

PUNTOS CRITICOS EN UN PROGRAMA DE TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

Josep Giner Torres, MV

Equus Iberica, Laboratorio de Reproducción Equina,

Departamento de Medicina Interna, Facultad de Veterinaria,

Universidad de Córdoba, España;

josepgin.alb@gmail.com

La técnica de transferencia de embriones en equinos es el procedimiento por el cual se recolecta uno o más embriones a través de un lavaje uterino transcervical de una yegua donante inseminada o servida por monta natural, 6 a 10 días post-ovulación, y se transfiere de manera no quirúrgica al útero de otra yegua receptora sincronizada previamente.

En 1974, simultáneamente y de manera independiente Oguri en Japón y Allen en Cambridge fueron los primeros en reportar una preñez por TE en equinos. Desde entonces, y coincidiendo con el desarrollo de la ultrasonografía reproductiva, a partir de los primeros reportes a comienzos de los '80 , las TE han crecido sostenidamente durante las últimas tres décadas, instalándose como una de las herramientas biotecnológicas de mas alto impacto en sistemas de producción de equinos de alta performance o valor genético.

En Argentina los primeros ensayos con TE en equinos se realizaron a mediados de la década del '80, y los primeros reportes y registros de centros comerciales, comenzaron durante la temporada de 1989, en yeguas de Polo. En la actualidad se encuentran operando al menos 35 centros de TE y se han reportado 7000 preñeces en la temporada 2009-2010 lo que ubicaría a Argentina en tercer lugar mundial en términos de producción de embriones equinos, luego de USA y Brasil.

En España empezó a ofrecerse comercialmente en el año 2000 alcanzando su mayor repercusión hacia el 2009-2010, principalmente en caballos PRE. En este momento se encuentran en funcionamiento 5 centros de TE y se estima una producción media de embriones de 250, a pesar de ser 2 de ellos privados y producir entre los dos 150 embriones aproximadamente.

Entre los factores más importantes que pueden condicionar los resultados de un programa de TE merecen destacarse:

1. Fertilidad de semental
2. Edad y condición reproductiva de la donante
3. Correcta detección de la ovulación
4. Condición reproductiva/nutricional/sanitaria y edad de la receptora
5. Entrenamiento del operador

Una de las mayores limitantes en España es que la mayoría de los programas de reproducción privados son **ambulatorios**, con lo cual variables como la fertilidad del semental, la condición reproductiva de la donante y la correcta detección de la ovulación no se manejan de una manera tan óptima como en un centro.

1. FERTILIDAD DEL SEMENTAL

La calidad del semen así como el tipo de semen (fresco, refrigerado, congelado) del que se trate determinan si el trabajo se debe hacer en condiciones ambulatorias o si por el contrario debe realizarse en un centro fijo. Esta decisión es muy importante y en función de esto se podrán obtener mejores resultados y en definitiva una **TASA DE RECUPERACIÓN** de embriones mayor.

Normalmente los caballos subfértiles deben manejarse en un centro fijo con un laboratorio formal donde se pueda procesar el semen adecuadamente, por otra parte es importante con este tipo de semen minimizar el intervalo Inseminación-Ovulación lo cual requiere un seguimiento exhaustivo de la donante.

El semen congelado así como el refrigerado requieren un seguimiento muy estrecho de la donante, de manera que resulta más difícil tener buenos resultados en ambulatorio.

AÑO	TASA RECUPERACIÓN	MP	TIPO DE SEMEN	OBSERVACIONES
2010	58,00%	10,00%	FRESCO	84% embriones con SEMENTAL SUBFERTIL
2011	73,00%	60,00%	REFRIGERADO	85% embriones con SEMENTALESE FERTILES

Datos comparativos de las temporadas 2010 y 2011 en centro de reproducción Dehesa San Fernando-Equus Iberica.

2. CATEGORIZACIÓN DE LA DONANTE

Hay varios factores propios de la donante que nos ayudaran a la predicción de resultados teóricos. Los más importantes son los siguientes:

- Edad
- Historia reproductiva
- Condición reproductiva actual
- Tiempo de permanencia en el programa
- Tipo de semen a utilizar

Todos estos datos nos permiten diseñar una estrategia individualizada para cada animal, así pues nunca se maneja igual a una donante de 5 años con 1 parto, sin problemas reproductivos y semen fresco de calidad, que una yegua de 18 años con historia clínica de 2 años sin productos y con un semental subfertil. De esta manera tratamos de explicarle al propietario cual es el mejor escenario para trabajar con su yegua, basándonos siempre en datos numéricos reales basados en experiencia y resultados de años anteriores nuestros y reportes de otros compañeros y profesores.

Ejemplos:

a- **Caso hipotético Yegua Joven.** Con un periodo de producción de marzo a junio (4 meses = 7 ciclos de lavajes) $7 \text{ ciclos} \times 56\% \text{ de preñez/ciclo} = 3,92 \text{ preñeces teóricas, esperadas, en un sistema MUY eficiente. Si a esto le restamos la tasa esperada promedio de muerte embrionaria, o sea la tasa de pérdida entre la primera ecografía positiva y la de los 60 días, que es de } 10\% = 3,92 \cdot 0,392 = 3,5.$ Este es el número de preñeces "real esperado", quiere decir que lo solicitado debería aproximarse a este valor, para cada yegua.

b- **Caso hipotético Yegua Vieja** (se consideran genéricamente "viejas" a yeguas mayores de 15 años, a pesar que por cada año que supere esa edad, los índices disminuyen progresivamente). Considerando marzo a septiembre (7 meses=12 ciclos de lavajes y 50 % de recuperación x50 % de preñez, por ciclo = eficiencia de 25%) $12 \text{ ciclos} \times 25\% \text{ de preñez/ciclo} = 3 \text{ preñeces} \times 20\% \text{ de muerte embrionaria} = 2,4 \text{ preñeces/temporada}$

3. CORRECTA DETECCIÓN DE LA OVULACIÓN

El momento de la ovulación va a determinar y a intervenir en valores como Intervalo inseminación-ovulación, relación día del flushing-estadio del embrión, etc.

Lógicamente en un programa ambulatorio es mucho más difícil determinar el momento de la ovulación aunque existen fármacos que ayudan a conseguir buenos resultados sin tener que aumentar excesivamente el número de visitas. La Deslorelina de Larga Acción induce la ovulación de uno o varios folículos siempre y cuando tengan más de 32 mm y edema en el útero, la efectividad es mayor al 90% y además no crea resistencia.

El 95% de las yeguas inducidas en los dos primeros días del celo, es decir folículos entre 32 -36mm ovulan entre las 36-42h post-inducción, incrementándose significativamente las ovulaciones múltiples y por tanto aumentando la probabilidad de recuperar uno o más embriones en los lavajes.

TRATAMIENTO	CICLOS(n)	TASA OVULACIÓN	
		SIMPLE(%)	MÚLTIPLE(%)
hCG	48	58,3 ^a	41,7 ^d
LAD	266	50,7 ^b	49,2 ^f
Control	327	68,8 ^c	31,2 ^g

ab-c; de-f p<0,001 hCG; Ovusyn[®], Syntex SA; LAD: Bet LADes[®], USA)

Tabla 1. Tasa de ovulación en yeguas jóvenes Polo Argentino donantes de embriones (Losinno et al, 2008)

4. CONDICIÓN REPRODUCTIVA/NUTRICIONAL/SANITARIA Y EDAD DE LA RECEPTORA.

Las yeguas que se seleccionan como receptoras deberían ser jóvenes (3-12años), estar en excelente estado de salud, condición corporal y aptitud reproductiva. Como condición esencial, su score de biopsia endometrial grado 1 o 2A según la escala de Kenney (1978). resultados de trabajos realizados en el laboratorio de reproducción equina de la universidad de Rio Cuarto(Argentina), han demostrado que la diferencia en tasas de pérdida embrionaria en yeguas receptoras seleccionadas utilizando, además de los parámetros mencionados, la biopsia endometrial, es significativamente menor (Losinno, 2005; Castañeira, 2008)

YEGUAS	n	TASA PRENEZ (%)			TOTAL
		14d	15-130d	31-60d	
CON BIOPSIA	1194	72,5	5,6 ^a	1,6 ^c	7,2 ^f
SIN BIOPSIA	926	71	8,2 ^b	5,4 ^d	13,2 ^g
TOTAL	2129	72,2	6,8	3,2	9,8

a-b; cd; ef p<0,001

Tabla 2. Tasas de preñez y perdida embrionaria en yeguas receptoras de embriones. (Castañeira et al, 2008)

5. LABORATORIO Y ENTRENAMIENTO DEL OPERADOR

Bajo condiciones ideales (donantes, receptoras, sementales fértiles y personal capacitado), es posible esperar una tasa de recuperación de embriones de 50% a 80% y

tasa de preñez de 50% a 80%, lo que determinaría una tasa de eficiencia total de 25 al 65%. Tanto la tasa de recuperación como la de preñez post-transferencia de yeguas subfértiles son significativamente más bajas comparadas con yeguas normales (20-30% vs 60-80%).

Hay procedimientos que ayudan a mejorar las tasas y encontrarse entre los % mencionados anteriormente:

- Entrenamiento formal del operador, no por imitación o copia
- Utilización del sistema Uno dentro-Uno fuera, es decir un operario dentro del laboratorio procesando el embrión y otro fuera haciendo lavajes y transferencias, minimizando la contaminación
- Laboratorio equipado con flujo laminar horizontal
- Protocolo de esterilización muy depurado o utilización de material nuevo siempre.

Por esta técnica es posible obtener, en promedio, 4 ó más potros por año de la misma yegua, pero existen evidencias (en Argentina) de una yegua de polo de la que se obtuvieron 14 preñeces en la misma temporada reproductiva (2004/5) sin utilizar protocolos de superovulación.

Para una actualización completa del tema se recomienda las recientes revisiones de Stout (2006); Losinno y Alvarenga (2007) y resúmenes de Society for Theriogenology. Embryo transfer Proceedings, Monterrey, CA, USA, 2007 y VIIth International Symposium on Equine Embryo Transfer, Havenmeyer Foundation Monograph, 2008.

Bibliografía

1. Losinno L; Alonso C; Castañeira C. Escoré na biopsia endometrial e aptidão reproductiva em Eguas receptoras de embrião-resultados parciais. Acta Scientiae Veterinariae, 33 (suppl 1) 201, 2005
2. Squires EL. Integration of future biotechnologies into the equine industry. Animal reproduction science 89.: 187-189, 2005
3. Stout TAE. Equine embryo transfer. Review of developing potential. Equine Veterinary journal 38(5) 467-478, 2005.
4. Wilsher S; Kelling M; Allen WR. Meclofenamic acid extends donor-recipient asynchrony in equine embryo transfer. Equine Veterinary journal 38 (428-432), 2006
5. Losinno L, Alvarenga M. Critical factors on equine embryo transfer programs. Acta Scientiae Veterinaria, 34(1), 39-49, 2007.

6. McCue P; Gee EK; Woods GL; Squires EL. Hormone and other medical therapies in embryo transfer recipient mares. Society for Theriogenology. Embryo Transfer proceedings, (27-35), Monterrey, CA, USA; 2007.

7. Losinno L; Alonso C; Rodriguez D; Douglas RH. Ovulation and embryo recovery rates in young and old mares treated with hCG or deslorelin. VIIIth International Symposium on Equine Embryo Transfer, (96-97), 2008.

8. Castañeira C; Alonso C; Vollenwider A; Losinno L. Uterine biopsy score and pregnancy loss in embryo recipient mares. VIIIth International Symposium on Equine Embryo transfer, (96-97), 2008.

9. Wilsher S; Clutton Brock, Allen WR. Transfer of day 10 embryos to asynchronous recipient mares. VIIIth International Symposium on Equine Embryo Transfer, (50-51), 2008.

10. Castañeira C; Aguilar J; Vollenwieder A, Losinno L. Utilización de Gonadotrofina Menopausica Humana (hMG) para la estimulación ovarica en yeguas donantes de embriones. I Jornadas Internacionales de INITRA, Bs As 2008

11. Mortensen CJ, Chol YH; Hinrichs k; Ing NH; Kraemer DC; Vogelsang SG; Vogelsang MM, Embryo recovery from exercised mares. Animal Reproduction Science (en prensa), 2008