

TRANSFERENCIA EMBRIONARIA DOBLE EN UNA YEGUA DE RAZA PERUANO DE PASO LAUREADA

González del Pino, F. J y Wilde, O. R.

Facultad de Agronomía y Zootecnia

fgdelpino@gmail.com

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo presentar el reporte de un primer caso de una transferencia embrionaria doble en Tucumán Argentina. Los animales utilizados fueron una yegua laureada de la raza Peruano y tres hembras receptoras de no mas de 10 años. Las yeguas donante y receptoras fueron sincronizadas por aplicación de PGF₂α.

Para determinar el momento de la ovulación de donante y receptoras se utilizó inspección ecográfica, lo cual sirvió también para determinar la oportunidad de la inseminación artificial de la donante. Cuando la donante presentó un folículo de 45 mm se la inseminó y a los 7 días de la ovulación se realizó el lavado uterino utilizando una sonda doble vía tipo Foley de alto flujo, recogiendo dos embriones al estado de blastocisto expandido, los cuales fueron inmediatamente transferidos a dos de las yeguas receptoras utilizando una cánula de transferencia con descarga lateral. A los 20 días de la transferencia se realizó una ecografía a las receptoras constatando una preñez positiva.

Palabras claves: yegua, transferencia embrionaria, mellizos.

SUMMARY

This study aimed to present the first case report of a double embryo transfer in Tucumán, Argentina. The donor mare was a awarded Peruvian Paso female equine and three 10 year old recipient mares, also Peruvian Paso. The donor and recipient mares were synchronized by administration of a luteolytic dose of PGF₂ a. To determine the time of ovulation of donor and recipient was used ultrasound inspection. This examination was also used to determine the timing to perform artificial insemination of the donor. When the donor had a 45 mm follicle was inseminated and 7 days post ovulation, uterine lavage was performed using a Foley catheter two-way high flow rate, collecting two embryos at expanded blastocyst stage, which were immediately transferred to the two recipient mares using a transfer gun with side discharge. At 20 days after the transference a positive pregnancy was confirmed by ultrasound.

Key words: mare, embryo transfer, twin

INTRODUCCIÓN

La transferencia embrionaria (TE) es una de las técnicas de reproducción asistida más ampliamente utilizada en la yegua, cuyo mayor interés está centrado en obtener un mayor número de potrillos a partir de yeguas de alto valor genético y comercial, durante una temporada reproductiva sin afectar su desempeño deportivo. Así en un año, es posible obtener tantos o más potrillos de los que hubiera podido obtener naturalmente durante toda su vida útil. La TE implica la participación de una yegua donante y de tres receptoras o nodrizas como mínimo, las que deben someterse a un examen clínico y reproductivo minucioso, con el objeto de descartar enfermedades reproductivas e infecciosas, como también la presencia de patologías uterinas en las hembras receptoras, que impedirían llevar una preñez a término.

Para el éxito de la TE, se requiere que tanto la donante como las receptoras se hallen dentro de un determinado rango de días de su ciclo estral (sincronizadas), ya que la hembra que reciba el embrión debe encontrarse idealmente en el mismo día de ciclo que la donante, aunque se tolera un adelanto de un día o bien que esté retrasada hasta tres días respecto de la ovulación de la yegua donante. De esta forma, el embrión obtenido será colocado en un ambiente uterino fisiológicamente similar al que existía en el momento de su recuperación.

En la yegua, el embrión es removido con preferencia entre los días 7 u 8 posteriores a la ovulación de la donante en forma no quirúrgica, insertando una sonda tipo Foley de alto flujo en la cavidad uterina, a través de la cual se introduce un litro de un medio isotónico enriquecido, el cual es luego drenado por la misma vía, quedando el embrión retenido en un filtro especial. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico de bajo aumento, se determina la presencia del embrión y se procede a un lavado reiterado del mismo con un medio protector especial, para luego ser acondicionado en una cánula de transferencia que se inserta transvaginalmente en el útero de la hembra nodriza donde se lo deposita.

El objetivo de este informe, fue reportar el primer caso de TE doble en una yegua de raza peruano de paso, a partir de una doble ovulación, realizada en la ciudad de Tucumán.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron como donante y receptoras, yeguas de la raza peruano de paso de 10 años de edad promedio. A comienzos del mes de octubre del año 2008 se les realizó un examen de aptitud reproductiva, determinándose por palpación rectal y mediante ecografía, la normalidad anatómica y funcional de su aparato reproductivo. La yegua donante (Malebart Esperanza) había sido ese año laureada en el Concurso Nacional de Caballos Peruanos de paso realizado en la provincia de Salta.

Como protocolo de sincronización se utilizó el análogo sintético de la $PGF_2\alpha$, cloprostenol sódico (Ciclase Lab. Syntex), aplicándose al lote de yeguas 3 ml vía intramuscular el día de inicio del tratamiento, repitiéndose una segunda dosis a los 14 días. Durante el estro inducido, se les realizó un seguimiento ecográfico diario para controlar el adecuado y sincrónico desarrollo folicular entre ellas. Horas previas a la ovulación, determinado ecográficamente, se programó la inseminación artificial de la donante. La ecografía mostró la presencia de dos folículos con desarrollo sincrónico en la donante y cuando los estos alcanzaron los 35 milímetros de diámetro aproximadamente, se aplicaron 1500 UI de hCG (Ovusun, Lab. Syntex) vía endovenosa para lograr la ovulación simultánea de ambos.

Al octavo día de la ovulación de la donante se realizó el lavado uterino, utilizando una sonda tipo Foley de alto flujo, con balón de 100 ml y de 1500 mm de longitud (Minitub), acoplada a una tubuladura tipo Y provista de un filtro para embriones (Miniflush, Minitub). Para realizar el lavaje, se perfundió primeramente 1.000 ml de una solución de Ringer Lactato con el agregado de 1% de suero fetal bovino, y luego de su drenaje se repitió la operación con otros 1000 ml de la misma solución. Por vía transrectal se trató que el fluido perfundido fuera distribuido en forma uniforme, mediante un masaje realizado sobre toda la longitud del útero. Luego se procedió a drenar el útero por gravedad, determinándose la cantidad de solución recuperada con ayuda de probetas graduadas de 1 litro, con recuperación del 95% del líquido perfundido.

Luego de la recuperación del medio, el contenido del filtro se examinó con la ayuda de un microscopio estereoscópico de bajo aumento con un objetivo de 15X, para localizar los embriones, procediéndose a su lavado para eliminar la contaminación grosera que pudiera existir, mediante cuatro sucesivos pasajes del embrión a placas de Petri de 35x10 mm conteniendo medio estéril para el lavado y mantención de embriones (Equi PRO Holding, Lab. Minitub).

Finalmente, cada uno de los embriones fue evaluado a una mayor magnificación (40 x) determinándose que se trataba de dos embriones de muy buena calidad, los cuales fueron mantenidos en el medio de cultivo a temperatura ambiente hasta ser transferidos, dentro de las dos horas de haber sido recuperados. Los embriones fueron acondicionados individualmente en minipajuelas de 0,5 ml de capacidad, siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía. La transferencia se realizó en forma no quirúrgica utilizando una vaina de TE para equinos, provista de punta metálica de descarga lateral (Minitub), insertada transvaginalmente cubierta con un protector sanitario.

La transferencia del embrión a cada una de las hembras receptoras, las cuales ovularon un día después que la donante, se realizó cuidando la asepsia protegiendo el brazo del operador con un guante largo para tacto, cubierto a su vez por un guante para cirugía y lubricados con gel, todos previamente esterilizados. El orificio cervical externo fue localizado y suavemente dilatado con el dedo índice. El extremo anterior de la vaina de transferencia se introdujo suavemente dentro del cerviz donde el protector sanitario fue atra-

vesado por la misma. Luego el operador sacó su mano de la vagina y la introdujo en el recto, manteniendo el pistolete de transferencia con la mano diestra. Uno de los cuernos uterinos fue manipulado a través de la pared rectal para posicionar el dispositivo de transferencia dentro del mismo. Cuando se estimó que la posición del extremo del catéter era la adecuada, se expulsó suavemente el medio conteniendo al embrión dentro de la pajuela.

Como paso final y para controlar la liberación de prostaglandina, como consecuencia de la manipulación del cervix, lo cual pudiera generar una lisis del cuerpo lúteo comprometiendo la sobrevivencia de las vesículas embrionarias, cada una de las receptoras fue inyectada por vía EV una dosis de 8 ml de Banamine (Flunixin meglumina), que actúa como un antiprostaglandínico.

RESULTADOS

La yegua donante luego de la sincronización con doble dosis de $\text{PGF}_2\alpha$, comenzó a manifestar celo al tercer día, mientras que las receptoras lo hicieron al cuarto día. El seguimiento ecográfico permitió determinar que la donante presentaba dos folículos con un desarrollo sincrónico, por lo que al quinto día se le aplicó una hormona inductora de la ovulación (Ovusyn), la cual se registró a las 48 h de la aplicación. Todas las receptoras entraron en celo al cuarto día de la última dosis de $\text{PGF}_2\alpha$, y dos de ellas ovularon al octavo día, mientras que la tercera lo hizo sobre el noveno día.

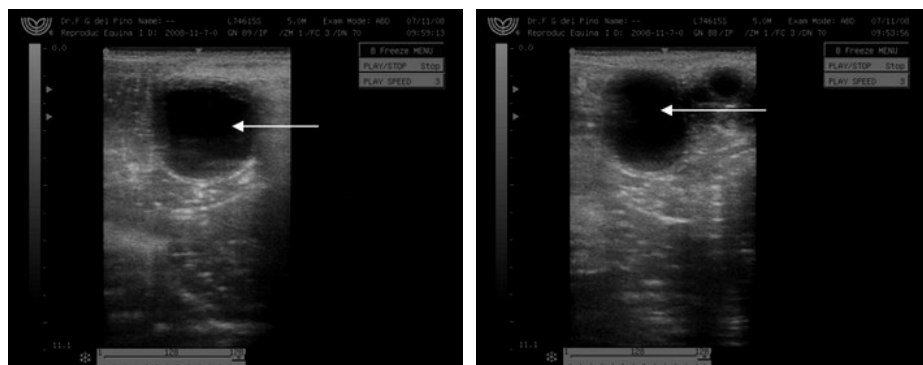


Figura N°1 **Panel Izquierdo:** Ecografía del ovario derecho de la yegua donante donde se observa un folículo en desarrollo próximo a ovular. **Panel Derecho:** Ecografía del ovario izquierdo de la misma yegua donde también se observa otro folículo en desarrollo próximo a ovular.

Durante el lavado uterino realizado al octavo día de la ovulación de la donante, se pudo recuperar los dos embriones esperados con un tamaño y calidad acorde a su edad. Luego de acondicionarlos individualmente en fueron transferidos sin problemas a las receptoras que ovularon el octavo día.

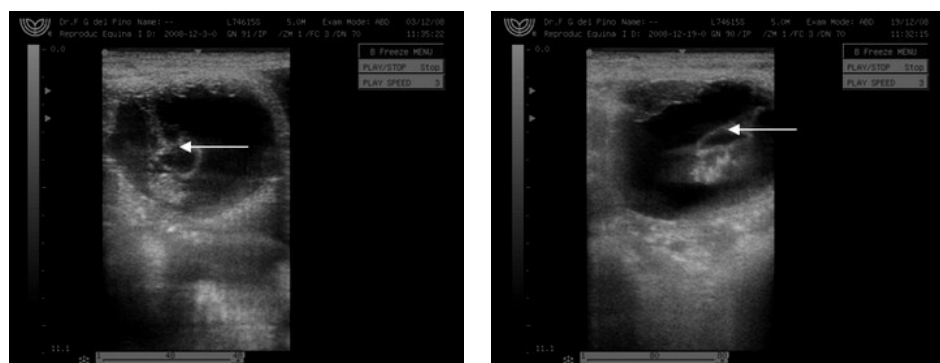


Figura N° 2: **Panel Izquierdo:** Ecografía uterina de la nodriza N° 1 mostrando un embrión con un desarrollo de 45 días. **Panel Derecho:** Ecografía uterina de la nodriza N° 2 mostrando también un embrión con un desarrollo de 45 días.

A los 17, 35 y 60 días de la ovulación se realizaron controles ecográficos de las hembras receptoras, los cuales se confirmaron la presencia de vesículas embrionarias con desarrollo normal en ambas yeguas. Finalmente las madres sustitutas luego de una gestación normal, parieron al año siguiente potrillos vivos en forma natural y sin ningún tipo de complicaciones.

DISCUSIÓN

El protocolo seguido para la sincronización, resultó ser sencillo y efectivo, ya que se logró una ovulación casi simultánea de las yeguas bajo tratamiento, dentro de un rango que permitió una posterior gestación exitosa de los embriones transferidos. El logro de este rango de sincronización en la ovulación, fue de vital importancia, ya que el mismo se encontraba dentro de lo establecido en los protocolos de transferencia embrionaria, en los cuales las receptoras deben tener su ovulación un día antes que la donante o bien hasta tres días después. En este caso en particular, las receptoras presentaron ovulación un día después.

La utilización de esta técnica permitió el logro de un mayor número de crías de las que normalmente una hembra pudiera tener en condiciones naturales durante su vida útil. Este mejor aprovechamiento es de gran importancia para criadores con animales, que como en el presente caso, poseen un alto valor genético para la raza. Asimismo, tratándose de una hembra con la característica de tener dobles ovulaciones sincrónicas, permitió con la TE, el desarrollo de ambos embriones sin complicaciones. Cabe resaltar, que en condiciones naturales es muy difícil que la propia madre, sea capaz de llevar a término y con buenos resultados la gestación y el nacimiento normal de ambos mellizos.

CONCLUSIÓN

La TE permite en casos de ovulaciones múltiples –poco frecuente en yeguas- a partir de las cuales se originen dos o más vesículas embrionarias, poder transferirlas a yeguas receptoras. Así al utilizar esta técnica, se logra que estos embriones puedan finalmente dar como resultado el nacimiento de dos o más potrillos vivos, situación que en condiciones naturales y al ser gestados en forma simultánea por su madre original, correrían un alto riesgo de ser abortados o bien que uno o todos mueran durante la gestación o el parto.

REFERENCIAS

- 1- Embryo technologies in the horse. E. L. Squire, E. M. Carnevale, P.M. McCue, J. E. Bruemmer, Theriogenology Volume 59, Issue 1, Pages 151,170 Año: 2003
- 2- Embryo Transfer and Related Technologies. Angus O. McKinnon and Edward L. Squires, PhD Proceedings of the 11th Annual Resort Symposium of the American Association of Equine Practitioners AAEP Published by the American Association of Equine Practitioners www.aaep.org.
- 3- How to perform a flush for embryo transfer. Patrick McCue DVM, PhD, Diplomate, ACT, Iron Rose Ranch Professor of Equine, Theriogenology Department of Clinical Sciences, Colorado State University, Ft. Collins, Colorado (USA) Proceedings of the Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians, Bologna, Italy 2009.
<http://www.ivis.org/proceedings/sive/2009/50.pdf>
- 4- Embryo transfer in horses. Francesco Camillo Med Vet, Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università di Pisa (I). Proceedings of the European Equine Meeting of the Year 2008 - XIV SIVE - FEEVA Congress, Venice, Italy. <http://www.ivis.org/proceedings/sive/2008/pdf/12.pdf>
- 5- Embryo Transfer and Related Technologies. Angus O. McKinnon and Edward L. Squires, PhD. Proceedings of the AAEP Annual Resort Symposium. Vail, Colorado, USA - January 25 - 28, 2009.
<http://www.ivis.org/proceedings/aaepresort/2009/mckinnon1.pdf>
- 6- Factors affecting embryo recovery, embryo development and pregnancy rate in a commercial embryo transfer programme. Proceedings of the First Meeting of the EUROPEAN EQUINE GAMETE GROUP (EEGG). Page 61 <http://havemeyerfoundation.org/PDFfiles/monograph1.pdf>
- 7- Nonsurgical Embryo Transfer in a Private Practice (1998) Rob Foss, DVM; Norm Wirth, DVM; Paul Schiltz, DVM; Jeff Jones, DVM Proceedings of the Annual Convention of the AAEP 1999. Vol. 45. Reprinted in the IVIS website with the permission of AAEP

<http://www.ivis.org/proceedings/AAEP/1999/210.pdf>

8- How to perform an uteral flushing in the mare. Peter F. Daels DVM, PhD. Proceedings of the Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians, Perugia, Italy 2004. This manuscript is reproduced in the IVIS website with the permission of SIVE. 10° CONGRESSO NAZIONALE MULTISALA SIVE Proceedings of the Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians, Perugia, Italy 2004.

<http://www.ivis.org/proceedings/SIVE/2004/howtodo/daels6.pdf>

9- Nonsurgical Embryo Transfer in a Private Practice (1998). Rob Foss, DVM; Norm Wirth, DVM; Paul Schiltz, DVM; Jeff Jones, DVM. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP 1999. Vol. 45. Reprinted in the IVIS website with the permission of AAEP

<http://www.ivis.org/proceedings/AAEP/1999/210.pdf>

10- THE CURRENT STATUS OF EQUINE EMBRYO TRANSFER. E.L. Squires, P.M. McCue and D. Vanderwall. Theriogenofogy 51:91-104, 1999

11- Current Equine Embryo Transfer Techniques. D. Vanderwal http://www.ivis.org/advances/Reproduction_Ball/embryo_transfer_vanderwall/chapter_frm.asp?LA=1

12- Proceedings of the 6th International Symposium on EQUINE EMBRYO TRANSFER Havemeyer Foundation Monograph Series No. 14 <http://www.havemeyerfoundation.org/PDFfiles/Monograph%2014.pdf>

13- Vanderbal, D. K. 2003. Robinson 5 Current Therapy in Equine Medicine. Ed. W. B. Saunders Company. Section 5, Reproduction: Embryo Collection, Storage, and Transfer. Pag. 280-285