi, Gastón.**

Evaluador: **Vet. Redolatti, Cecilia**

Dedicado a mi familia y a mis amigos, y a todas las personas que me acompañaron desde el principio de este largo camino.

Resumen

El trasplante embrionario equino es la técnica de reproducción asistida más difundida en la actualidad. Existen ciertos factores que influyen para que dicho proceso se lleve a cabo exitosamente, como el estado reproductivo de las yeguas receptoras y donantes, conocimientos del operario, etc. El embrión equino permanece móvil en el útero hasta el día 16 de gestación. En el día 14, debido a la contracción uterina y los mecanismos de reconocimiento materno, sólo se mueve de un cuerno a otro, hasta que finalmente cesa su movimiento y va a alojarse en uno de los cuernos para continuar la gestación. Al momento de realizar la transferencia embrionaria se utilizan como receptoras yeguas que hayan ovulado el mismo o preferiblemente días después que la donante (de 0 a 4). Esto lleva a que, mientras el embrión tiene ocho días de vida, pasa a continuar su gestación en un útero que tiene hasta cuatro días menos de diestro. El útero de la yegua receptora al cual se le transfiere el embrión y que presenta un diestro de menos días que la progenitora no tendrá la contracción adecuada para ese tamaño de embrión con el correr del diestro, y por lo tanto aumenta el riesgo de que no haya cesado su movimiento al día 14 y encontrarlo alojado en el cuerpo uterino al momento de hacer la primera ecografía, pudiendo provocar una muerte embrionaria temprana. En esta tesina se desarrollará un caso clínico de embrión que, habiendo sido transferido a una receptora ovulada 3 días después que la donante, al momento de realizar la primera ecografía se encontraba alojado en el cuerpo uterino por encima de la base ósea de la cavidad pelviana. La posible injuria física que pudo haber recibido con el transductor presionándolo contra el canal óseo llevó a que el embrión sufriera un daño suficiente para producir la reabsorción embrionaria temprana que sobrevino.

Palabras claves: trasplante embrionario, gestación, reabsorción embrionaria, donantes, receptoras

Índice

Introducción	1
1.Anatomía del tracto reproductivo de la yegua	3
2.Fisiología y endocrinología del ciclo estral de la yegua	7
2.1-Eventos hormonales.....	8
2.2 Dinámica folicular.....	10
3.Fisiología de la yegua gestante	13
4. Transferencia embrionaria en equinos	17
5. Ultrasonografía	21
6. Caso clínico	27
7. Discusión	29
8.Conclusiones	32
9. Referencias bibliográficas	33

Introducción

La transferencia embrionaria es una de las técnicas de reproducción asistida más ampliamente utilizadas en la especie equina (Vanderwall, 2000). Consiste en remover el embrión desde el tracto reproductivo de una yegua, llamada donante, para ser transferido al tracto reproductivo de otra, llamada receptora. El número de centros de transferencia embrionaria y clínicas especializadas en la técnica, ha incrementado drásticamente en los últimos años, sumado a los avances en los procesos de recolección, técnica de transferencia, calidad de los medios de lavaje, equipamiento, manejo de los embriones y la criopreservación, han incrementado el éxito de la transferencia embrionaria en la especie equina (MacCue y Squires, 2015).

Los principales usos y ventajas de la técnica se refieren a que permite obtener más de una cría por año en yeguas de gran valor genético; disminuir los riesgos asociados a la gestación y el parto; permite reproducir yeguas viejas, con anomalías del tracto reproductivo, o yeguas con antecedentes de pérdida de la gestación en reiteradas oportunidades; permite la reproducción de yeguas con problemas musculoesqueléticos, entre otras.

La recolección del embrión desde la yegua donante se realiza habitualmente entre los días 6 y 9 post ovulación mediante el lavado uterino transcervical (Vanderwall, 2000), y esto es posible porque, luego de la fecundación, el embrión permanece móvil en el útero hasta el día 14 de gestación. Luego, debido a contracciones uterinas y los mecanismos de reconocimiento materno de la gestación, cesa su movimiento y se aloja en uno de los cuernos uterinos para continuar la gestación (England, 2005). Con base en esto, es importante tener en cuenta los días de diestro de la yegua receptora al momento de la transferencia, para que el embrión encuentre un ambiente uterino similar al de la yegua donante.

Tanto las yeguas donantes como las receptoras deben ser examinadas diariamente mediante ultrasonografía. El día de ovulación de la yegua donante es considerado día 0. Se utilizan receptoras que hayan ovulado un día antes o de 0 a 3 días después que la donante (Conejo Barruso y García Gálvez, 2013).

Así, al momento de transferir el embrión en una receptora que haya ovulado hasta tres días después que la donante, presentará un útero que no tendrá la contracción adecuada para ese tamaño de embrión, el cual hasta los 14 días permanece en movimiento, y por lo tanto existe la posibilidad de encontrarlo alojado en el cuerpo uterino al momento de hacer la primera ecografía post transferencia.

Se especula que, en ese momento, la posible injuria física que puede recibir el embrión durante el proceso de limpieza rectal por la introducción del brazo del veterinario en la cavidad llena de materia fecal; como la recibida con el transductor presionándolo contra el canal óseo, puede generar cierto grado de lesiones suficientes como para provocar una reabsorción embrionaria temprana. Por lo que resulta de interés realizar una revisión bibliográfica de la anatomía y fisiología de la yegua durante el ciclo estral y la gestación, y analizar el procedimiento de detección temprana de preñez en los centros de transferencia embrionaria y el posible error de proceso que pueda llevar a daño embrionario y la consiguiente mortalidad, teniendo en cuenta las ventajas y desventajas de realizar el diagnóstico de preñez basándose en el diestro de la yegua receptora respecto a hacerlo en función de la edad del embrión.

Por lo tanto, el objetivo de la presente tesina es analizar una posible causa de mortalidad embrionaria temprana en el trasplante embrionario equino.

1) Anatomía del tracto reproductivo de la yegua

La comprensión de la anatomía del tracto reproductivo de la yegua es importante para permitir distinguir entre la normalidad y las patologías reproductivas. El aspecto morfológico del tracto reproductivo caudal y la normalidad del periné son cruciales para mantener la fertilidad de la yegua (England, 2005).

El tracto reproductivo de la yegua se encuentra suspendido por una lámina doble del peritoneo que sostiene los ovarios, oviductos, útero, cérvix y parte anterior de la vagina denominada ligamento ancho, el cual se une a la pared abdominal en la región sublumbar, dorsalmente a la vejiga. Igualmente el ligamento ancho aloja el sistema vascular, drenaje linfático y los nervios.

La mayor parte del tracto reproductivo se encuentra dentro de la cavidad abdominal y el resto dentro de la cavidad pélvica. La arquitectura ósea alrededor de la cavidad pélvica está encerrada por mitades simétricas de los huesos de la cadera (íleon, isquion, pubis), sacro, y primeras vértebras coccígeas (Bergfelt, 2009).

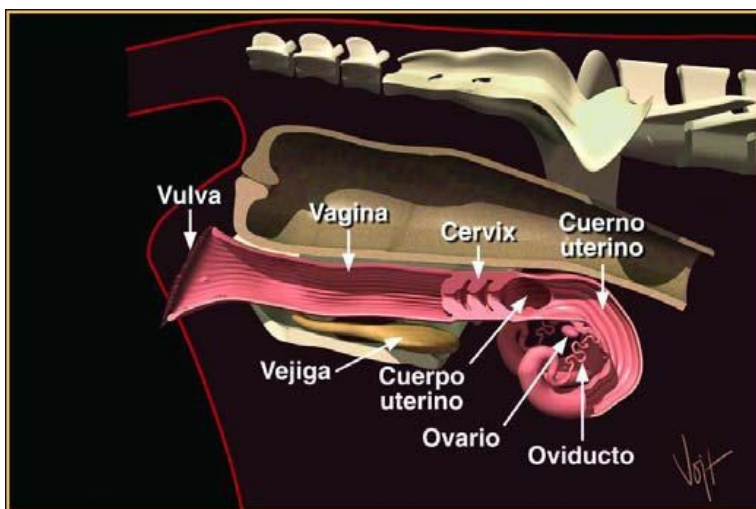


Figura N 1:Tracto reproductivo de la yegua(Bergfelt, 2009).

➤ **Ovarios:** Los ovarios de la yegua están ubicados en la zona sublumbar (ventral a la cuarta o quinta vértebra lumbar). Se encuentran contenidos en la parte anterior del ligamento ancho denominada mesovario y varios centímetros detrás del riñón correspondiente. Presentan una forma oval irregular y de consistencia firme.

Los ovarios y los folículos son más grandes en la yegua que en otras especies domésticas. El tamaño varía según la actividad ovárica; son más grandes durante la temporada reproductiva (primavera-verano) y más pequeños durante el anestro invernal. En promedio los ovarios miden entre 6 a 8 cm de largo, 3 a 4 cm de altura y alcanzan un peso de 70 a 80 gramos.

El ovario derecho es típicamente más craneal (2-3 cm) en relación al izquierdo. Debido a que los ovarios pueden ser levantadas por los intestinos, su ubicación real en el cuerpo es bastante variable (England, 2005, Brinsko *et al.*, 2011).

Cada ovario consta de dos superficies (medial y lateral), dos fronteras (dorsal y ventral), y dos polos (craneal y caudal). El borde caudal está conectado al cuerno uterino por el ligamento ovárico. Cada ovario presenta una importante depresión en el borde ventral.

La superficie del ovario está cubierta en gran medida por el peritoneo excepto en el lugar en donde ingresan los nervios y los vasos sanguíneos.

El tejido cortical llega a la superficiesolamente en la depresión del borde ventral, llamada fosa de ovulación, lugar en el cual se produce la ovulación propiamente dicha. La fosa de la ovulación está cubierta por una capa de células poligonales, que son un vestigio del epitelio germinal primitivo.

El ovario tiene función tanto exocrina como endocrina. La función exocrina es el desarrollo de los gametos, y la función endocrina es la producción de hormonas.

➤ **Oviductos:** Los oviductos (también llamados trompas uterinas o salpinx) son largos conductos tortuosos que miden alrededor de 20 a 30 cm de longitud. Se encuentran cubiertos por una delgada capa serosa del ligamento ancho llamada mesosalpinx, la cual además de proveer sostén a los oviductos, sirve como bolsa que recubre los ovarios. El oviducto se divide en tres partes:

- **El infundíbulo:** parte en forma de embudo que se localiza más cercana al ovario. Su superficie se encuentra cubierta de numerosas proyecciones denominadas fimbrias. Estas fimbrias incrementan el área del infundíbulo, lo que facilita el cubrimiento de la superficie del ovario al momento

de la ovulación de tal manera que el óvulo liberado durante la misma tiene una alta posibilidad de ser dirigido dentro del oviducto.

- **La ampolla:** tiene un diámetro relativamente grande, con su parte interna caracterizada por la presencia de pliegues de la mucosa con abundante epitelio ciliar. En esta zona ocurre la fertilización y el desarrollo embrionario temprano.

- **El istmo:** tiene un diámetro menor al de la ampolla y su punto de unión con el útero se denomina unión útero-tubárica (England, 2005).

La principal función del oviducto es el transporte de los gametos al sitio de fertilización (ampolla). El oviducto entra en el útero justo en el extremo caudal del cuerno uterino a través de la papila del oviducto, que se visualiza fácilmente desde el lumen (Brinsko *et al.*, 2011).

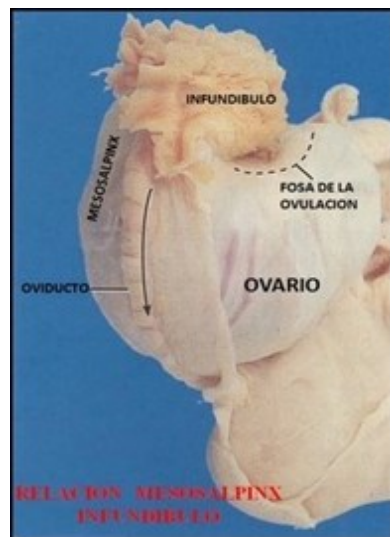


Figura N 2: Estructuras anatómicas del ovario de la yegua (Rivera Gaona, 2012)

➤ **Útero:** en la mayoría de las yeguas presenta forma de Y. Consta del cuello o cérvix, un cuerpo y dos cuernos. La posición puede ser distinta teniendo en cuenta si la vejiga o los intestinos se encuentran llenos. El cuerpo del útero es relativamente grande, midiendo aproximadamente 20 cm de longitud y con un grosor en el extremo anterior de 4 a 6 cm, ensanchándose a medida que se acerca al cérvix. Los cuernos son pequeños y se unen al cuerpo casi perpendicularmente, siendo estos aplanados dorsalmente.

El útero está suspendido dentro de la cavidad pélvica y el abdomen por el ligamento ancho. La capa serosa se continúa con el revestimiento seroso de la cavidad abdominal. La porción de ligamento ancho que se adhiere al útero se llama mesometrio.

En la yegua, el mesometrio se adhiere a la superficie dorsal de los cuernos uterinos. La capa serosa del útero y la capa vascular más la capa muscular longitudinal son continuas con la del ligamento ancho. El miometrio se compone de una capa circular interna y una capa longitudinal externa, la capa exterior longitudinal continua con la de los oviductos.

Por último, la capa más interna del útero consiste en el endometrio, que es glandular y secretor (England, 2005, Brinsko *et al.*, 2011). La vasculatura del útero se suministra a cada lado por tres arterias y venas, que siguen su camino a través del ligamento ancho: arteria vaginal, arteria uterina, arteria ovárica y venas correspondientes.

Los cuernos son convexos, con la curvatura mayor dirigida hacia el frente, hacia abajo y lateralmente. El grosor del borde anterior es el mismo al del cuerpo y se unen en su base por medio del ligamento intercornual, en donde se aprecia una marcada bifurcación. Su consistencia varía dependiendo de la etapa reproductiva y del ciclo estral (Brinsko *et al.*, 2011, Rivera Gaona, 2012).

El cérvix mide de 6 a 8 cm de largo y tiene la forma de un semicono plano. La porción anterior es más ancha y se une al cuerpo del útero. La extremidad posterior se conoce como orificio del cérvix, el cual se protruye en la parte anterior de la vagina formando el fórnix vaginal. Posee varios pliegues longitudinales siendo su pared relativamente delgada con muy poco tejido conectivo (Rivera Gaona, 2012).

➤ **Vagina:** La vagina es un órgano tubular que presenta una longitud aproximada de 15 a 20 cm. Se extiende horizontalmente a través de la cavidad pélvica desde el exterior del cuello uterino hacia el pliegue transversal que recubre el orificio uretral externo. En la mayoría de las yeguas, este pliegue transversal se continúa a ambos lados de la vagina y forma el himen.

El lumen de la vagina está contraído normalmente excepto durante la cría y el paso del potro en el parto. La vagina, incluyendo su mucosa, es altamente

elástica y se expande considerablemente para acomodar el paso del potro. El lumen de la vagina está cubierto con epitelio estratificado escamoso. Este órgano, además de ser considerado órgano copulatorio, es el sitio de expulsión de orina durante la micción. Tiene una gran actividad secretora dependiendo del estado endócrino de la hembra. Durante el período de estro, con predominancia estrogénica, el epitelio escamoso estratificado se engrosa notoriamente protegiendo el interior de la misma durante la cópula. La vagina tiene actividad pasiva durante el parto, siendo parte importante del canal de parto (Brinsko, 2011, Rivera Gaona, 2012).

➤ **Vulva:** La vulva, que por lo general incluye los labios (labios de la vulva) y el clítoris, es la porción más caudal del tracto reproductivo y se considera la primera línea de defensa para proteger contra la contaminación del útero. La hendidura vulvar está representada por una línea vertical (aproximadamente 12-15 cm de longitud), con una porción dorsal puntiaguda y comisuras ventrales redondeadas. El orificio externo del tracto urogenital, que se controla por el músculo constrictor estriado vulvar, se proyecta a lo largo de cada lado de la longitud de los labios de la vulva. El aspecto macroscópico de la vulva puede ser influenciada por la fase del ciclo estral. Aproximadamente dos tercios de la vulva se extienden caudo-ventralmente sobre el arco isquiático (Brinsko *et al.*, 2011, Rivera Gaona, 2012). La vulva de la yegua contiene varias glándulas que producen una secreción esencial para la salud del tracto reproductivo (Squires, 2011).

2) Fisiología y endocrinología del ciclo estral de la yegua

El comienzo de la actividad reproductiva o pubertad en la yegua comienza alrededor de los 12 a 24 meses de edad. Se ha considerado a la yegua como un animal poliéstrico estacional, es decir que presenta ciclos estrales recurrentes en un periodo estacional determinado. El ciclo estral se define como el periodo que transcurre entre una ovulación y la siguiente, siendo ésta acompañada de signos de celo aparentes y concentraciones de progesterona menores a 1ng/ml (Blanchard *et al.*, 2003).

El principal factor que regula la estacionalidad es el fotoperiodo. Existen ciertas etapas en el proceso mediante el cual las especies equinas perciben la luz. El mensaje luminoso es transformado en impulso nervioso por las células retinianas especializadas. Estos impulsos se transmiten a través del núcleo supraquiasmático y del núcleo superior cervical a la glándula pineal. Los pinealocitos responden al estímulo noradrenérgico secretando melatonina.

La melatonina, hormona producida durante la noche actúa como intermediaria entre la percepción del ciclo claro-oscuro y la respuesta hipotálamo-hipofisiaria (Ramírez Montenegro, 2008). Durante la estación invernal no reproductiva, la mayoría de las yeguas se encuentran en un estado de anestro reproductivo o quietud. En este periodo no presentan receptividad al macho, sus ovarios no desarrollan ninguna estructura y hay secreción mínima de hormonas ováricas.

Esta situación cambia durante la primavera y el verano. Mientras que las horas luz del día aumentan, las secreciones hormonales ováricas también aumentan. La yegua comienza a experimentar una serie de ciclos estrales, con una media de duración de 22 días, pudiendo dividirse en dos fases: una fase folicular o estrogénica de duración variable de 4 a 7 días, en la cual la yegua se encuentra sexualmente receptiva al macho y una fase luteal o diéstrica de aproximadamente 14 o 15 días, en la cual la yegua no está receptiva al macho y el tracto genital se prepara para alojar y nutrir al conceptus (López, 2016, Blanchard *et al*,2003).

2.1 Eventos hormonales

La actividad gonadal está bajo control del hipotálamo y la adenohipófisis. El hipotálamo es una estructura relativamente pequeña que se encuentra en la parte central de la base del cerebro y está dividido en dos mitades por el tercer ventrículo, formando la base y las paredes laterales del mismo.

El hipotálamo tiene grupos neuronales, colectivamente denominados *núcleos*, que secretan hormonas peptídicas de dos tipos, ambas importantes para controlar la actividad de la hipófisis: 1) hormonas tróficas, las cuales

influyen sobre la producción de otras hormonas y 2) hormonas que directamente producen su efecto biológico en los tejidos.

La glándula hipofisiaria se divide en tres partes: un lóbulo anterior denominado *adenohipófisis* o *pars distalis*, un lóbulo intermedio llamado *pars intermedia* y uno posterior denominado *neurohipófisis* o *pars nerviosa*. Esta última produce hormonas proteicas de gran importancia en el control de la reproducción: dos gonadotrofinas, la **hormonafolículoestimulante (FSH)** y la **hormonaluteinizante (LH)**, ambas actúan de forma sinérgica en el desarrollo y evolución de los folículos ováricos. La primera tiene un papel más importante durante el crecimiento folicular, mientras que la LH predomina en los estadios finales, desde la maduración hasta la ovulación (Blanchard *et al*, 2003, Cunningham y Klein, 2009).

El principal patrón de liberación de gonadotrofinas es pulsátil y está determinado por la secreción de una hormona sintetizada en el hipotálamo: la **hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH)**. Esta hormona, es la causante de producir la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). El estímulo exacto para la liberación de GnRH y su patrón de secreción no ha sido establecido en la yegua. Sin embargo los cambios cíclicos en la secreción de LH y FSH son indicadores de la liberación de GnRH (Blanchard *et al*, 2003).

En general, el sistema generador de pulsos para la liberación de gonadotrofinas se incrementa en la fase folicular y disminuye en la fase luteal del ciclo estral. Esto se debe a que los estrógenos disminuyen la amplitud de los pulsos y la progesterona disminuye la frecuencia de secreción de gonadotrofinas. Por lo tanto la ausencia de progesterona durante la fase folicular produce un aumento en la frecuencia de pulsos, mientras que su amplitud disminuye por la presencia de estrógenos (Cunningham y Klein, 2009).

La FSH se une a receptores hormonales específicos para FSH, estimulando la producción de estrógenos por parte de los folículos ováricos. Las concentraciones de FSH se elevan durante el final del diestro, coincidiendo con el crecimiento folicular. La oleada de FSH producida durante el diestro es la responsable de generar el o los folículos destinados a ovular en el celo

siguiente. La liberación de LH durante el estro tardío es la responsable de la maduración final y ovulación del folículo pre-ovulatorio.

A medida que el folículo se desarrolla comienza a aumentar la concentración de estradiol en la circulación sistémica. El pico de secreción de estradiol ocurre durante la mitad y el final del estro, aproximadamente 24 hs antes de la oleada de LH. Los estrógenos en la yegua tienen varias funciones.

a) Estimular los centros de comportamiento que inducen la receptividad sexual.

b) Producir un feedback positivo en el hipotálamo y glándula pituitaria que resulta en la secreción de GnRH y luego de LH.

c) Aumentar las secreciones uterinas, cervicales y vaginales que permiten el transporte de los espermatozoides y la fecundación (Squires, 2011).

2.2 Dinámica folicular

Mediante estudios ecográficos fue posible evaluar el comportamiento de los folículos durante el ciclo estral. En la yegua se identifican dos fases diferentes durante el desarrollo final del folículo antral: una relativamente lenta que dura 4-5 días, seguida de una segunda fase de crecimiento acelerado con la misma duración que termina con la ovulación. Al tercer o cuarto día de la de crecimiento rápido del folículo, éste requiere estar expuesto a pulsos más rápidos de gonadotrofinas, de modo que el folículo pueda completar su patrón de desarrollo normal hasta la ovulación. Esta situación suele coincidir con el inicio de la regresión del cuerpo lúteo (CL), que permite en forma pasiva el incremento de los pulsos de secreción de gonadotrofinas.

Es importante tener en cuenta que la selección del folículo dominante está altamente influenciada por su diámetro al momento de la desviación folicular. Esta desviación comienza hacia el final del crecimiento lento de los folículos de la onda y se caracteriza por el crecimiento continuo del folículo dominante en desarrollo y la regresión de los folículos subordinados. Uno de los eventos por el cual el folículo dominante se mantiene y continúa su crecimiento es por la secreción de *inhibina*. Esta hormona peptídica es producida por la capa granulosa del folículo y su función principal es inhibir la secreción de FSH. El folículo dominante sigue creciendo ya que presenta mayor cantidad de

receptores para dicha hormona, mientras que en el resto de los folículos, la falta de la misma provoca regresión e invasión de células inflamatorias (Cunningham y Klein, 2009).

Durante el ciclo estral en la yegua se presentan ondas grandes con folículos ovulatorios y ondas menores anovulatorias. En las ondas foliculares mayores, la desviación ocurre con el desarrollo de un folículo dominante, cuyo diámetro preovulatorio es de 45-50 mm. Las ondas que emergen en la segunda mitad del ciclo estral y culminan con la ovulación se clasifican como ondas foliculares primarias, y las ondas que surgen al final del ciclo y el inicio del diestro se denominan secundarias (Rivera Gaona, 2012). La oleada de LH es aparentemente responsable de la maduración final del folículo preovulatorio, la inducción de la ovulación y el inicio de la formación del CL. La ovulación generalmente ocurre uno o dos días previos a la finalización del estro. Aproximadamente 24 hs después de la ovulación la cavidad folicular se llena de sangre formando un cuerpo hemorrágico. Las células de la granulosa se organizan dentro de la cavidad folicular y forman el CL. La secreción de progesterona por el CL produce niveles sistémicos mayores a 1ng/ml durante los dos o tres días posteriores a la ovulación. Las concentraciones de progesterona continúan aumentando hasta alcanzar su pico máximo al día seis (Squires, 2011). Si no se produce fecundación, la prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) será la encargada de provocar la regresión (luteólisis) del CL entre el día 13-16, y la consecuente disminución de progesterona. La $PGF_{2\alpha}$ viaja al ovario vía transferencia desde la vena uterina hasta la arteria ovárica. Una vez que llega al ovario produce la regresión del cuerpo lúteo (Squires, 2011, Rivera Gaona, 2012). Los estrógenos y progesterona tienen efectos directos con el tono del útero, del cérvix y de las secreciones uterinas, cervicales y vaginales. Durante el estro, el cérvix está levemente hinchado de color rosado y posicionado sobre el piso de la vagina. Las secreciones uterinas y cervicales son más abundantes y líquidas durante el estro a diferencia del diestro. Una vez que se produce la ovulación, las concentraciones de progesterona comienzan a aumentar, provocando que el cérvix este firme, pálido y elevado del piso de la vagina. La abertura del cérvix se encuentra firmemente cerrada. Las secreciones uterinas, vaginales y cervicales son muy escasas y pastosas cuando la yegua está bajo

influencia de la progesterona. El útero se vuelve redondeado, tubular y firme durante el diestro tardío o preñez temprana (Squires, 2011).

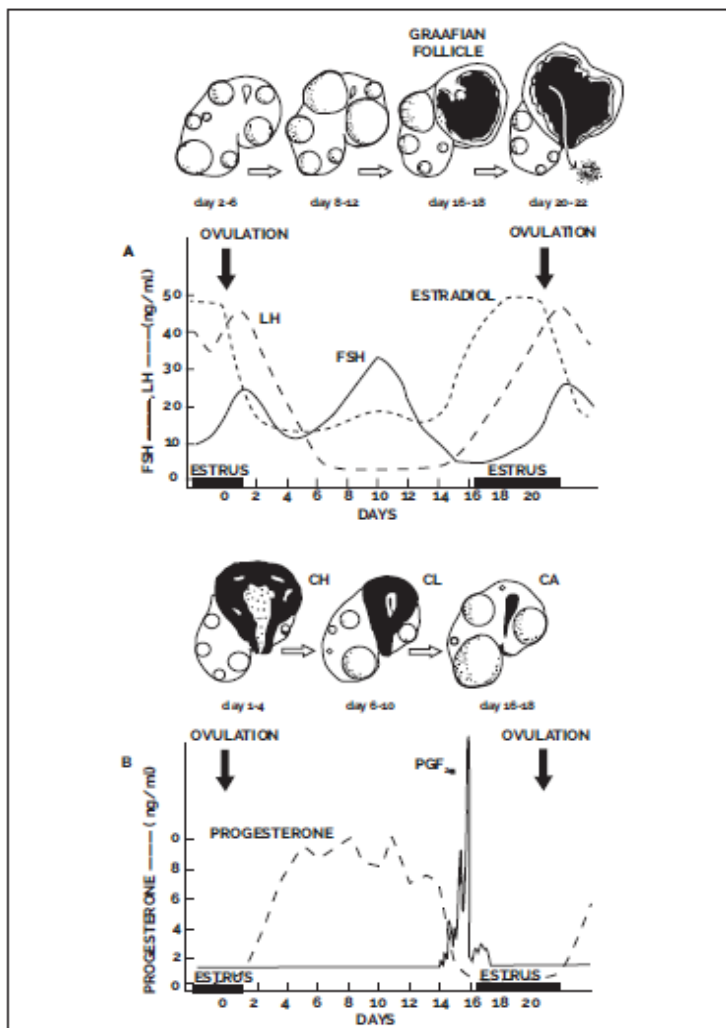


Figura N° 3: Cuadro descriptivo de la dinámica folicular y eventos hormonales en la yegua (Squires, 2011).

3) Fisiología de la yegua gestante

1) *Fecundación:*

El óvulo, una vez liberado desde el folículo, es captado por las fimbrias del oviducto y dirigido hacia su interior, hasta llegar a la región de la ampolla, donde espera la llegada del espermatozoide. No puede pasar a través del útero hasta que no haya sido fecundado. Un gran número de espermatozoides se depositan en el tracto genital femenino en la eyaculación, pero se sabe poco sobre las características especiales que permiten a un espermatozoide en particular alcanzar el ovocito y fecundarlo en preferencia a los otros millones a su alrededor. Dentro del tracto genital de la hembra, los espermatozoides tienen que atravesar diferentes barreras físicas y experimentar interacciones complejas (Vázquez *et al*, 2016).

El espermatozoide, habiendo sido eyaculado en la parte superior del cuello del útero, hace su camino a través del útero hasta la unión útero-tubárica. Los espermatozoides se mueven por medio de las contracciones del tracto genital de la hembra y la conducción de sus propias colas. Una teoría sostiene que son atraídos hacia el óvulo por factores quimiotácticos producidos por el óvulo (Morel, 2003).

Al llegar a la unión útero-tubárica, pasan a través del oviducto y llegan al encuentro del ovulo en la ampolla. Una vez en el útero, los espermatozoides entran en contacto con diferentes tipos celulares (interacción célula-célula), entre ellos los leucocitos polimorfonucleares (PMN), que están presentes en el lumen del útero de la montada. Al llegar al oviducto, el ambiente es más adecuado para promover la viabilidad del espermatozoide y permitir que se lleven a cabo las interacciones de los gametos y el desarrollo temprano del embrión (Vázquez *et al*, 2016).

Cuando la cabeza del espermatozoide se encuentra con la membrana vitelina del óvulo, se produce la fusión. Esta fusión inicia la división meiótica final, resultando en tres cuerpos polares y un único óvulo. Los núcleos de los espermatozoides y el huevo se unen. Su complemento haploide (32) de cromosomas se une para dar el complemento diploide (64) del nuevo individuo.

Esta combinación en el material genético dictará todas las características del nuevo individuo.

Con el fin de garantizar la fusión de un pronúcleo masculino y un pronúcleo femenino, es esencial asegurarse de que sólo un espermatozoide penetrará en la membrana vitelina del óvulo. La poliesperma (penetración de más de un espermatozoide) es impedida por una reacción que ocurre tan pronto como un espermatozoide toca la membrana vitelina. El producto final de la fertilización se denomina *conceptus*, y llega al útero cinco o seis días después de la ovulación (Morel, 2003).

2) Desarrollo embrionario temprano

Veinticuatro horas después del apareamiento, el óvulo fecundado, ahora denominado ***cigoto***, se ha dividido por mitosis en dos células. En esta etapa, la capa gelatinosa externa se pierde y el óvulo fecundado, todavía dentro de la zona pelúcida, sigue dividiéndose en 4, 8, 16, 32 células, etc. A los 4 días de edad es un conjunto de células contenidas dentro de su zona pelúcida. Esta nueva estructura es denominada ***mórula***. La *mórula* hace su camino hacia la unión útero-tubárica, y luego de atravesarla llega al útero en el día 5-6. Al día 5, una fina capa de glicoproteína acelular, denominada cápsula, aparece en el espacio entre el ectodermo y la zona pelúcida. La función de esta estructura no está aún identificada. Puede que cumpla un papel en la prevención de la adhesión del embrión al endometrio, lo que permite una fase de movilidad prolongada del *conceptus* equino (England, 2005).

A partir del día 6, el tamaño del embrión comienza a aumentar. La obtención de nutrientes para su crecimiento y división se logra a través de las secreciones uterinas circundantes (leche uterina), ya que en esta etapa ha agotado sus propias reservas. La *mórula* está ahora en su fase de movilidad, flotando libremente por el útero (England, 2005).

El día 9 marca la diferenciación de dos capas germinales (capas celulares): el ectodermo, presente en la capa celular externa del blastocisto, y el endodermo, que aparece como capa celular interna. El endodermo crece y se desarrolla en el interior del trofoblasto, para dar una capa interna completa. Tanto el endodermo como el ectodermo formarán la pared del saco vitelino y

proporcionaran los medios para que el disco embrionario reciba su alimento. El blastocele, pasa a denominarse **saco vitelino**. Esta estructura actúa como almacén temporal de nutrientes. Esta seguirá siendo la principal fuente de nutrientes del embrión hasta su implantación. A los 14 días, cuando el embrión ha alcanzado 1,3 cm de diámetro, comienza a desarrollarse una tercera capa de células germinales: el mesodermo. Al día 16, aparecen pliegues en la capa celular externa y los inicios de la capa protectora que rodearán al embrión se hacen evidentes. El ectodermo se pliega sobre la parte superior del disco embrionario, tomando también al mesodermo. La capa exterior de estos se denomina **corion**. Estos dos pliegues se funden, produciendo un líquido de protección para el disco embrionario: el **saco amniótico**, que contiene el fluido amniótico. El saco amniótico proporcionará una protección en el ambiente en el que se desarrollará el embrión.

Los primeros 14 días de preñez son similares hormonalmente hablando a la fase luteal con ausencia de preñez. Sin embargo en la yegua vacía el endometrio secreta prostaglandina aproximadamente 15 días después de la ovulación. Esto causa la regresión del cuerpo lúteo y el regreso del estro (England, 2005).

En las yeguas preñadas, hay un aumento del tono uterino que se presenta a partir de los días 14-16 de gestación. Esto se debe a una secreción continua de progesterona proveniente del cuerpo lúteo. Los efectos de la progesterona en el útero durante la gestación son esenciales para las interacciones físicas dinámicas entre la vesícula embrionaria y el útero las cuales están involucrados con la movilidad, fijación, orientación y la supervivencia continua del conceptus (Vanderwall, 2011).

➤ **Cuerpo lúteo primario y secundario**

El cuerpo lúteo que se forma después de la ovulación es llamado cuerpo lúteo primario. La producción de progesterona por parte de éste empieza a declinar a partir del día 25. La producción de Gonadotrofina coriónica equina (eCG) por parte de las copas endometriales es detectable por primera vez a partir del día 35 a 40 después de la ovulación, llegando al pico de concentración cerca del día 60. La eCG, posee acción LH, por lo que induce la

ovulación o luteinización de los folículos en desarrollo de las ondas foliculares presentes en los ovarios. De esta forma, la eCG es responsable del mantenimiento de la producción de progesterona tanto por su acción luteotrófica sobre el cuerpo lúteo primario, como por el desarrollo de los cuerpos lúteos secundarios (CLs), también llamados accesorios o suplementarios (England, 2005).

➤ **Reconocimiento materno de la preñez**

Para que se establezca la gestación de manera exitosa, se debe evitar la liberación de prostaglandina $F_{2\alpha}$ por parte de las células endometriales. Para esto, el embrión equino hace notar su presencia al organismo materno mediante señales bioquímicas (Sánchez, 2016).

Este evento fisiológico complejo se conoce como Reconocimiento Materno de la Gestación (RMG). Un aspecto crucial de este proceso es el alargamiento de la vida del cuerpo lúteo, es decir, la interrupción de la ciclicidad ovárica, asegurando así la provisión continua de progesterona (Sánchez, 2016).

➤ **Mantenimiento del cuerpo lúteo**

El cuerpo lúteo es una estructura ovárica que tiene como función principal la secreción de progesterona (P_4), cuya función consiste en preparar al útero para la implantación y mantenimiento de la preñez, aumentando la actividad de las glándulas secretoras en el endometrio al mismo tiempo que inhibe la movilidad del miometrio.

Cuando una monta no ha sido efectiva, el ciclo estral normal de la yegua culmina con la regresión del cuerpo lúteo, evento conocido como luteólisis, que involucra la pérdida de la capacidad de sintetizar y secretar progesterona, seguida por la degeneración de las células que lo conforman. Por consiguiente los niveles de progesterona en la circulación sanguínea caen a niveles basales y la yegua retorna a un nuevo estro.

Si no existe embrión y no se produce el reconocimiento materno, el útero produce $PGF_{2\alpha}$. Ésta es transportada por vía sanguínea desde el endometrio hacia el cuerpo lúteo en el ovario para ejercer su acción luteolítica. La $PGF_{2\alpha}$ se libera en forma de pulsos intermitentes por el endometrio alrededor de los

días 12-14 después de la ovulación, por lo que existe una regulación del momento en que en el útero se inicia la síntesis y liberación de esta hormona.

El mantenimiento del CL y la producción continua de progesterona es una condición crítica de la cual depende el desarrollo temprano del embrión, implantación y el mantenimiento de la gestación, ya que esta hormona es responsable de mantener un ambiente uterino receptivo para que el embrión sobreviva.

El embrión debe generar señales bioquímicas que alerten su presencia en el útero materno. El embrión equino permanece suspendido en el fluido uterino por un tiempo considerable por lo que es frecuentemente propulsado por contracciones uterinas que lo hacen “migrar” por toda la superficie del endometrio. La migración intrauterina del embrión parece ser necesaria para asegurar la interacción repetida y frecuente con una proporción considerable del endometrio (Sánchez, 2016).

4) Transferencia embrionaria en equinos

La transferencia embrionaria es una valiosa técnica de reproducción asistida en la yegua. Según Vanderwall (2000), las aplicaciones de la transferencia embrionaria incluyen la obtención de productos:

- De yeguas en edades avanzadas y valiosas, las cuales no son capaces de llevar a término una gestación.
- De potrancas de dos años, que no alcanzaron su madurez sexual y se encuentran en pleno desarrollo y crecimiento.
- De caballos de deporte, para evitar la interrupción de su entrenamiento.
- En caso de yeguas con historial de reabsorción y/o aborto.

a. Selección de la yegua donante

Las mejores donantes de embriones son yeguas con buena condición corporal, reproductivamente sanas y libres de estrés y enfermedad.

Previo al intento de realizar una transferencia embrionaria, las donantes deben ser sometidas a un examen reproductivo integral. Esto incluye,

palpación y ultrasonografía genital transrectal y observación de la conducta sexual mediante el uso del retajo. Las yeguas donantes deben examinarse de forma rutinaria para determinar el día óptimo de ovulación y programar el día de recuperación del embrión (MacCue y Squires, 2015). El día de la ovulación de la donante es considerado el día 0; entre los días 6 y 9 post ovulación se realiza la recuperación del embrión mediante lavaje uterino. Luego de realizado el lavaje, se administran 9 mg/Kg de Prostaglandina F_{2α}, para que vuelva a presentar celo lo antes posible. En promedio, vuelven a entrar en celo 4 a 5 días después de la aplicación (Palma, 2007).

b. Selección de la yegua receptora

La selección y el manejo de yeguas receptoras pueden ser los factores más importantes que afecten los resultados de un programa de transferencia embrionaria. Las yeguas receptoras deben tener ciclos estrales normales, y estar libres de anomalías uterinas y ováricas. La edad óptima es de 3 a 10 años. La sincronización entre la yegua donante y la yegua receptora puede ser llevada a cabo usando prostaglandina F_{2α} (PGF₂). Las yeguas en celo son examinadas diariamente por palpación rectal y ultrasonografía para monitorear el crecimiento folicular y detectar la ovulación. La sincronización de la ovulación entre la yegua receptora y la yegua donante tiene un intervalo de 0 a -3 días (ej. la yegua receptora puede ovular el mismo día y hasta 3 días después que la yegua donante) (Palma, 2007).

c. Recolección de embriones

Los embriones equinos son transportados a través del oviducto hacia el útero entre los días 5-6 post ovulación, estando en estadios de desarrollo que van desde mórula compacta a blastocito temprano. Después de entrar al lumen uterino el embrión crece abruptamente hasta llegar a blastocito expandido (Vanderwall, 2000).

El lavaje uterino debe programarse sobre la base de las fechas conocidas de ovulación y otros factores, como la edad de la yegua donante y el tipo de semen utilizado. La recolección de embriones suele realizarse 7 u 8 días después de la ovulación, aunque algunos autores afirman que es conveniente

el lavaje al día 9 post ovulación en yeguas de edad avanzada. Los embriones recuperados el día 6 pueden ser utilizados para crioconservación.

Durante el procedimiento de recolección de embriones, la yegua es colocada en un brete o potro. La mayoría de las yeguas donantes no requieren sedación para realizar el lavaje uterino. La sedación puede justificarse en yeguas jóvenes, pequeñas, excitadas o peligrosas. Las opciones para la sedación incluyen acepromazina, clorhidrato de xilazina y clorhidrato de detomidina.

Antes de comenzar el lavaje, se envuelve la cola de la yegua con una venda y se retira el estiércol en el recto para facilitar el masaje uterino, el cual se realiza a menudo por recto durante el procedimiento de descarga. Se lava el perineo un mínimo de tres veces con jabón no residual, se enjuaga completamente con agua y se seca con toallas de papel. La vulva también debe limpiarse con una compresa de algodón húmedo o toallas de papel para eliminar los residuos orgánicos que pueden contaminar la yegua o el líquido de descarga (MacCue y Squires, 2015).

Para realizar el lavaje se utiliza un catéter estéril, de 80 cm de longitud y 8,0 mm de diámetro, con un manguito inflable. Se utiliza una sonda con forma de Y, con pinzas para regular el flujo de entrada y salida de líquido. Este tipo de sonda sirve para conectar el catéter uterino con un contenedor de filtro embrionario. El operador se coloca un guante de plástico estéril con gel lubricante estéril e introduce la sonda por la vagina hasta llegar al cuerpo del útero, en donde insufla el manguito con 60 ml de aire. El útero es llenado con uno o dos litros de solución Ringer lactato por cada lavado; después de llenado el útero se le permite al líquido salir y pasar a través de un filtro para embriones de 0,75 μm de tamaño de poro (Vanderwall, 2000, MacCue y Squires, 2015). Una vez finalizado el lavado, el contenido del filtro es vaciado en una placa de Petri con cuadrícula para la búsqueda. El líquido recuperado es revisado utilizando una lupa estereoscópica a un aumento de 15x. Los embriones de 8 días usualmente se ven a simple vista. Cuando un embrión es identificado, es lavado como mínimo por 3 pasajes sucesivos en gotas de 1 ml de medio de mantenimiento para embriones. Después del lavado el embrión se coloca en el mismo medio en una placa de Petri de 35 x 10 mm. Los embriones pueden ser

tomados utilizando pajuelas de 0,25 o 0,5 ml, pipetas capilares de vidrio de 25 μ l, o cualquier otro instrumento adosado a una jeringa. Cada vez que se tome un embrión con un tipo de estos capilares o pajuelas, la columna de líquido que contiene el embrión debe ir rodeada de una burbuja de aire en cada extremo y luego una columna de medio líquido sólo (Vanderwall, 2000). Una vez preparado, el embrión es transferido a una yegua receptora.

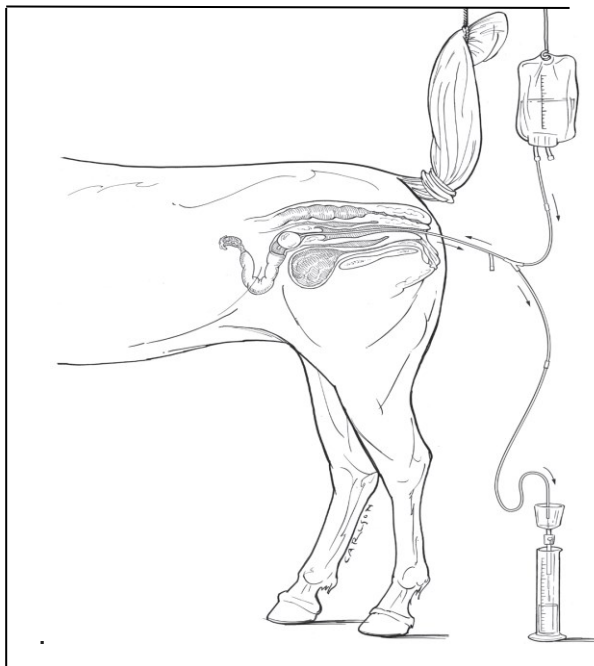


Figura N° 4: Procedimiento de recolección de embrión. Se observa que el manguito del catéter uterino se infla y se coloca dentro del cérvix. La sonda en forma de Y conecta el catéter a un recipiente de medios de descarga con el filtro de embriones (MacCue y Squires, 2015).

5) Ultrasonografía

La ultrasonografía es una de las técnicas complementarias de diagnóstico más revolucionarias de los últimos 20 años en medicina, básicamente por tres principios:

- Es no invasiva
- No produce alteraciones biológicas en los tejidos
- Permite visualizar imágenes en tiempo real

5.1 Principios físicos y fundamentos de interpretación

Las ondas sonoras son producidas por la vibración de las moléculas de aire. Estas ondas se transmiten linealmente y pueden ser medidas en términos de ciclos por segundo (herz). La mayoría de los equipos utilizados en reproducción equina operan en frecuencias entre 3,5 y 7,5 mega herz (Mhz). Para generar ultrasonido es necesario que los objetos que vibren sean de muy pequeño tamaño. Esto se logra estimulando eléctricamente pequeños cristales piezoeléctricos de cuarzo o cerámica. Esta transformación de energía eléctrica a mecánica se denomina transducción y se logra en la parte del equipo denominado *transductor*(Losinno, 1996).

En cuanto a la imagen ultrasónica, la misma es generada emitiendo ondas sonoras de alta frecuencia dentro del cuerpo (transmisión) y registrando la intensidad y ubicación de los ecos recibidos (reflexión). Cuando el transductor que contiene el cristal vibratorio se coloca en contacto con un tejido blando la onda sonora es transmitida a través de estos tejidos y, dependiendo de su composición y densidad puede ser:

1. Absorbida (absorción)
2. Penetrar y pasar a través de los tejidos (penetración)
3. Ser reflejada (reflexión) produciendo eco, que es registrado por el transductor y, transformado en un impulso eléctrico es decodificado en el equipo produciendo una imagen bidimensional.

Teniendo en cuenta esto, los niveles de eco serán distintos para cada caso, observándose en la imagen un color blanco brillante para hueso, gas, tejido fibroso y grasa, un color gris para tejido blando y negro para el líquido.

Hay que destacar que a menor frecuencia de sonido, mayor es la penetración en los tejidos y menor es la resolución de la imagen. Por ejemplo para ginecología en yeguas se utilizan transductores de 5 Mhz, con una penetración de 7 a 10 cm, mientras que para ecografías transabdominales los transductores son de 3,5 Mhz, con 12 a 15 cm de penetración (Losinno, 1996).

5.2 Tipos de transductores

Los tipos de transductores más usados pueden ser:

❖ *Sectoriales*: emiten una onda divergente en forma triangular, desde un solo punto con el ápex en la punta del transductor. Se utiliza generalmente para ecocardiografías y visualización de tendones.

❖ *Lineales*: los cristales piezoeléctricos están orientados en línea en el transductor. Sus características son:

- Emiten una onda de forma rectangular
- Son menos versátiles en la configuración de la onda
- Necesitan mayor área de contacto
- Se utilizan generalmente para exámenes transrectales y transabdominales en grandes animales
 - La onda está orientada en sentido longitudinal del tracto reproductivo de la yegua
 - El cuerpo del útero se ve en sección sagital y los cuernos en sección transversal

Convexos: los cristales se encuentran en línea, pero la superficie de contacto del transductor es convexa. Las ondas son emitidas en forma radial y la imagen ultrasónica se observa en forma de triángulo (Losinno, 1996).

5.3 La yegua vacía

Debido a la posición anatómica de los ovarios, generalmente los transductores aplicados en la superficie medial o dorsal. Por su extrema movilidad, puede resultar dificultoso identificar correctamente los polos del ovario por ultrasonografía.

❖ **Folículos:** presentan una imagen redondeada y circunscripta anecoica; sus formas irregulares se asocian a la compresión por estructuras adyacentes o folículos preovulatorios. Con equipos de 5 Mhz es posible evidenciar folículos mayores a 3 mm.

❖ **Cuerpo lúteo (CL):** la morfología ultrasónica de los CL presenta importantes variaciones dentro del ciclo y generalmente son desde el día de la ovulación hasta el día 10 a14 del ciclo. Morfológicamente los CL aparecen como estructuras ecogénicas compactas y uniformes ya desde el día 1 post ovulación en el 50% de los casos. En otros casos se observa una prominente estructura anecoica central que generalmente excede el 10% del área total del CL y que va disminuyendo de tamaño con el tiempo.

❖ **Útero:** durante el estro y debido al edema, la ecotextura es heterogénea y presenta áreas hiperecoicas atribuibles a la porción de tejido denso de los pliegues endometriales y áreas hipoecoicas atribuibles a la porción edematosa de los pliegues (rueda de carro). Durante el diestro, la ecotextura es relativamente homogénea y es difícil distinguir los pliegues individuales. El lumen es identificado por una línea hiperecoica central (Losinno, 1996).

A. Determinación del periodo reproductivo y estado del ciclo

a) Periodo anovulatorio: anestro invernal

- Folículos no mayores de 15-20 mm
- Ausencia de cuerpo lúteo

b) Periodo transicional

- Folículos mayores a 25 mm por más de diez días, sin ovulación
- Ausencia de cuerpo lúteo

c) Periodo ovulatorio: fase folicular

- Folículos mayores a 30 mm
- Presencia de cuerpo lúteo en regresión (tamaño pequeño) con alta ecogenicidad

d) Periodo ovulatorio. Fase luteal

- Presencia de cuerpo lúteo
- Folículos menores de 35 mm



Figura N°5: Ultrasonografía transrectal de una yegua con folículos en el ovario izquierdo (Brinsko et al., 2011).

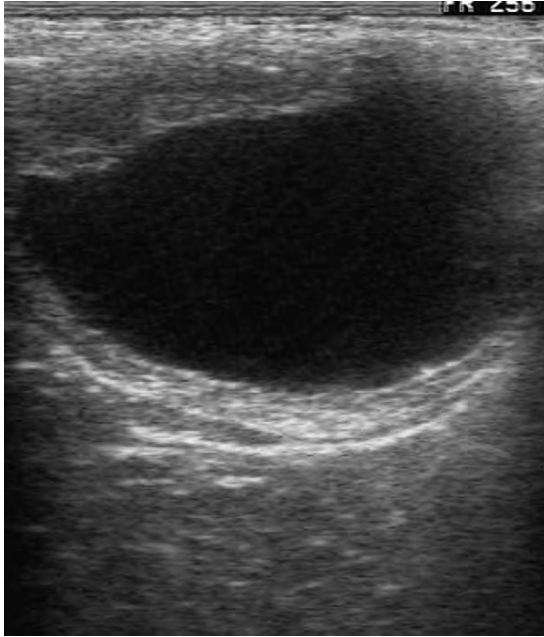


Figura N°6: Imagen de ultrasonografía de un folículo preovulatorio (Brinskoet *al*, 2011).

5.4 La yegua gestante

➤ *Diagnóstico precoz:*

Se pueden utilizar transductores de 5 Mhz, al día 11 post ovulación, obteniendo un 90% de certeza; si se utilizan transductores de 7,5 Mhz es posible realizar la ecografía al día 9 o 10, en los cuales el tamaño de la vesícula embrionaria es de aproximadamente 3 a 5 mm de diámetro.

➤ Desarrollo de la vesícula:

○ Las vesículas más pequeñas generalmente se encuentran en el cuerpo del útero.

○ Entre los días 10-16 presenta forma redondeada, es totalmente anecoica y tiene un crecimiento expansivo (3 mm/día).

○ Entre los días 18-26 el crecimiento presenta una meseta y el tamaño de la vesícula no es un buen indicador de la edad. En cuanto a la forma tiende a adoptar un aspecto de pera con el vértice hacia dorsal.

El embrión es visible aproximadamente a partir del día 20 en el hemisferio ventral de la vesícula (Losinno, 1996).

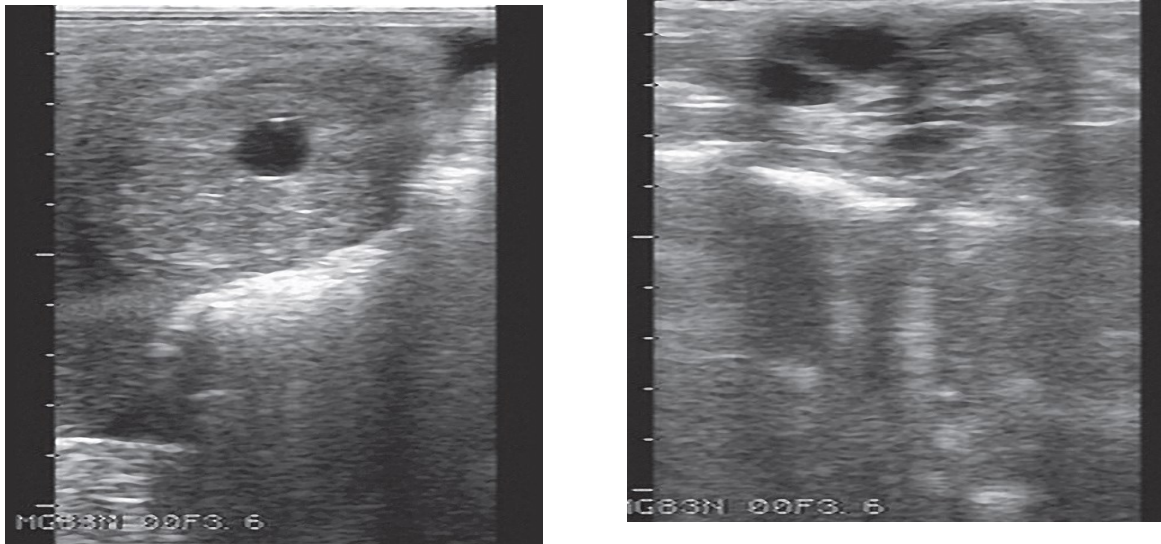


Figura N°7:Imagen ecográfica de una yegua con una vesícula embrionaria de 14 días dentro del cuerno uterino (figura izquierda) y regresión del cuerpo lúteo dentro del ovario (figura derecha) (Squires, 2015).

6)Caso clínico

❖ Características del Haras

El Haras se encuentra ubicado a 10 km de la localidad de Tandil. El campo cuenta con 900 hectáreas (has) de las cuales 150 aproximadamente están destinadas a la parte Haras; de las cuales 60 has están alambradas y divididas en piquetes de alrededor de 4 has cada uno. La producción forrajera se maneja con pasturas consociadas a base de gramíneas y leguminosas sumado a verdeos de verano con sojas de pastoreo.

Actualmente, la carga animal dentro del establecimiento está conformada por:

- 2 padrillos
- 20 yeguas
- 15 potrillos de 1 año
- 12 potrillos de 2 años
- 4 caballos en competencia
- 6 potrillos recién nacidos
- 20 yeguas receptoras

El plan sanitario que se implementa en el Haras consta de vacunaciones contra las siguientes enfermedades:

- **Influenza:** ante cualquier viaje de algún animal.
- **Encefalomyelitis:** una dosis en el mes de enero.
- **Herpes Virus Equino tipo Ip e Ib:** 4 dosis, en el 3ro, 5to, 7mo y 9vo mes de gestación.
- **Aborto infeccioso equino**
- **Adenitis:** potrillos de seis meses, 2 dosis con intervalo de 20 días.
- **Antiparasitarios:** cada 3 meses para todas las categorías.

Al inicio de la temporada de partos, las yeguas permanecen en el campo en los denominados “lotes de parto”. Las hembras próximas al parto pasan a los “lotes de parto” en los cuales se intensifica el control sobre las mismas. A medida que van naciendo los potrillos se les realiza controles de rutina y a los 20 días ingresan a los lotes de maternidad.

❖ **Presentación del caso clínico**

De acuerdo a la metodología de trabajo realizada en el haras, el día 28 de octubre de 2015, se realizó el examen ecográfico de preñez a dos yeguas receptoras, a las cuales se les había implantado un embrión de 14 días de vida (ovulación 14/10), habiendo ovulado una de las yeguas, 12 días antes del diagnóstico (16/10), y la otra, 11 días antes (17/10) llamándose de esa forma a la primer yegua “-2” y a la segunda “-3”, de acuerdo al lenguaje comúnmente utilizado en transferencia embrionaria. Al realizar las ecografías, el embrión de la yegua -2 (ovulada dos días después que la donante) se encontraba alojado en el cuerno derecho, ya que las contracciones uterinas de la yegua no le permitían moverse a través del útero. Distinto fue el caso de la yegua -3 (ovulada 3 días después que la donante), que el embrión fue encontrado movilizándose a través del cuerpo uterino, precisamente por encima de la base ósea de la cavidad pelviana. De ese modo, al introducir el transductor, se veía deformado ya que dada su ubicación, estaba siendo presionado contra el piso de la cadera.

Siete días después, se realizó otro estudio ecográfico, en el cual la yegua -3 había perdido su gestación, considerando que se produjo una reabsorción embrionaria temprana.

La hipótesis de la posible causa de la pérdida embrionaria es que, durante la evaluación ecográfica del día 28 de Octubre, el embrión sufrió alguna injuria de tipo física durante el procedimiento de limpieza rectal por la introducción del brazo del veterinario en la cavidad llena de materia fecal y/o durante el examen ultrasonográfico.

7) Discusión

La transferencia embrionaria equina es una de las técnicas de reproducción asistida más comúnmente utilizadas (Vanderwall, 2011). El transporte de los

embriones y el hecho de que los materiales necesarios para la recolección y transporte sean accesibles, permite que más veterinarios ofrezcan el servicio de transferencia a los clientes que solicitan esta técnica. Sin embargo, es fundamental conocer y evaluar el estado reproductivo de las yeguas, tanto donantes como receptoras para lograr resultados óptimos.

MacCue y Squires (2015) postulan que las yeguas donantes deben ser sometidas a un examen reproductivo integral, incluyendo palpación y ultrasonografía genital transrectal y observación de la conducta sexual mediante el uso del retajo. Es importante examinarlas de forma rutinaria para determinar el día de ovulación y programar el día de recuperación del embrión.

La selección de la yegua receptora es un factor clave para lograr resultados exitosos en esta técnica. La sincronización de la ovulación entre la yegua receptora y la yegua donante tiene un intervalo de 0 a -3 días (ej.: la yegua receptora puede ovular el mismo día y hasta 3 días después que la yegua donante) (Palma, 2007).

En el caso clínico que se presentó en el haras se utilizó una yegua donante de la cual se recuperaron dos embriones, que fueron transferidos a dos yeguas receptoras que habían ovulado dos y tres días después que la donante (-2 y -3 respectivamente).

Para la recolección embrionaria, se utilizó la técnica descrita por Vanderwall (2000), que propone realizar el lavaje con una sonda en forma de Y, con pinzas para regular la entrada y salida de líquido, un catéter uterino con un manguito inflable y un contenedor de filtro embrionario, con la salvedad que para el lavaje se utilizó solución salina, a diferencia de lo planteado por MacCue y Squires (2015) que recomiendan realizarlo con solución Ringer lactato.

La elección de las yeguas receptoras se realizó teniendo en cuenta los factores descritos por Palma (2007), en los cuales recomienda elegir receptoras de ciclos estrales normales, de edades entre 3 y 10 años y libres de anomalías uterinas y ováricas.

La mortalidad embrionaria puede definirse como las pérdidas embrionarias que ocurren desde el momento de la fecundación hasta el día 40 de la gestación. La incidencia normal en yeguas en edad reproductiva y sin

patologías aparentes es del 6,5 al 15%, lo cual ocurre habitualmente entre los días 12 y 39 después de la ovulación y disminuye a medida que avanza la gestación (Paredes Higuera, 2013).

Las causas de la muerte embrionaria pueden ser de origen materno, embrionario o por factores exógenos; entre estos últimos se deben considerar los problemas infecciosos, las deficiencias nutricionales y los defectos genéticos (Paredes Higuera, 2013).

Es importante destacar que entre los días 8 y 10 de vida (etapa de diferenciación) el conceptus es muy susceptible a las injurias físicas, drogas, productos químicos, enfermedad, radiación, etc. Esto puede perturbar la diferenciación, dando lugar a deformidades, anormalidades y un alto riesgo de aborto y/o reabsorción (England, 2005).

El embrión se mantiene en movimiento hasta el día 17 postovulación, cuando ocurre un incremento marcado en el tono miometrial que inmoviliza el conceptus fijándolo en el sitio de la posible implantación en la base de uno de los cuernos uterinos. La fijación está dada por el aumento gradual de tono uterino, disminución del diámetro uterino y el aumento del tamaño del embrión (Paredes Higuera, 2013). Sin embargo, hay que tener en cuenta que hasta el día 14 el embrión permanece móvil por todo el útero, luego, debido a la fuerte contracción uterina que se produce en respuesta al aumento de progesterona, sólo se mueve entre los cuernos uterinos, para implantarse finalmente al día 17 en uno de ellos (Perkins, datos sin publicar).

En los centros de transferencia embrionaria, el diagnóstico para confirmación de preñez se realiza mediante ecografía. La primera se lleva a cabo habitualmente en el día 14 de vida del embrión. En algunos centros se está incorporando la utilización de ecógrafos con zoom, lo cual permite detectar preñeces a los 11 días de vida, logrando así obtener los resultados con antelación. La segunda ecografía se realiza al día 60 para determinar el sexo del embrión. Los porcentajes de pérdidas embrionarias que existen entre la primera y segunda ecografía varía de un 5 a un 15% (Perkins, datos sin publicar).

En el presente caso, se plantea que el resultado de la técnica se vio afectado por el día en que se realizó la primera ecografía de gestación a la

yegua receptora, lo cual pudo haber provocado la reabsorción embrionaria temprana que se observó en un segundo estudio ecográfico realizado siete días después.

8) Conclusiones

Luego de analizar el presente caso clínico, se llegó a las siguientes conclusiones:

- La yegua receptora utilizada había ovulado tres días después que la yegua donante. En este caso, al realizar la primera ecografía al día 14 de vida del embrión, la yegua receptora presentaba 11 días de diestro, por lo tanto, el grado de contracciones uterinas no fue suficiente para que el embrión cese su movimiento. Así, al momento de realizar la ecografía se encontró a un embrión de 14 días de vida en el cuerpo uterino, sobre la base ósea de la pelvis. La mano del operario al momento de extraer la materia fecal y el transductor pudieron provocar presión sobre el embrión, el cual pudo haber sufrido una injuria física suficiente como para provocar la muerte embrionaria que sobrevino.
- Tener en cuenta los días de diestro de la yegua receptora en vez de los días de vida del embrión a la hora de realizar la primera evaluación ecográfica podría disminuir el número de muertes embrionarias tempranas.

9) Referencias bibliográficas

- Bergfelt, R. Anatomy and Physiology of the mare. En; Samper, J.C. (2009). Equine breeding management and artificial insemination, chapter 11. Pp: 113-119. Editorial SAUNDER El Sevier.
- Blanchard, T.L. Varner D.D, Schumacher, J, Love, C, Brinsko, S.P, Rugby S.L Reproductive Physiology of the No pregnant Mare. In: Manual of equine reproduction (2003), chapter 2, pp 9-11. Editorial Mosby, segunda edición.
- Brinsko, S.P, Blanchard, T.I, Varner D.D, Schumacher, J, Love, C, Hinrichs, K and Hartman, D. Chaper I: Reproductive anatomy in the mare, pp 1-9 and Chaper V: Transrectal Ultrasonography in Broodmare Practice. Pp: 58-65. In: Manual of equine reproduction (2011). Editorial MOSBY ELSEVIER.
- Conejo Barruso, I. García Gálvez, Transferencia de embriones Disponible en: www.equisan.com/images/pdf/transferenciaembriones.pdf. Fecha de consulta: 14/10/16
- Cunningham J.G, Klein B.G. Control del desarrollo de las gónadas y gametos. En: Fisiología Veterinaria (2009). Capitulo 35, pp. 467-472. Editorial ELSEVIER SAUNDERS, cuarta edición.
- England C. W., Endocrinology of pregnancy, Capitulo 7.4 pp: 66-69. En: Fertility and Obstetrics in the Horse (2005). Editorial Third.
- López, J. Ciclo estral en la yegua (2016). Disponible en: <http://www.reproduccionveterinaria.com/fisiologia-y-anatomia-obstetrica/fisiologia-obstetrica2/ciclo-estral/ciclo-estral-en-la-yegua/>. Fecha de consulta: 14/10/16
- Losinno, L. Curso de ultrasonografía aplicada a la reproducción equina. Facultad de ciencias veterinarias, universidad nacional del nordeste, Corrientes, Agosto 1996.
- MacCue P, Squire E. Management of the donor mare, Chaper III, Embryo collection, Chaper VI. Transfer of equine embryos, Chaper XIII. In: Equine embryo Transfer (2015). Editorial Teton NewMedia.

- Morel M.C.G, The anatomy and Physiology of pregnancy in the mare. In: Equine reproductive physiology, breeding and stud management (2003), chaper V, pp 47-56 editorial CABI publishing, 2da edición.
- Palma, Gustavo A. (2007) Biotecnología de la reproducción, pp. 25-27. En: Inseminación artificial en la especie equina; Ian Gordon. Transferencia de embriones y biotecnología asociada a la especie equina.
- Paredes Higuera, María del Pilar. Características del ciclo estral, desarrollo embrionario y determinación de la tasa de preñez en yeguas criollas colombianas (2013). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Bogotá, Colombia.
- Ramírez Montenegro J.A. Determinación del fotoperiodo sobre la actividad ovárica en yeguas durante el año, en diferentes haras en los departamentos de Guatemala, Sacatepequez y Escuinta (2008), Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Escuela de Medicina Veterinaria, Guatemala.
- Rivera Gaona, J. (2012) Ciclo estral de la yegua. Disponible en: <http://manualdereproduccionequina.blogspot.com.ar/p/anatomia.html>
- Sánchez M.R, Reconocimiento materno de la gestación en yeguas (2016). Disponible en: <http://manejoreproductivoequino.blogspot.com.ar/2016/03/reconocimiento-materno-de-la-gestacion.html>. Fecha de consulta: 14/10/16.
- Squires E.L Manejo hormonal en la yegua. Reproducción equina II. Resúmenes del II congreso argentino en Reproducción Equina (2011). Universidad Nacional de Río Cuarto, Editorial UNRC.
- Vanderwall, D. Técnicas Actuales de Transferencia Embrionaria Equina (2000). En: Recent Advances in Equine Reproduction, B. A. Ball (Ed.). Department of Animal and Veterinary Science, Northwest Equine Reproduction Laboratory, University of Idaho, Moscow, Idaho, USA. Disponible en: <http://www.fileCUsersAlumnosDesktoptransferencia%20embrionaria.pdf>. Fecha de consulta: 14/10/16

- Vanderwall, D. Progesterone. In: Equine Reproduction (2011). Mckinnon, Squires, Vaala and Varner. Chaper 170, pp 1638-1639 editorial Wiley-Blackwell.
- Vazquez Garcia F. Gadea, J. Matás C. Holt W. Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals (2016). Disponible en: <http://www.ajandrology.com/article.asp?issn=1008-682X;year=2016;volume=18;issue=6;spage=844;epage=850;auiast=Gar%EDa%2DV%E1zquez>. Fecha de consulta: 30/04/2017.