

Reproducción asistida en equinos: aportes desde la teoría* *Assisted reproduction in horses: contributions from theory*

Daniel Ángel¹, MVZ; José A Bran², MV.

¹Médico Veterinario y Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Universidad CES. Medellín - Colombia. Correo electrónico: danielangel30@gmail.com

²Médico Veterinario. Estudiante de maestría en agroecosistemas-Centro de Ciencias Agrarias,
Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis-Brasil Correo electrónico: chocarrero@gmail.com

(Recibido: 27 de febrero de 2010; aceptado: 30 de junio de 2010)

Resumen

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) se han desarrollado rápidamente en los últimos años en la producción equina. El propósito de esta revisión es mencionar y discutir las principales TRA utilizadas en equinos actualmente. En Colombia, son empleadas de manera rutinaria técnicas como la inseminación artificial (IA) (utilizando semen fresco, refrigerado o criopreservado) y la transferencia de embriones (TE), con el interés de aumentar el número de crías de determinados ejemplares o mejorar el desempeño reproductivo de estos. La transferencia de oocitos (TO) y la transferencia intraoviductal de gametos (TIG), son utilizadas en algunos países en yeguas con disfunción reproductiva; Estas técnicas tienen menor aplicabilidad en nuestro medio. La producción de embriones *in vitro*, junto a la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), o la clonación por transferencia nuclear, han sido realizadas en la especie, a nivel de investigación básica, o comercialmente en algunos países con altos costos, y no representan hoy una herramienta para el área clínica de campo en el país, pero son de gran interés para el conocimiento de la fisiología, de disfunciones reproductivas y del desarrollo en la especie.

Palabras clave

Embrión, espermatozoide, folículo, FSH, transferencia nuclear.

Abstract

Assisted reproductive techniques (ART) have developed rapidly in recent years in equine production. The purpose of this review is to mention and discuss the main TRA currently used in horses. In Colombia, are routinely used techniques such as artificial insemination (AI) (using fresh, chilled or cryopreserved semen) and embryo transfer (ET), with the interest of increasing the offspring of certain animals or improving reproductive performance of them. The oocytes transfer (OT) and gamete intrafallopian transfer (GIFT) are used in some countries in mares with reproductive dysfunction; these techniques are less applicable in our country. The production of *in vitro* embryos, together with Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) or cloning by nuclear transfer have been made in equines in basic research, or commercially in some countries with high costs that now, do not represent a tool for the clinical area in the country, but are of great interest for understanding the physiology, reproductive disorders and development in the equine specie.

*Para citar este artículo: Ángel D, Bran JA. 2010. Reproducción asistida en equinos:nuevos aportes desde la teoría. Rev Ces Med Vet Zootec. 5(1): 56-69

Key words

Embryo, follicle, FSH, nuclear transfer, sperm.

Introducción

Las herramientas y procesos tecnológicos que el hombre aplica de manera directa o indirecta a la reproducción, en este caso animal, se conocen como biotecnologías reproductivas, o técnicas de reproducción asistida ³⁶. Los reportes anecdóticos de estas herramientas en equinos son antiguos (siglo XVI), pero el verdadero auge ocurrió durante la segunda mitad del siglo pasado con la expansión de la inseminación artificial (IA), y la transferencia de embriones (TE), ambas de gran impacto sobre los sistemas productivos ³⁶.

Técnicas como la IA, TE y TO son hoy aplicadas en la clínica reproductiva de equinos. La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) está cerca de ser usada comercialmente y la transferencia de gametos en el oviducto, la fertilización *in vitro* y la transferencia nuclear, se han realizado en condiciones de investigación principalmente, pero son aún poco útiles en la clínica de la reproducción ^{24, 28}.

Transferencia de embriones (TE)

Mediante este procedimiento se busca recolectar del útero un embrión entre seis y ocho días post-ovulación (a través de lavado uterino) de una yegua donante que fue servida previamente. El embrión se transfiere (de manera quirúrgica o no quirúrgica) al útero de otra yegua receptora sincronizada previamente con la donadora ³⁵.

Esta técnica es muy utilizada en Colombia y otros países, con el fin de obtener potros de yeguas en entrenamiento, ya que las yeguas que son entrenadas o están en competencias, pueden presentar fallas para concebir o deben ser retiradas de competencia cuando están gestantes para garantizar su salud y la continuidad de la gestación; conseguir más de un potro de una yegua cada año; obtener potros de potrancas de dos años, que aún no tienen capacidad

corporal para mantener la gestación, pero podrían así iniciar su vida reproductiva más temprano; obtener potros de yeguas subfértiles o de yeguas con problemas de salud de índole no reproductiva, así como la utilización de la técnica como herramienta en investigación ^{2, 52}.

La primera TE equina exitosa fue comunicada por Allen y Rowson en 1972 ³, sin embargo, la técnica no fue utilizada como procedimiento clínico hasta comienzos de la década de los 80's. En esos tiempos la TE estuvo limitada por la necesidad de mantener a las yeguas receptoras en el mismo lugar donde se realizaba la recolección de embriones, o al envío de las yeguas donantes a centros de transferencia embrionaria. A fines de los años 80's fue descrito un método práctico de refrigeración de embriones equinos, que permitió el transporte de estos por corto tiempo (24 horas) ¹². Esto favoreció la fácil recolección de embriones en campo y el envío de estos (refrigerados) al lugar donde estuvieran las hembras receptoras, haciendo este procedimiento más práctico y menos costoso ^{12, 56}.

Superovulación

Debido a que la hembra equina es mono ovulatoria, mediante superovulación (SOV) se busca inducir ovulaciones múltiples en ella, con el fin de coleccionar varios embriones para transferir. El número de folículos que ovulan en respuesta a SOV en la yegua son limitados, (a diferencia de los bovinos) debido al poco espacio disponible en la fosa de la ovulación y al gran tamaño de los folículos preovulatorios en esta especie. Algunos investigadores han utilizado productos para SOV en yeguas como la FSH porcina, extracto crudo de hipófisis equina (EPE)¹, GnRH, gonadotropina coriónica equina o inmunización contra la inhibina, pero con resultados limitados ^{1, 55}. Hace algún tiempo, está disponible en el mercado un preparado de FSH equina (FSHe) purificada³⁹.

Esta FSHe es eficiente pero existen inconvenientes para superovular algunas yeguas debido a la amplia variación en la respuesta por cada individuo³⁴. Otra dificultad que se presenta es la no ovulación de folículos preovulatorios en algunas yeguas^{19, 48, 49}. En general, las hembras jóvenes que se encuentran ciclando normalmente responden consistentemente a la FSHe, mientras que yeguas de edad avanzada, tienen una respuesta variable^{39, 40, 55}.

El tratamiento con FSHe permite, la recuperación, en promedio, de dos embriones por lavado en yeguas tratadas, versus 0.6 a 0.7 embriones por lavado recuperados en animales no tratados^{40, 48}

Luego de inducir la formación de múltiples folículos, se usa una hormona para producir la ovulación de estos (simulando el pico de LH). La gonadotropina coriónica humana (hCG) es utilizada con este fin, aunque existe controversia sobre su eficiencia para inducir ovulación cuando es usada varias veces en la misma yegua³⁹, ya que algunos autores sugieren la generación de tolerancia farmacológica al producto por parte de ciertas yeguas³⁰. De otro lado, hoy se dispone de una hormona luteinizante recombinante equina (LHre): dicha hormona, a dosis total de 750ug induce ovulación en yeguas con un folículo preovulatorio^{40, 62} e incluso parece ser más efectiva que la hCG para provocar la ovulación en yeguas tratadas con FSHe⁴⁰.

Momento del tratamiento: consideraciones fisiológicas

La hormona folículo estimulante (FSH), producida por las células gonadotropas de la hipófisis anterior, promueve la emergencia, el crecimiento inicial y el desarrollo de los folículos ováricos^{23, 39}. Los folículos de una onda folicular tienen una tasa de crecimiento común desde la emergencia de la onda hasta el inicio de la *desviación folicular*, cuando un folículo crece de manera constante y los otros folículos presentan, comparativamente un menor crecimiento. Una vez que el folículo más grande llega a medir, aproximadamente 23,5 mm, ocurre la *divergencia folicular* (este folículo continúa creciendo y los otros folículos se tornan subordinados). En un ciclo normal, el pico de FSH se logra cuando el folículo de

mayor tamaño llega aproximadamente a los 13 mm y la desviación ocurre entre 3 a 4 días luego de este pico. Si se administra FSH exógena para impedir que ocurra desviación folicular, se espera alterar el ciclo y permitir que varios folículos ovulatorios se desarrollen en el ovario^{34, 48, 55}.

Tratamiento con FSHe: consideraciones técnicas

Existen dos formas de abordar el tratamiento: iniciar de cinco a siete días pos ovulación (alrededor del momento en que se espera el inicio de la onda folicular primaria) o examinar los ovarios con ecógrafo, desde el día cinco pos ovulación, e iniciar tratamiento una vez que el folículo más grande llegue a medir 23 o 25 mm^{40, 48}.

Protocolo para la recuperación de embriones

Realizar ultrasonografía del día cinco a siete pos ovulación y empezar tratamiento con FSHe (12,5 mg IM, dos veces día) cuando haya folículos entre 22 a 25 mm; administrar PGF_{2α} (cloprostenol 250 mg, IM) el segundo día de tratamiento. Finalizar el tratamiento con FSHe cuando varios folículos midan entre 32 o 35 mm (generalmente cuatro o cinco días de tratamiento). Administrar hCG (2.500 UI, IV) entre 30 a 36 horas luego del fin del tratamiento con FSH. Si la yegua es geriátrica (más de 15 años) o no responde a hCG, administrar un análogo de GnRH (deslorelin, acetato de buserelina, entre otros); inseminar inmediatamente o en un máximo de 24 horas. Lavar el útero para recuperar los embriones: aquellos que serán transferidos inmediatamente son colectados el día siete u ocho posovulación y los que se desea criopreservar, deben recuperarse el día seis (6,5 días)^{39, 40, 55}.

En el proceso de lavado, la infusión y recuperación de líquido en el útero debe realizarse por gravedad; generalmente se utiliza 1 L. de solución salina fosfatada buffer o ringer lactato (Hartman) por lavado, para un total de tres a cinco lavados continuos. El líquido del lavado es conducido a través de un filtro para embriones y luego el contenido del filtro es examinado en estereoscopio para localizar el embrión. El embrión es lavado y transferido al útero de la hembra receptora (no

se ha observado diferencia en tasas de gestación cuando las receptoras ovulan entre un día antes y tres días luego de la hembra donadora). El embrión es cargado en una pajilla de inseminación (0,25 o 0,5 mL) y luego en una pistola para transferencia de embriones. Al parecer es importante no dilatar el cérvix con los dedos e ir retirando la pistola de transferencia al momento de liberar el embrión para que no roce con los pliegues uterinos ^{2,24}.

Transferencia de oocitos (TO)

La TO es utilizada en equinos, ya que el cultivo *in vitro* de oocitos para el mercado, no es viable actualmente: de los oocitos cultivados *in vitro*, sólo maduran el 50% y además, estos tienen baja viabilidad comparados con los oocitos madurados *in vivo* ^{3,13,38}. La técnica consiste en la transferencia, por vía quirúrgica, de un oocito de una yegua donadora al oviducto de una hembra receptora ^{13,14}. Se han descrito varias técnicas para la recuperación *in vivo* de oocitos: aspiración folicular con exteriorización del ovario ^{38,57,59}, aspiración transcutánea desde el flanco ^{27,36,45}, y aspiración folicular transvaginal guiada ecográficamente (Ovum pick-up, OPU) ^{9,10,11,15,16,17,31}.

Para realizar TO debe sincronizarse el crecimiento folicular entre la donadora y la receptora, ya que cada yegua debe tener un folículo receptivo a gonadotropinas (GnRH, hCG, o deslorelin) en el mismo día. Las gonadotropinas son administradas a ambas yeguas al mismo tiempo y los folículos de cada una son aspirados entre 24 a 35 horas después de la aplicación de gonadotropinas ^{13,14,19}. Los folículos de la hembra receptora son aspirados para evitar gestación gemelar y garantizar que el oocito fertilizado será el de la yegua donadora.

El oocito de la receptora es descartado y el de la donadora se introduce con una pequeña cantidad de medio dentro de una pipeta de vidrio estirada al fuego o en un catéter tomcat. La receptora es inseminada y horas después es sometida a laparotomía en el flanco o laparoscopia para exponer el oviducto. La pipeta o el catéter con el oocito son introducidos en el ámpula y allí es depositado el oocito. Las tasas estimadas de éxito en transferencia de oocitos son: del 70% para

recuperación de los oocitos de la donadora y 35 a 50% de gestación luego de transferirlos ²⁴.

La TO es una excelente opción para obtener descendencia de yeguas que no consiguen concebir porque presentan serios problemas en útero u oviducto ^{5,13,19}, como endometritis persistente crónica, adherencias o desgarros, así como para aquellas que presentan fallas tanto en la ovulación como en la captación del oocito por parte del oviducto ²⁶.

Inseminación artificial, preservación del semen y dosis inseminante

La inseminación artificial (IA) se ha utilizado con éxito en equinos. Al parecer, la primera descripción de una IA fue en 1322, cuando el semen de un semental árabe se recuperó de la vagina de una yegua recientemente apareada, fue transportado en leche de camella, y depositado en la vagina de otra yegua para producir un potro ⁴.

El interés por la IA se incrementó durante el siglo XIX y principios del siglo XX en Gran Bretaña. Los rusos y los chinos adoptaron esta técnica y la utilizaron en más de 600.000 yeguas entre 1930 y 1960 ⁴. Desde entonces, la colecta de semen, la manipulación seminal, y la IA con diversas técnicas ha mejorado y su aplicación ha sido exitosa en equinos ^{46,49,50}.

Actualmente se recomienda inseminar a las yeguas con 500 millones de espermatozoides con motilidad progresiva (EMP), inmediatamente pos coleccion, o con un billón de EMP con semen refrigerado y almacenado durante 24 horas a 5°C. La dosis utilizada con semen criopreservado varía entre 400 a 800 millones de espermatozoides ^{41,46,47}. Cuando se tiene poco número de espermatozoides para inseminar, es recomendable utilizar inseminación intrauterina profunda (IIP) guiada vía rectal o con endoscopio ²⁰. Utilizando semen de excelente calidad en IIP guiada vía rectal, pueden utilizarse dosis entre 25 a 50 millones de espermatozoides; Si se cuenta con un número menor de espermatozoides o estos han sido deteriorados por congelación o sexaje, se justifica el uso de inseminación con video endoscopio ^{20,42,44}.

Tabla 1. Opciones de tipo de semen para IA, su porcentaje de uso y la tasa de preñez por ciclo (Datos tomados y adaptados de Squires en 2009) ⁵⁶.

<i>Tipo de Semen</i>	<i>Porcentaje de uso (%)</i>	<i>Tasa de Preñez/ciclo (%)</i>
Fresco ^a	50 – 60	65 – 70
Refrigerado ^b	30 -45	50 – 60
Criopreservado ^c	5–10	40 -50

^a Colecta e inseminación en máximo 1 hora

^b Colecta y refrigeración para inseminar en un promedio de 24 horas

^c Criopreservado en nitrógeno y descongelado para inseminar

El proceso de criopreservación es relativamente sencillo: se adiciona un primer diluyente al semen y es centrifugado, para separarlo del plasma seminal; luego se resuspende el semen en otro diluyente con un crioprotector (glicerol, amidas, etilenglicol), es empacado en pajillas y criopreservado en vapores de nitrógeno o mediante un congelador programable: las tasas de congelación varían entre -10 y -50°C/min ^{42, 51}. Se considera adecuado dejar del 5% a 20% de plasma seminal con el fin de obtener un adecuado proceso de congelación ya que mucha de la capacidad antioxidante del semen se encuentra en este⁷. La mayoría del semen equino es criopreservado en pajillas de 0,5 ml a una concentración de 200 a 400 millones de espermatozoides por ml ⁴⁹.

La criopreservación seminal es común en equinos, aunque en esta especie la técnica es menos exitosa que en bovinos y existe alta variabilidad entre los porcentajes de éxito entre reproductores. Al parecer solo el 30-40 % de los caballos producen semen que pueda criopreservarse, observándose gran variación entre razas en esta característica. El método de congelación espermática, la composición de los diluyentes necesarios para preservar la integridad y

fertilidad del espermatozoide, el momento y el sitio de inseminación, así como la dosis óptima son factores que pueden contribuir a la variabilidad en las tasas de gestación entre individuos ^{6, 8, 41, 58}.

Durante la criopreservación, los espermatozoides sufren cambios físicos y químicos que pueden ser dañinos, como: deshidratación parcial, penetración del crioprotector a las células, reorganización de proteínas y lípidos de membrana, exposición a elevadas concentraciones de sales y a cristales de hielo intra y extra celulares. La descongelación expone a los espermatozoides a los mismos efectos, pero a la inversa ^{6, 7, 51}. Estos cambios pueden producir daños oxidativo y osmótico al espermatozoide. Las bajas temperaturas pueden producir daño oxidativo en la membrana, las proteínas o el ADN de los espermatozoides y el estrés osmótico puede dañar la membrana y alterar el metabolismo espermático ^{6, 7, 50}.

Los protocolos de criopreservación se diseñan para minimizar los efectos negativos de estos cambios, entre ellos un método para disminuir la lipoperoxidación es la adición de antioxidantes a los diluyentes para criopreservación ⁷.

Para minimizar el estrés osmótico durante la criopreservación se ha utilizado la dilución de crioprotectores, y se han evaluado crioprotectores alternativos al glicerol. También se ha tratado de aumentar la estabilidad de la membrana incorporando ciclodextrinas cargadas con colesterol (CLC) en los diluyentes para criopreservar ⁴³

Squires *et al.* (2004) ⁵⁰, evaluaron cuatro amidas como alternativa al glicerol en criopreservación. Estas son de menor peso molecular que el glicerol y pueden penetrar la membrana plasmática más fácilmente. Estos autores encontraron que la metil formamida (MF), dimetil formamida (DMF) o el etilen glicol (EG) a 0.9 M protegen el espermatozoide equino igual que el glicerol. Recientemente se ha evaluado el efecto del aminoácido L-glutamina como crioprotector para preservar la motilidad del espermatozoide equino durante la criopreservación y descongelación. Khelifaoui *et al.* (2005) ³², mostraron que la adición de 50 mM de glutamina mas 2,5% de glicerol mejoró significativamente la motilidad espermática comparado con el diluyente que contenía sólo glicerol.

La IA con semen criopreservado es muy utilizada, principalmente en países como Estados Unidos (Tabla 1) y Francia, donde cada día es más común ^{41, 51, 60}, por lo cual, son adelantadas múltiples investigaciones en nuevos crioprotectores, y en protocolos de congelación. La respuesta de los espermatozoides a la injuria térmica, y a condiciones de vida del animal como la alimentación, época del año, ejercicio ⁴⁰ entre otros, (factores que varían entre sementales) influyen sobre la variabilidad en la criopreservación del semen; sin embargo, la presión del mercado y el trabajo en investigación han llevado a que hoy se logren porcentajes de preñez similares a los obtenidos con semen refrigerado (Tabla 1) ^{36, 47}.

Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

El primer potro logrado mediante ICSI nació en Colorado en 1996 y fue reportado por Squires ⁵³ en el mismo año; luego de este, han nacido muchos potros mediante esta técnica ^{4, 19, 28}. La fertilización *in vitro*

con espermatozoides capacitados no es eficiente en el equino ^{13, 28, 49}, por ello la ICSI es una excelente opción para conseguir la fertilización en estas condiciones. La técnica consiste en capturar un espermatozoide con una micropipeta en un microscopio con micromanipulador e inyectarlo en el citoplasma de un oocito maduro (en metafase II) ^{13, 19, 24}. El embrión obtenido mediante ICSI puede ser transferido al oviducto de una receptora mediante laparotomía o laparoscopia, o cultivado *in vitro* por siete u ocho días hasta blastocisto para transferirlo, vía cervical, al útero ^{13, 19, 53}. El desarrollo hasta blastocisto con fertilización *in vitro* convencional se encuentra en un porcentaje menor al 10%, pero con ICSI se consigue hasta un 80% de clivaje y luego del cultivo y la transferencia del embrión se reporta un porcentaje de preñez del 50% ^{24, 25, 53}. Para realizar ICSI no se precisa de espermatozoides móviles y con una pajilla pueden fertilizarse un gran número de oocitos ¹³.

La ICSI proporciona las siguientes ventajas sobre la TO: el semen usado puede ser congelado o fresco y sus cambios en motilidad no interfieren, se disminuye el riesgo de endometritis pues la yegua no es inseminada, asimismo, no es necesario someter a la receptora a aspiración folicular. Mediante ICSI es posible tratar cada oocito individualmente, hasta que alcance estado de blastocisto y pueda ser transferido a una receptora, con la posibilidad que cada uno de ellos genere un potro, mientras que con la TO son transferidos a receptoras muchos oocitos posiblemente inviábiles, que no formarán blastocistos. De otro lado, al realizar la ICSI se corre el riesgo de lisar el oocito y las tasas de clivaje son menores en comparación con la fertilización *in vivo* ^{24, 28, 37}. También, el costo del proceso es muy alto si se compara con técnicas como TE o TO (Tabla 2).

Esta técnica es usada en la clínica para la reproducción de caballos con bajo conteo espermático, o de caballos muertos, a partir de semen criopreservado. También es prometedora la posibilidad de obtener embriones a partir de ovarios de yeguas posmortem: recuperando oocitos inmaduros de los folículos, y madurándolos *in vitro* para fertilizarlos mediante ICSI, cultivarlos y luego transferirlos ⁵⁴.

Tabla 2. Complejidad, costo y tasa de éxito de las TRA en la práctica equina. (Traducción de la tabla de Coutinho da Silva, 2008) ¹⁹.

<i>Procedimiento^a</i>	<i>Complejidad</i>	<i>Costo</i>	<i>Tasa de éxito (%)</i>
TE	+	X*	33 – 38 ^b
TO	++	1.25 – 1.5 X	23 – 27 ^b
ICSI	+++	1.5 – 2.0 X	13 – 18 ^c

^a TE – Transferencia embrionaria, TO – transferencia de oocitos, ICSI – inyección intracitoplasmática de espermatozoide.

^b Tasa de éxito basada en tasa de colección y tasa de preñez.

^c Tasa de éxito basada en tasa de blastocisto y tasa de preñez.

X* Es una convención que intenta mostrar que si la TE tiene un valor comercial X, a la TO le corresponderá un valor de 1,25 a 1,5 veces este valor X. Es el mismo raciocinio para comparar estas dos técnicas con la ICSI

Transferencia intraoviductal de gametos (TIG)

La TIG consiste en transferir quirúrgicamente un oocito y espermatozoides al oviducto. Es realizada mediante laparotomía con la yegua en estación: una vez expuesto el oviducto, se cargan el semen y el oocito juntos en una pipeta y son depositados allí. Las ventajas de esta técnica son la poca cantidad de espermatozoides utilizados y la disminución en la presentación de endometritis post servicio en las receptoras, (situación que en casos como la TO puede ser más alta, posiblemente por el uso de tranquilizantes y relajantes musculares usados en el proceso de aspiración folicular) ²⁴. En la práctica ha funcionado bien, pero solo con semen fresco. Coutinho da Silva *et al* (2004) ¹⁸, reportaron porcentajes de preñez de 82% usando TIG. Cuando se ha utilizado semen congelado o refrigerado los resultados han sido pobres, quitándole comerciabilidad a la técnica, a no ser que el semental se encuentre en las instalaciones donde se realiza el procedimiento ²⁴.

La TIG ha sido sugerida como opción en yeguas con endometritis persistente, fallas ovulatorias, desgarros cervicales, o en algunos casos de infertilidad idiopática ³⁶.

Clonación mediante transferencia nuclear

Hinrichs define clonación como *el proceso de crear una copia idéntica de un original*²⁵. En los mamíferos, la clonación de embriones se realizó poco después del desarrollo de técnicas de transferencia de embriones ^{24, 25}.

Para el año 2009 ha sido reportado el nacimiento de múltiples equinos mediante TN ^{21, 33, 61}. Squires, en 2009 afirmó que se esperaba que nacieran aproximadamente 50 potros clonados para ese año ⁵⁶. Los primeros embriones equinos producidos mediante transferencia nuclear (TN) fueron reportados en el año 2000 ²⁹ y el primer equino clonado que nació fue reportado en 2003 ^{25, 56}.

Inicialmente la TN fue propuesta como un método para salvar genética valiosa ^{22, 25}, sin embargo, hoy en día, debido a sus fallas y bajo porcentaje de eficiencia, la técnica puede ofrecer principalmente un modelo biológico para investigación básica biomédica ²².

Actualmente la tasa de desarrollo de blastocisto *in vitro* es baja (entre 1% y 10%), aunque la tasa de preñez después de transferir es un poco más alentadora: se reportan entre 9% hasta 60% de gestaciones, sin embargo, con los datos actuales no es viable dilucidar la proporción de gestaciones de clones que lleguen a término y produzcan un potro viable ^{22, 25}.

Proceso de transferencia nuclear

Del equino donante se toma una muestra de tejido que es llevada al laboratorio refrigerada, para cultivarla *in vitro* ^{25, 29}. Generalmente se cultivan fibroblastos ³³, de una biopsia típica de piel. Una vez se alcanza un número importante de fibroblastos, estos son removidos y resuspendidos en medio de cultivo y dividido en varios platos de cultivo, este procedimiento es considerado un pasaje. Todas las células se van deteriorando con los pasajes, por lo tanto, es importante utilizarlos o criopreservarlos en los primeros pasajes (típicamente menos de 10) ²⁵.

Por otro lado, se toma un oocito maduro (metafase II, listo para fertilización) de una yegua con un folículo pre ovulatorio, como esto limita la técnica, otra opción es tomar oocitos de folículos emergentes de ovarios de matadero o de yeguas ciclando, para madurarlos *in vitro* ²⁵. El material nuclear y el cuerpo polar del oocito son removidos mediante micromanipulación. En un microscopio epifluorescencia (esta célula sin material genético, llamada ooplasma), se evalúa con un colorante vital para asegurar que toda la cromatina haya sido retirada. Se toma una célula somática de los cultivos previamente realizados y se combina con el ooplasma., esto se logra posicionando la célula de la donante debajo de la zona pelúcida del ooplasma para después fusionar ambas células por medio de un pulso eléctrico. La célula somática también puede ser inyectada directamente en el citoplasma del oocito, pero para que este último método sea efectivo la

membrana de la célula somática tiene que romperse antes de ser inyectada ^{25, 28}.

Tras la fusión, el oocito recombinado debe ser activado (La activación hace referencia a los eventos desencadenados normalmente por el espermatozoide en la fertilización como la decondensación de la cromatina e inicio de la división mitótica), esto se hace creando un aumento de calcio e inhibiendo proteínas que mantienen el oocito en metafase ^{25, 29}. Una vez activado, el oocito puede ser transferido al oviducto de una receptora, o cultivado *in vitro* hasta blastocisto para ser transferido convencionalmente. Este oocito debe reprogramar las funciones celulares (antes de la transferencia de la célula somática al oocito, dicha célula está transcribiendo para funciones de piel, si es un fibroblasto, la reprogramación tiene que ver con cambiar estas funciones por otras relacionadas al desarrollo embrionario). Si la reprogramación es defectuosa, puede que no se desarrolle la gestación o que el potro muera prematuramente ^{25, 28, 61}.

El papel de los factores epigenéticos, el material genético mitocondrial y el ambiente en la TN

Un individuo que es desarrollado a partir de TN no es, estrictamente una copia exacta del individuo del cual se originó: hay diferencias en la expresión génica y en el ambiente que generan diferencias fenotípicas entre ellos ^{25, 56}. Existen tres grandes mecanismos para explicar esta diferencia:

ADN mitocondrial: El embrión logrado por TN tendrá el ADN nuclear del donador, pero el ADN mitocondrial es del oocito receptor; La mitocondria posee su propio pequeño genoma que codifica en 13 de las 3.000 proteínas estimadas que codifican en su función, el impacto de esto es aún desconocido ^{25, 56}.

Ambiente: el fenotipo del individuo será afectado por el ambiente uterino y la salud de la receptora durante la gestación (hipoxia fetal, placentitis, entre otras), igualmente será afectado por el medio luego del nacimiento; la producción de leche de la madre, el contacto con personas, el entrenamiento, la alimentación, entre otros. El ADN es heredado, pero el fenotipo es la consecuencia de la interacción de genes y ambiente ^{25, 56}.

Factores epigenéticos: son aquellos factores que regulan el funcionamiento de los genes, por ejemplo, algunos genes pueden apagarse y no expresarse y al contrario, otros pueden expresarse ²⁸. En otras especies los problemas comunes en clonación son las pérdidas durante la gestación y la aparición de neonatos no viables por problemas cardíacos, pulmonares u otras anomalías, que generalmente se asocian a anomalías en la formación de la placenta. Los equinos que han nacido por TN hasta el momento no presentan disfunciones atribuibles a la técnica. Los dos primeros caballos clonados que han alcanzado la pubertad han mostrado comportamiento reproductivo normal y su descendencia se espera en breve ²⁵.

Conclusión

Podríamos decir que en general, las TRA son desarrolladas de un lado para avanzar en programas de selección y manejo genético, y de otro lado, tienen un importante papel en la medicina reproductiva, para favorecer la reproducción de animales que padecen serias disfunciones orgánicas, sean estas reproductivas o no. Igualmente, estas herramientas son elementos importantes para desarrollar investigación en áreas como la fisiología, embriología, cirugía o genética.

Es importante tener presente que estas técnicas, son herramientas que deben ser integradas de manera adecuada a otras áreas de la producción equina, y que los profesionales deben ponerlas al servicio del conocimiento, para que ellas no constituyan un fin por sí mismas. La utilización de una TRA está sujeta a una decisión profesional, que debe ser basada en conceptos científicos amplios, pues a veces los fracasos en las técnicas pueden deberse al desconocimiento de otros factores importantes para la reproducción como la nutrición, selección genética o el manejo administrativo y sanitario de una unidad productiva.

De otro lado, tal vez una de las mayores preocupaciones que tienen algunos profesionales y propietarios, se refiere a la posibilidad de generar uniformidad genética, favorecer el *inbreeding* o promover enfermedades de tipo genético hereditario en las poblaciones de equinos que son

sometidas a las TRA. Esta es una posibilidad, pero frente a esas inquietudes poco podríamos decir con certeza para nuestro medio, ya que una de las condiciones necesarias para conocer este tipo de impacto negativo en las poblaciones, es el reporte en medios científicos de difusión general, de datos que soporten o nieguen tal posibilidad. Para nuestro medio, son pocos los datos que se publican en referencia a estos tópicos. Se cuenta apenas con la experiencia empírica no sistematizada de muchos clínicos de campo que aplican algunas de estas técnicas y que encuentran en la práctica diaria algunos posibles problemas relacionados al *inbreeding*: algunos clínicos sugieren casos de enfermedad cerebelar o disfunciones neonatales (bastantes comunes hoy en nuestro medio) que ocasionalmente pudieran estar ligados a este fenómeno. De todas formas, el aspecto fundamental en este caso se relaciona con los criterios que definen los programas de selección genética de cada unidad de producción y no con la técnica utilizada para realizar cruzamientos.

Otra preocupación relacionada con las TRA, se refiere a la posibilidad de estar reproduciendo animales de baja fertilidad, como se mostró en técnicas como ICSI o TO en las cuales, a veces, la indicación para la técnica es precisamente la subfertilidad, en ocasiones idiopática. Este punto constituye un gran reto, pues algunos profesionales proponemos que la selección genética en equinos debe contemplar también aspectos como la habilidad materna y reproductiva, la fertilidad y la rusticidad. Sin embargo, en ocasiones priman otros factores, menos importantes desde el punto de vista biológico que pueden conducir en el futuro a problemas de fertilidad de difícil solución en reproducción.

La utilización de las TRA es una realidad en cualquier sistema de producción de caballos de mediana a alta complejidad, comenzando por la utilización masiva de la IA, la ultrasonografía reproductiva hasta la TE. Las TRA de mayor complejidad como ICSI, GIFT y TN, son de baja eficiencia y alto costo operativo, por ello actualmente son dirigidas a una élite de individuos de alto valor genético, económico

o afectivo y ofrecen hoy herramientas para solucionar problemas de infertilidad puntuales e individuales o sirven para generar conocimiento en investigación básica; sus resultados mejoran con el incremento de experimentos controlados trasladables a sistemas reales. De otro lado, la

TE, la criopreservación y algunas variaciones en la IA son técnicas bastante interesantes para el desarrollo productivo en la industria equina, en nuestro medio, siempre y cuando su utilización responda a criterios serios, científicos y de responsabilidad ética profesional.

Referencias bibliográficas

1. Abril JG, Castro JL, Porras JL. 2007. Evaluación del tratamiento superovulatorio con extracto de hipófisis equina en yeguas criollas. *Revista de Medicina Veterinaria*; 14:51-60.
2. Aguilar J, Woods GL. 1997. Embryo transfer in horses: indications, technique, and expected outcomes. In: Youngquist RS, ed., *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders Co; 208-213.
3. Allen WR, Rowson LEA. 1972. Transfer of ova between horses and donkeys. In: *Proceedings of the 7th Int Cong Anim Reprod Art Insem*; 484-487.
4. Allen WR. 2005. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reproduction in Domestic Animals*; 40:310-329.
5. Alonso A, Pinto M, Miragaya M. 2009. Aspiración folicular transvaginal en la yegua. *Proceeding I congreso argentino de reproducción Equina*, Marzo.
6. Aurich C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*; 89(1-4):65-75.
7. Baumber J, Ball BA, Linfor JJ. 2005. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *American Journal of Veterinary Research*; 66:772-779.
8. Boyle MS. 1999. Assessing the potential fertility of frozen stallion semen. In: Allen WR, Wade JF, editors. *Havemeyer Foundation monograph series no. 1*. Newmarket, UK: R & W Publications Ltd.; p. 13-6.
9. Bracher V, Parlevliet J, Fazeli A, Pieterse MC, Vos PLAM, et al. 1993. Repeated transvaginal ultrasound guided follicular aspiration in the mare. *Equine Veterinary Journal*; 15 (suppl): 75-78.
10. Bruck J, Raun K, Synnestvedt B, Greve T. 1992. Follicular aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound guided technique. *Equine Veterinary Journal*; 24 (1): 58-59.
11. Carnevale EM, Ghinter OJ. 1993. Use of linear ultrasonic transducer for the transvaginal aspiration and transfer of oocytes in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*; 13 (6): 331-333.
12. Carnevale EM, Squires EL, McKinnon AO. 1987. Comparison of Ham's F10 with CO2 or Hepes buffer for storage of equine embryos at 5 C for 24 H. *Journal of Animal Science*; 65:1775-1781.
13. Carnevale EK, Maclellan LJ. 2006. Collection, evaluation, and use of Oocytes in Equine Assisted Reproduction. *Vet Clin Equine*; 22: 843-856.
14. Carnevale EM. 2004. Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in the mare. *Animal Reproduction Science*; 82-83: 617-624.
15. Cook NL, Squires EL, Jasko DJ. 1993. Repeated Transvaginal follicular aspiration in cyclic mares. *Theriogenology*; 39 (204) Abstract.
16. Cook NL, Squires EL, Ray BS, Cook VM, Jasko DJ. 1992. Transvaginal ultrasonically guided follicular

- aspiration of equine oocytes. *Journal of Equine Veterinary Science*;12 (4): 204-207.
17. Cook NL, Squires EL, Ray BS, Jasko DJ. 1993. Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of equine oocytes. *Journal of Equine Veterinary Science*; 15 (suppl): 71-74.
 18. Coutinho da Silva MA, Carnevale EM, Maclellan LJ, Preis KA, Seidel GE Jr et al. 2004. Oocyte transfer in mares with intrauterine or intraoviductal insemination using fresh, cooled, and frozen stallion semen. *Theriogenology*; 61:705-713.
 19. Coutinho da Silva MA. 2008. When should a mare go for assisted reproduction? *Theriogenology*; 70: 441-444.
 20. Gahne S, Ganheim A, Malmgren L. 1998. Effect of insemination dose on pregnancy rate in mares. *Theriogenology*; 49:1071-4.
 21. Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, et al. 2003. A cloned horse born to its dam twin. *Nature*; 424:635-635.
 22. Galli C, Lagutina I, Duchi R, Colleoni S, Lazzari G. 2008. Somatic cell nuclear transfer in horses. *Reproduction Domestic Animals*; 43:331-337.
 23. Ginther OJ, Beg MA, Gastal MO, et al. 2004. Follicular dynamics and selection of mares. *Animal Reproduction*; 1:45-63.
 24. Hinrichs K, Choi YM. 2005. Assisted reproductive techniques in the horse. *Clinical Techniques in Equine Practice*; 4:210-218.
 25. Hinrichs K. 2006. Equine cloning. *Vet Clin Equine*; 22:857-866
 26. Hinrichs K, Kenney RM. 1987. A colpotomy procedure to increase oocyte recovery rates on aspiration of equine preovulatory follicles. *Theriogenology*; 27: 237-238
 27. Hinrichs K. 1991. The relation of follicle atresia to follicle size, oocyte recovery rate on aspiration and oocyte morphology in the mare. *Theriogenology*; 36: 157-158.
 28. Hinrichs K. 2005. Update on equine ICSI and cloning. *Theriogenology*; 64:535-541.
 29. Hinrichs K, Choi YH, Varner DD, Hartman DL. 2007. Production of cloned horse foals using roscovitine-treated donor cells and activation with sperm extract and/or ionomycin. *Reproduction*; 134: 319-325.
 30. Householder DD, Pickett BW, Voss JL y Olar TT. 1981. Effect of extender, numbers of spermatozoa and hCG on equine fertility. *Journal of Equine Veterinary Science*; 1 (1):9-13.
 31. Kanitz W, Becker F, Alm H, Torner H. 1995. Ultrasound guided follicular aspiration in mares. *Biol. Reprod. Monogr*; 1: 225-231
 32. Khelifaoui M, Battut I, Bruyas JF, Chatagnon G, Trimeche A, et. al. 2005. Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. *Theriogenology*; 63(1):138-49.
 33. Lagutina I, Lazzari G, Duchi R, Colleoni S, Ponderato N, et. al. 2005. Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction*; 130:559-567

34. Logan NL, McCue PM, Alonso MA, Squires EL. 2007. Evaluation of three equine FSH superovulation protocols in mares. *Animal Reproduction Science*; 102:48-55.
35. Losinno L, Agular J. 2002. Reproducción y biotecnologías en la producción equina, Cátedra de Producción Equina, Depto. Producción Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.
36. Losinno L. 2007. Avances en la Aplicación de biotecnologías reproductivas en equinos, Proceeding del VII simposio internacional de reproducción animal-IRAC. p. 157-164.
37. Mc Kinnon AO, Carnevale EM, Squires EL. 1988. Heterogeneous and xenogenous fertilization of in vivo matured oocytes. *Journal of Equine Veterinary Science*; 8(2):143-147.
38. Mc kinnon AO, Wheeler MB, Carnevale EM, Squires EL. 1986. Oocyte transfer in the mare: preliminary observation. *Journal of Equine Veterinary Science*; 6: 306-309.
39. McCue PM, LeBlanc MM, Squires EL. 2007. eFSH in clinical equine practice. *Theriogenology*; 68:429-433.
40. McCue PM, Patten M, Denniston D, Bruemmer JE, Squires EL. 2008. Strategies for using eFSH for superovulating mares. *Journal of Equine Veterinary Science*; 28:91-96.
41. Metcalf ES. 2007. The efficient use of equine cryopreserved semen. *Theriogenology*; 68:423-428.
42. Morris L. 2006. Advanced insemination techniques in mares. *Vet Clin Equine*; 22:693-703.
43. Oliveira CH, Vasconcelos AB, Souza FA, Martins-Filho OA, Silva MX, et;al. 2009. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Animal Reproduction Science*; 118(2-4):194-200.
44. Pace MM, Sullivan JJ. 1975. Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl*; 23:115-21.
45. Palmer E, Hajmeli G, Duchamp G. 1987. Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes of mares *Journal of Reproduction and Fertility*; 35 (suppl): 689-690.
46. Pickett BW, Voss JL, Squires EL, Vanderwall D, McCue PM, et al. 2000. Collection, preparation and insemination of stallion semen. Bulletin no. 10. Fort Collins (CO): Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University;
47. Pickett BW, Voss JL. 1975. The effect of semen extenders and sperm number on mare fertility. *J Reprod Fertil Suppl* 23:95-8.
48. Raz T, Carley S, Card C. 2009. Comparison of the effects of eFSH and deslorelin treatment regimes on ovarian stimulation and embryo production of donor mares in early vernal transition. *Theriogenology*; 71:1358-1366.
49. Samper JC, Pycock JE, McKinnon AO, editors. 2007. *Current therapy in equine reproduction*. St. Louis: Saunders-Elsevier;
50. Squires EL, Keith SL, Graham JK. 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*; 62:1056-65.

51. Squires EL, Pickett BW, Graham JK. 1999. Cooled and frozen semen. Bulletin no. 9. Fort Collins (CO):Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University;
52. Squires EL, Seidel GE, Jr. 1995. Collection and transfer of equine embryos. Bulletin No. 8. Fort Collins, CO: Colorado State University, Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, - CSU.
53. Squires EL, Wilson JM, Kato H, Blaszczyk A. 1996. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*; 45:306.Abstract.
54. Squires EL. 2005. Integration of future biotechnologies into the equine industry. *Animal Reproduction Science*; 89:187-198.
55. Squires EL. 2006. Superovulation in mares. *Vet Clin Equine*; 22: 819-830.
56. Squires EL. 2009. Changes in equine reproduction: have they been good or bad for the horse Industry? *Journal of Equine Veterinary Science*; 29: 268-273.
57. Vanderwall, D. *Recent Advances in Equine Reproduction*, B. A. Ball (Ed.) Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA. (6-Apr-2000).
58. Vidament M, Dupere AM, Julienne P, Evain A, Noue P, et al. 1997. Equine frozen semen freezability and fertility field results. *Theriogenology*; 48:907-17.
59. Vogelsang MM, Kreider JL, Bowen MJ. 1988. Methods for collecting follicular oocytes from the mares. *Theriogenology*; 29: 1007 -1008.
60. Voss JL, Wallace RA, Squires EL, Pickett BW, Shideler RK. 1979. Effects of synchronisation and frequency of insemination on fertility. *Journal of Reproduction and Fertility*; Suppl27:257-61.
61. Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, et al. 2003. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*; 301: 1063-1063.
62. Yoon MJ, Boimeb I, Colgin M, Niswender KD, King SS, et al. 2006. Single-chain recombinant eLH: Induction of ovulation in mares. *Animal Reproduction Science*; 94:215-216.