

**UNIVERSIDAD DEL SALVADOR**

**Escuela de Veterinaria**

Trabajo Final

Practica Final Orientada- Producción Animal

**La transferencia embrionaria en el día adecuado,  
¿Es determinante para un embrión exitoso?**

Alumna: Fernández Finessi, Agustina

Profesor Tutor: Miquet, Jorge Miguel

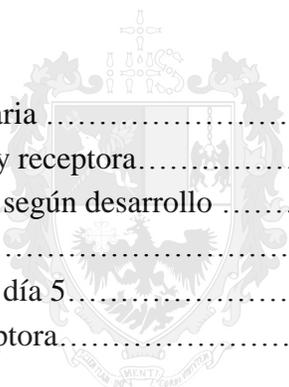


USAL  
UNIVERSIDAD  
DEL SALVADOR

**PILAR, 2019**

INDICE (alineá bien los números)

I)	Resumen .....	1
II)	Introducción .....	1
III)	Regulación fisiológica de la yegua .....	2
	• Funcionamiento y regulación .....	3
	• Hipotálamo.....	4
	• Hipófisis.....	4
	• Regulación hormonal .....	5
IV)	Transferencia embrionaria .....	6
	• Manejo de yegua donante y receptora.....	6
	• Recuperación embrionaria según desarrollo .....	9
	• Evaluación embrionaria .....	11
	• Revisación de receptora el día 5.....	12
	• Examen de preñez de receptora.....	13
V)	Conclusión .....	14
VI)	Bibliografía .....	15



USAL  
UNIVERSIDAD  
DEL SALVADOR

## **I) Resumen**

El trabajo se basa en el manejo productivo según el día de transferencia embrionaria, con la finalidad de lograr un mejor resultado en cuanto a tasas de preñez por yegua y de potrillos nacidos sanos.

Para ello es necesario comprender el ciclo reproductivo de la yegua y la fisiología reproductiva de la hembra, para de este modo poder sincronizar correctamente a la yegua donante junto con la yegua receptora y lograr la correcta transferencia y viabilidad del embrión.

Yeguas de alta performance después de terminar la temporada de competición pasan como donantes de embriones, a centros de transferencia embrionaria como donantes de embriones. De esta manera se han podido obtener múltiples descendientes de yeguas de competencia sin interrumpir su carrera deportiva.

## **II) Introducción**

El trabajo consistió en lograr una mejora en cuanto a las tasas de preñez post-transferencia. Se llevo a cabo en un centro embrionario en la localidad de Open Door, provincia de Buenos Aires.

Para ello se evaluó la producción embrionaria según el día de transferencia, demostrando variaciones significativas según el día de recuperación y la cantidad o número de embriones recuperados, junto con las variaciones en cuanto al tamaño del mismo.

Para ello se evaluaron parámetros reproductivos como:

- ✓ Porcentaje de yeguas ovuladas.
- ✓ Porcentaje de transferidas.
- ✓ Porcentaje de yeguas preñadas post transferencia.
- ✓ Porcentaje de yeguas vacías.
- ✓ Porcentaje de yeguas abortadas.

## **III) Regulación fisiológica del ciclo estral**

Las yeguas ciclan en forma estacional con fotoperiodo positivo. La duración media del ciclo estral es de 20 a 23 días. Los ciclos son más largos en primavera y más cortos de junio a septiembre. La fase de celo dura normalmente 6 días y el diestro 15 días.

La regulación de la ciclicidad sexual se lleva a cabo bajo el control del eje hipotálamo-hipófisis-ovarios.

La glándula pineal tiene un importante papel en el control de la reproducción estacional, así como en el comienzo de la pubertad, a través de su implicación en la liberación de FSH, LH, PROLACTINA.

El efecto del fotoperiodo se realiza por medio de la melatonina, que no actúa directamente sobre el eje hipotálamo hipófisis anterior, sino indirectamente a través de otros péptidos hormonales de origen pineal, la melatonina conduce la respuesta reproductiva en la yegua, ya que por ser reproductora estacional, comienza su actividad sexual cuando se incrementa la luz diaria. Por lo tanto en la yegua los niveles de melatonina se incrementan durante las horas de oscuridad.

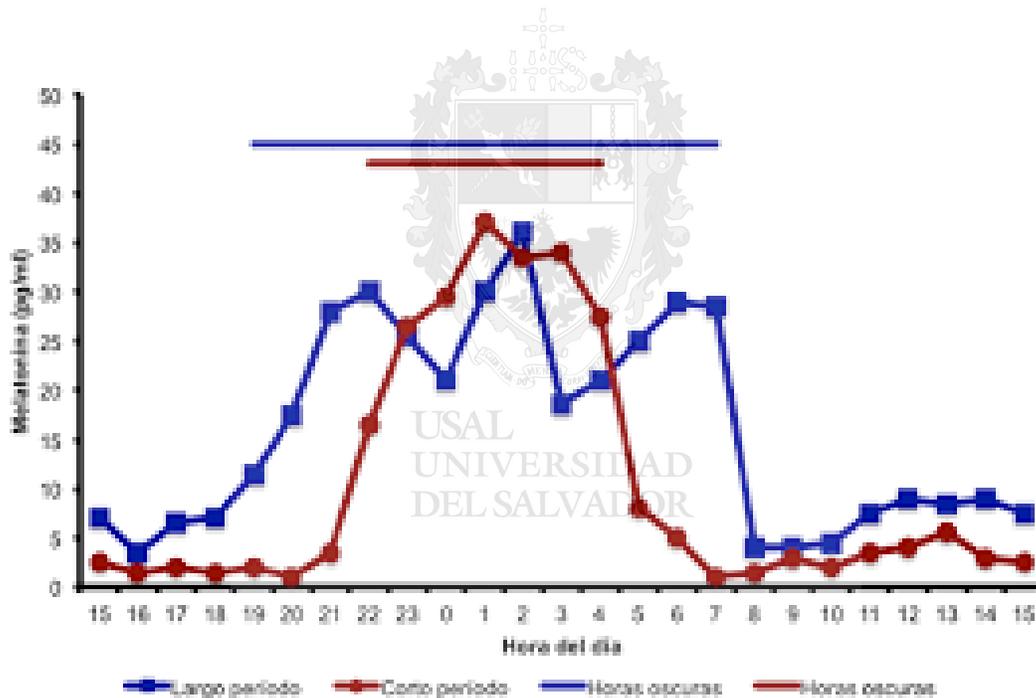


Foto 1: Concentración de melatonina en yeguas con largo y corto periodo de horas oscuras durante el día

## 1) Hipotálamo

Controla la liberación de las gonadotrofinas de la hipófisis anterior, mediante la acción de sustancias específicas liberadoras e inhibidoras.

Estas son secretadas por las neuronas hipotalámicas y transportadas desde la eminencia media del hipotálamo hasta la hipófisis por el sistema portal hipotálamo-hipofisario.

Segrega GnRH (hormona liberadora de gonadotrofinas), con características para promover la secreción de las hormonas folículo-estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), del lóbulo anterior de la hipófisis ó adenohipófisis, de manera adecuada para estimular la función ovulatoria.

## 2) Hipófisis

La hipófisis también denominada glándula pituitaria, es una pequeña glándula de aproximadamente 1cm de diámetro situada en la silla turca (una pequeña cavidad ósea situada en la base del cráneo) está unida al hipotálamo por el tallo hipofisario. La hipófisis se divide en dos partes bien definidas, lóbulo anterior o adenohipófisis y lóbulo posterior o neurohipófisis. Entre ambos existe una zona denominada parte intermedia.

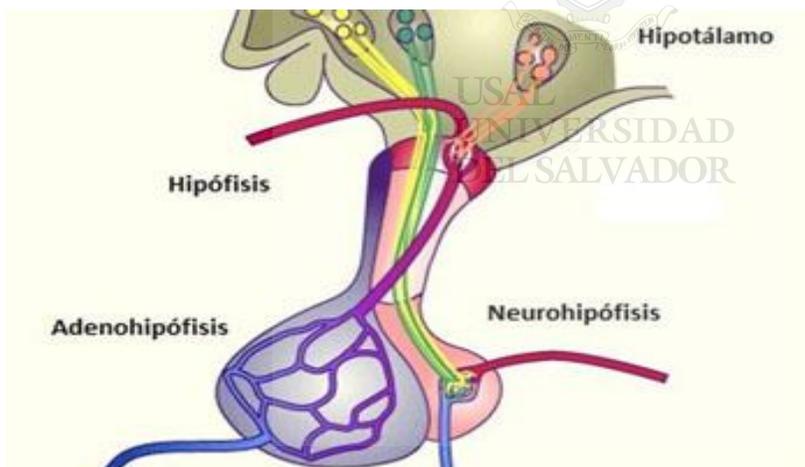


Foto 2: hipotálamo- hipófisis

La adenohipófisis secreta seis hormonas peptídicas necesarias y otras de menor importancia, mientras que la neurohipofisis sintetiza hormonas peptídicas importantes. 10

Las hormonas de la adenohipófisis intervienen en el control de las funciones metabólicas de todo el organismo. Las hormonas más importantes que secreta son:

- Hormona de crecimiento (GH): estimula el crecimiento de todas las estructuras del organismo.
- Corticotropina (ACTH): controla la secreción de hormonas corticoadrenales.
- Tirotropina (TSH): controla la liberación de T3 y T4.
- Prolactina (PRL): estimula el desarrollo de las glándulas mamarias y producción de leche.
- Hormona folículo estimulante (FSH): controla el crecimiento de los ovarios (maduración de los ovocitos) y de los testículos (producción de espermatozoides), así como su actividad hormonal y reproductora.
- Hormona Luteinizante (LH): en la hembra regula a maduración de los folículos y la ovulación, y en el macho regula la secreción de testosterona.
- Hormona antidiurética o vasopresina (ADH): controla la excreción de agua en la orina, con lo que ayuda a regular los líquidos corporales.
- Oxitocina: secreción de leche, aumenta la motilidad uterina, interviene en el parto, y al final de la gestación.

Todas secretadas por la adenohipófisis, menos las dos últimas (ADH y Oxitocina) que son secretadas por la neurohipofisis.

### Eje córtico límbico hipotálamo hipófisis gonadal

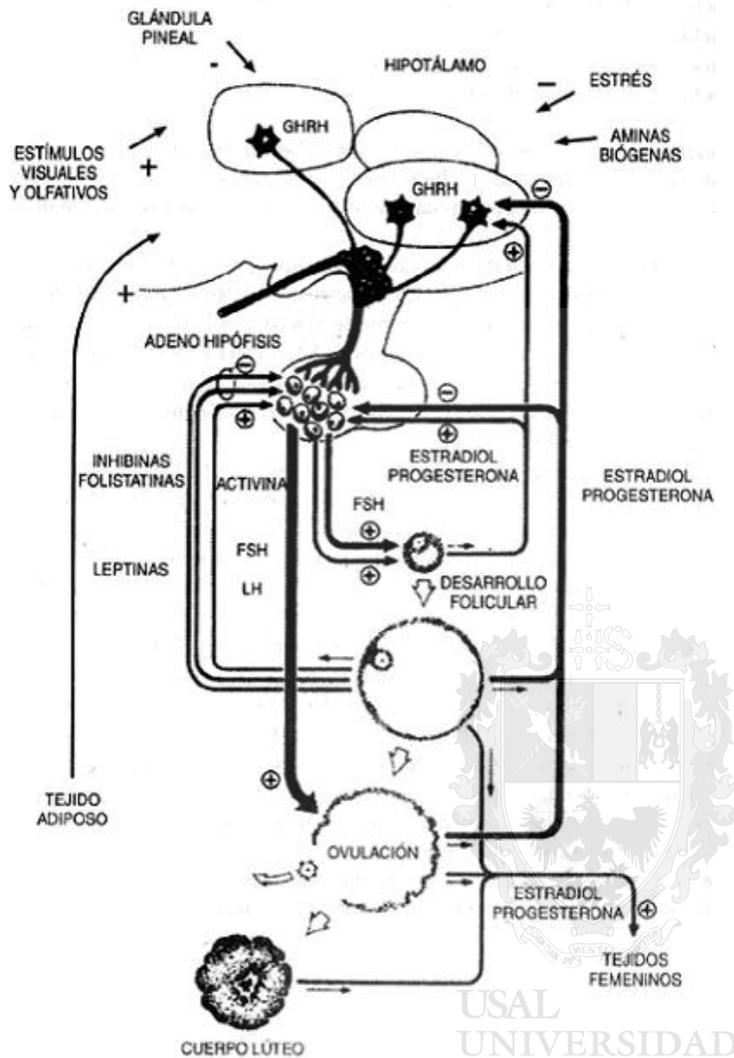


Foto 3: Eje hipotálamo-hipófisis gonadal

### Cambios endócrinos durante el ciclo estral de la yegua

La FSH tiene dos picos durante el ciclo estral, uno asociado al pico pre-ovulatorio de LH, y otro hacia la mitad del diestro. Este último pico de FSH, el cual es exclusivo de la yegua, es responsable del desarrollo de una nueva generación de folículos, uno de los cuales ovulará en el próximo celo.

En cuanto a la secreción de LH los niveles permanecen elevados durante cinco a seis días antes y después de la ovulación.

Los estrógenos presentes en la circulación periférica tienen su máximo nivel durante el celo, justo cuando los niveles de progesterona y otros progestágenos son más bajos de acuerdo con los cambios físicos que ocurren en el cuerpo lúteo.

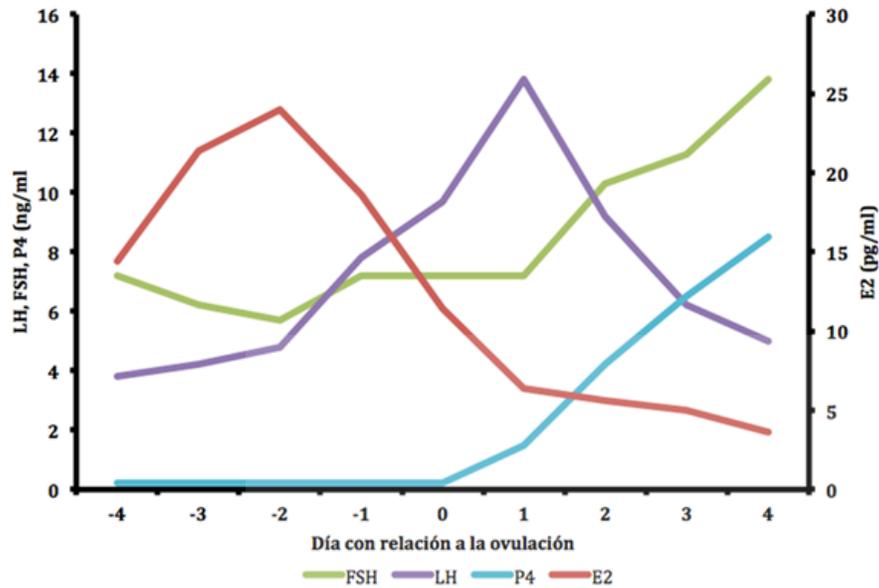


Foto 4: Concentración hormonal con relación a la ovulación en la yegua

#### IV) Transferencia embrionaria

Técnica de reproducción asistida (ARTS) que consiste en explotar el potencial reproductivo desaprovechado de una hembra de alto valor genético; utilizando técnicas combinadas de matrizado del ciclo, Inseminación Artificial, colecta y siembra de embriones.

En términos generales, la técnica de transferencias embrionarias se refiere al procedimiento por el cual se recolecta un embrión (por un método no-quirúrgico a través de un lavaje uterino) de una yegua donante inseminada o servida, 6 a 9 días post-ovulación, y se transfiere (de manera quirúrgica o no quirúrgica) al útero de otra yegua receptora sincronizada previamente.

Permite la posibilidad de:

- obtener potrillos de yeguas en entrenamiento.
- la obtención de un mayor número de potrillos por año y por yegua.
- obtención de potrillos de potrancas de dos años.
- obtener potrillos de yeguas sub-fértiles.
- la obtención de potrillos de yeguas con problemas de salud de índole no reproductiva.
- la utilización de la técnica como herramienta de investigación.

En cuanto a la técnica es de suma importancia la fertilidad del padrillo, la edad y condición de la donante, como así también el manejo de las yeguas con la correcta ovulación, condición reproductiva, sanitaria y nutricional de las yeguas.

### **1) Manejo de las yeguas:**

- Yeguas donantes: Debe realizarse un examen completo de evaluación reproductiva de la yegua donante para saber si esa yegua puede ser usada en un programa de transferencia embrionaria. El manejo de la donante incluye el recelo (retajeo) para monitorear la conducta reproductiva, la palpación rectal y ultrasonografía para monitorear la actividad folicular durante el ciclo estral. Durante el celo, la donante es examinada diariamente para evaluar el crecimiento folicular que permite saber el momento óptimo de la inseminación con semen fresco, refrigerado o congelado. La ovulación es inducida utilizando gonadotrofina coriónica humana o la aplicación de agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). El día de la ovulación es detectado y designado como Día 0. Actualmente no hay ningún método práctico y eficiente para inducir la súper-ovulación en las yeguas y esto limita la eficiencia de la transferencia embrionaria.

- Yeguas receptoras: La selección y el manejo de la yegua receptora es posiblemente el factor más importante que afecta el éxito 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 de las receptoras es de 3 a 10 años. La sincronización entre la yegua donante y la yegua receptora puede ser llevada a cabo usando prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) sola o combinada con progesterona exógena. 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 +1 a -3 días (ej: la yegua receptora puede ovular un día antes y hasta 3 días después que la yegua donante).

### **Recuperación embrionaria**

Los embriones equinos entran en el útero a través de la unión útero tubarica entre 5,5 y 6 días después de la ovulación, momento en que la mayoría de los embriones se encuentra en la etapa de desarrollo de mórula o blastocito temprano. La recuperación embrionaria se realiza, en la mayoría de los centros, generalmente entre el día 6,5 a 9 días después de la ovulación. Se puede realizar la recolección al día 6,5 o día 7 para obtener un embrión pequeño, y proceder a su congelamiento o transferencia de dicho embrión.

En la mayoría de los centros de Argentina se realiza el lavaje uterino el día 7 u 8 después de la ovulación, porque las tasas de recuperación embrionaria son altas y la mayoría de los embriones son blastocistos o blastocistos expandidos y pueden observarse fácilmente bajo el microscopio. El procedimiento de recolección se retrasa a menudo en un día y medio para las yeguas inseminadas con semen congelado debido a un retraso en el desarrollo embrionario, en algunos casos la recolección también se retrasa en las yeguas mayores y yeguas servidas post ovulación.

Tipo de semen	Día 7 (µm )	Día 8 (µm)
Refrigerado	401.9 +- 19.6	716.9 +- 104.9
Congelado	258.2 +- 33.3	383.5 +- 54.9

Tabla 1: tamaño del embrión al día 7 u 8 después de la ovulación para yeguas inseminadas con semen refrigerado y congelado.





Figura 1. Mórula compacta equina. El embrión consiste en una masa compacta de blastómeros, con una zona pelúcida prominente. Los contornos de blastómeros individuales pueden observarse en la periferia del embrión. El tamaño del embrión es aproximadamente 220  $\mu\text{m}$ . Se produce a los 4-5,5 días.



figura2: Blastocito temprano equino. Comienza la formación de fluido que llena la cavidad del blastocele y la zona pelúcida que se está adelgazando. El tamaño del embrión es aproximadamente 290  $\mu\text{m}$ . Se produce a los 6-8 días.



Figura 3. Blastocito equino expandido. La cavidad del blastocele y el macizo celular interno está totalmente formado, el futuro embrión-feto, puede ser diferenciado de la capa trofoblástica externa (futura placenta). La zona pelúcida está siendo reemplazada por una delgada capsula. El tamaño del embrión es aproximadamente 560  $\mu\text{m}$ . se produce a los 7,5-8,5 días.

Los embriones equinos tienen aproximadamente el doble de tamaño desde el día 7 hasta el día 8, y el tamaño se duplica nuevamente entre el día 8 y 9. Por consiguiente, la recolección de embriones al día 9 después de la ovulación suele producir la recuperación de embriones grandes, de mayor diámetro, por lo tanto el porcentaje de transferencia es más bajo.

Día de recuperación	Numero embriones	Media +-DE ( $\mu\text{m}$ )	Rango ( $\mu\text{m}$ )
6.5	20	191.8+-13.2	150 a 325
7	183	354.0+-13.9	150 a 900
8	35	623.9+-72.9	150 a 2500

DE: Desviación estándar

Tabla 2: Diámetro embrionario de acuerdo al día de recolección.

La recolección embrionaria es realizada por lavado uterino trans-cervical.

- Se realiza colocando a la yegua en el brete, se lava la zona del periné usando detergente neutro, luego se enjuaga con agua limpia y se seca.
- El operador se coloca un guante estéril y gel lubricante estéril, luego introduce el catéter (o la sonda) estéril, que cuenta con un balón, se coloca en la vulva. Luego de meter el catéter en la vagina, este es colocado a través del cérvix en el cuerpo uterino, se insufla el balón con 80 c.c. de aire y luego se tracciona hacia atrás contra el orificio cervical interno para prevenir la pérdida de líquido.
- El útero es lavado tres a cuatro veces con solución salina amortiguada con fosfatos puro o modificado (DPBS) previamente entibiado (30 - 35° C) conteniendo 1% de suero fetal bovino, penicilina (100 unidades/ml) y estreptomycin (100  $\mu\text{g/ml}$ ).
- El útero es llenado con 1 a 2 litros de DPBS en cada lavado (4 a 8 litros son usados durante todo el proceso de recolección).
- Después de llenado el útero se le permite al líquido salir y pasar a través de un filtro para embriones de 0.75 $\mu$ . Es importante que el filtro de embriones no rebase o quede sin líquido.
- El líquido que pasa por el filtro es recolectado para evaluar cuanto se recuperó. Luego del primer lavado el útero es masajado a través del recto durante los subsiguientes lavados, y esto puede ayudar a que el embrión quede suspendido en el medio y además aumentar la recuperación total del líquido.

Una vez finalizado el lavado el contenido del filtro es vaciado en una caja de Petri con cuadrícula para la búsqueda y enjuagado con DPBS. El líquido recuperado es revisado utilizando un microscopio. Los embriones de 8 días, se ven a simple vista. Cuando un embrión es identificado, es lavado como mínimo por 3 pasajes sucesivos en gotas de un mililitro de medio DPBS con 10% de suero fetal bovino, luego del lavado el embrión se coloca en el mismo medio en una placa de Petri de 35 x 10 mm. El embrión es evaluado a mayor aumento y calificado usando la escala de 1 (excelente) a 4 (pobre). Los embriones pueden ser tomados utilizando pajuelas de 0,25 o 0,5 c.c.



Foto 5) Yeguas donantes al realizarse la recolección de embriones. Se logro recolectar un embrión de aproximadamente 7 días.

### **Evaluación embrionaria**

La valoración del grado del embrión, la etapa de desarrollo y medición del tamaño son componentes claves. Una evaluación precisa es importante en un programa de transferencia de embriones.

La recuperación de un pequeño embrión en el estadio de mórula, de una donante el día 7/8 puede determinar la transferencia de una yegua receptora el día 5, la cual esta sincronizada basado en la etapa del embrión.

Otro caso son los buenos resultados obtenidos en la criopreservación de embriones de menos de 300  $\mu\text{m}$  y progresivamente peores resultados con embriones significativamente mayores a 300  $\mu\text{m}$ .

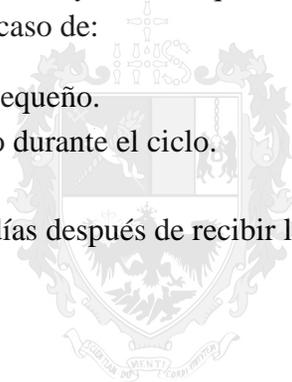
## Revisación de la receptora el día 5

Las yeguas receptoras deben ser examinadas 5 días después de la ovulación para determinar si clasifican para recibir un embrión en ese ciclo, las mismas están disponibles para los próximos 3 o 4 días. Los criterios de revisión incluyen:

- Calidad de ciclo estral (patrón de crecimiento folicular, patrón de edema, detección de la ovulación).
- Presencia de cuerpo lúteo.
- Tono de útero y de cérvix, ausencia de edema uterino.
- Tamaño de receptora en relación a la yegua donante.
- Salud física general.
- Ausencia de anomalías reproductivas, problemas médicos o trastornos del comportamiento.

Hay que tener en cuenta que también hay factores que disminuyen la probabilidad de usar una yegua como receptora y es el caso de:

- Ovulación de un folículo pequeño.
- Ausencia de edema uterino durante el ciclo.
- Ciclo de mala calidad.
- Ovulación temprana, dos días después de recibir las prostaglandinas.
- Fallo en la ovulación.



USAL  
UNIVERSIDAD  
DEL SALVADOR

La transferencia embrionaria es usualmente realizada utilizando:

- 1) pipeta de inseminación artificial estándar.
- 2) pistola de inseminación plástica desechable.
- 3) pistola de inseminación de acero inoxidable reusable.

En todos los casos se utiliza una camisa sanitaria plástica estéril para cubrir los instrumentos de transferencia. Para realizar la transferencia, la yegua es colocada en un brete, sedada y luego se prepara el área perineal, de la misma forma que fue descrito para la recolección embrionaria. El operador se coloca un guante plástico estéril en el brazo así como, gel lubricante estéril en el dorso de la mano del operador y sobre la vulva de la yegua. La punta del instrumento de transferencia (cubierto por la camisa sanitaria estéril) es colocada en la palma de la mano y la punta es protegida por el pulgar. El instrumento es colocado a través de la vulva y la punta introducida en el orificio cervical externo aproximadamente 0.5 cm y en este momento se adelanta hacia la luz del cuerpo uterino. El embrión puede ser depositado en el cuerpo uterino o en alguno de los cuernos uterinos. Para depositar el embrión en el cuerno uterino el instrumento es guiado por palpación transrectal. Ubicado correctamente, el instrumento de transferencia es retirado lentamente de manera que la punta no sea obturada por la pared del endometrio mientras se descarga el embrión.

### Examen de preñez en receptora

Se realizan por ultrasonido, en intervalos específicos basados en la edad del embrión, la mayoría de las preñeces pueden ser detectadas entre el día once y doce. Pequeños embriones como blastocistos temprano o mórulas de 150 a 250  $\mu\text{m}$  pueden convertirse en vesículas embrionarias visibles a partir del día 14. El chequeo final para el diagnóstico temprano de preñez se realiza a los 16 días del embrión, donde ya se produjo el reconocimiento materno de preñez y se está produciendo la implantación de dicho embrión.

Los embriones equinos crecen una tasa promedio de 3 a 5 mm por día, desde el día 11 hasta el día 16 de preñez. La incapacidad para avanzar en la etapa de desarrollo está asociada a la pérdida embrionaria.

Días de preñez	Diámetro vesícula embrionaria (mm)
11	5,5 +- 0,1
12	8,5+- 0,1
14	14,9+- 0,2
16	23,5+- 0,2

Tabla 3: diámetro de vesícula embrionaria según día de preñez.

## V) Conclusiones

La eficiencia de la técnica reproductiva en los equinos se ha beneficiado y ha incrementado en los últimos años ya que alcanzo gran difusión e impacto en sistemas productivos que aprobaron su uso, mayormente en polo.

Se puede esperar una tasa de recuperación de embriones del 50 a 80 % y una tasa de transferencias exitosas del 50 a 80 %, lo que determinaría un porcentaje de preñez total del 40 al 80%.

Por ésta técnica es posible obtener, en promedio, 4 ó más potrillos por año hijos de la misma yegua seleccionada o producir potrillos de yeguas en competición.



USAL  
UNIVERSIDAD  
DEL SALVADOR

## VII) Bibliografía

- ✓ GARCIA SACRISTÁN. “Fisiología Veterinaria”. Editorial Interamericana. 1995.
- ✓ GEOFREY H. ARTHUR “Reproducción y obstetricia en veterinaria”.
- ✓ GUYTON-HALL. “Tratado de Fisiología Médica”. 10º Ed. 2002.
- ✓ HAFEZ, E.S.E.: Reproducción en los animales de granja Editorial Herrero.1998.
- ✓ <http://www.produccion-animal.com.ar> reproducción y biotecnologías en producción equina
- ✓ [https://www.ivis.org/proceedings/toc3\\_proceedings.asp](https://www.ivis.org/proceedings/toc3_proceedings.asp)
- ✓ Hormone and other medical therapies in embryo transfer recipient mares. Society for Theriogenology. Embryo Transfer proceedings, (27-35), Monterrey, CA ,USA; 2007.

