

Assisted reproductive technologies in the horses.

Técnicas de reproducción asistida en caballos.

Técnicas de reprodução assistida em cavalos.

Isabel Catalina Vélez^{1*} y Katrin Hinrichs^{1*}

**Autor para correspondencia: Isabel Catalina Vélez*

E-mail: ivelez@cvm.tamu.edu

Texas A&M University, Equine Embryo Laboratory

(Recibido: 24 de Agosto de 2011; Aceptado: 05 de Diciembre de 2011)

Abstract

Assisted reproductive technology (ART) refers to non-conventional methods for obtaining foals by obtaining isolated oocytes in problematic or geriatric mares. In this way, problems with the mare's uterus or oviduct that limit proper sperm transport and survival, adequate fertilization, and consequently embryo transport are bypassed. There are two main methods to recover oocytes from a valuable mare – from the dominant preovulatory follicle, or from all visible follicles on the ovaries. In addition, there are two main methods to fertilize the recovered oocytes: *in vitro*, by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) or *in vivo*, by transferring it to the oviduct of a previously inseminated recipient mare (Oocyte Transfer).

Key words

Intracytoplasmic, oocyte, sperm injection (ICSI), oocyte transfer (OT)

Resumen

Las técnicas de reproducción asistida son métodos no convencionales por los cuales se obtienen potros de yeguas problema o geriátricas mediante la obtención de oocitos viables. De esta manera, los problemas del útero o del oviducto que impiden un buen transporte y sobrevivencia de los espermatozoides, adecuada fertilización y consecuentemente transporte del embrión, son sobrepasados. Existen primordialmente dos métodos para colectar oocitos en yeguas – a partir del folículo pre-ovulatorio dominante o de todos los folículos visibles en los ovarios. Además existen dos métodos para fertilizar los oocitos que han sido obtenidos: *in vitro*, por inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI) o *in vivo*, al transferirlo al oviducto de una yegua receptora inseminada previamente (Transferencia de oocitos).

* Para citar este artículo: Vélez IC, Hinrichs K. 2011 Técnica de reproducción asistidas en caballos. Rev Ces Med Zootec. Vol 6 (2): 124-128

Palabras clave

Inyección oocito intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI), transferencia de oocitos (OT)

Resumo

As técnicas de reprodução assistida são métodos não-convencionais para a obtenção de potros de éguas problemáticas ou geriátricas, através da retirada de ovócitos viáveis. Assim, os problemas do útero ou do oviduto que impedem o transporte e a sobrevivência de espermatozoides, a fertilização adequada e, conseqüentemente, o transporte do embrião são evitados. Existem principalmente dois métodos para coletar ovócitos em éguas – a partir do folículo pré-ovulatório dominante, ou de todos os folículos visíveis nos ovários. Há também dois métodos para fertilizar os ovócitos que foram obtidos: *in vitro*, através de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) ou *in vivo*, transferido-os para o oviduto de uma égua destinatária previamente inseminada (Transferência de ovócitos).

Palavras chave

Injeção oócito, intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), transferência de oócitos (OT)

Colección del oocito del folículo pre-ovulatorio

El oocito puede ser colectado del folículo dominante pre-ovulatorio lo más cerca posible al momento de la ovulación – de esta manera, el oocito recuperado es “madurado naturalmente”, lo que significa que está en el momento apropiado de la meiosis para ser fertilizado. En nuestro laboratorio el folículo dominante pre-ovulatorio es aspirado a través del flanco de la yegua y se obtiene un oocito “maduro” listo para ser fertilizado. Como el oocito es aspirado unas horas antes del momento natural de la ovulación, se cultiva en una incubadora por unas cuantas horas para permitirle completar el proceso de meiosis (Metafase II) y la maduración del citoplasma, la cual es muy importante para la viabilidad del embrión.

Para asegurarse que el folículo es aspirado lo más cerca de la ovulación, esta es inducida con hCG o un análogo de GnRH como la deslorelina cuando el folículo es suficientemente grande o maduro para ser receptivo al estímulo. Normalmente, esto ocurre cuando el folículo mide 33 mm de diámetro en promedio. La aspiración no debe realizarse antes de las 24 horas después de la administración de la gonadotropina, para dar suficiente tiempo a las células del *cumulus* para expandirse, lo cual podría causar que el oocito

se desprenda de la pared folicular, aumentando la tasa de recobro de estos. Por otro lado, la aspiración debe realizarse antes de las 35 horas desde el momento de la administración de gonadotropina, para evitar que la yegua ovule antes de que el folículo sea aspirado.

Para realizar la aspiración del folículo pre-ovulatorio a través del flanco, un área de 6 x 6 cm en el lado ipsilateral del folículo es rasurada y preparada para cirugía. Un trocar con cánula se atraviesa por la musculatura abdominal para llegar a la cavidad peritoneal, una vez puesta la cánula, una aguja calibre 12 de 20 cm de larga se pone a través de esta a la vez que el ovario es manipulado por el recto. Es necesario una buena sedación y buena relajación del recto para lograr una adecuada manipulación del ovario. La punta de la cánula se pone sobre la superficie del folículo y una vez en su sitio se avanza la aguja a través de la pared folicular dentro de este.

El contenido del folículo es aspirado por una segunda persona aplicando aspiración manual leve con una jeringa de 60 ml conectada a la aguja por medio de una extensión de venoclisis. Un medio que contiene heparina es previamente cargado en la

aguja, extensión y jeringa para prevenir coagulación durante la aspiración. Cuando el folículo se colapsa se masajea vigorosamente para ayudar a coleccionar todo el contenido del folículo. Sangre y cúmulos de células de color translucido deben ser observadas en el contenido aspirado si el folículo ha respondido al estímulo de gonadotropina. Es muy importante mantener la jeringa con el contenido folicular a temperatura corporal en todo momento ya que el oocito maduro es muy sensible a cambios de temperatura.

La búsqueda del oocito en el fluido y células aspiradas debe realizarse en un microscopio de disección que tenga platina térmica que permita mantener el oocito a temperatura constante. Si el oocito es encontrado, se cultiva en la incubadora de CO₂. El tiempo que se cultiva el oocito equivaldría al número de horas que se hubiera demorado el folículo en ovular si no se hubiera realizado la aspiración (40 h desde el momento de la administración de hCG y 44 después de la administración de deslorelina). Nosotros hemos logrado una tasa de recobro de oocitos de folículos pre-ovulatorios del 70 a 80%.

Aspiración de folículos inmaduros

Otra alternativa para coleccionar oocitos en la yegua es aspirar todos los folículos visibles en el ovario en cualquier momento del ciclo. Cuando folículos inmaduros son aspirados, se recuperan oocitos inmaduros que deben ser madurados *in vitro* en la presencia de gonadotropinas para que lleguen a metafase II, el estado adecuado de meiosis para poder ser fertilizados. Por la variación en la población de folículos pequeños en el ovario – algunos creciendo, otros degenerándose – solamente un 60% de los folículos coleccionados son capaces de madurar (llegar a metafase II) cuando son puestos en cultivo.

La aspiración transvaginal de folículos guía por ultrasonido (TVA) es la técnica utilizada para coleccionar oocitos inmaduros de todos los folículos presentes en los ovarios en un momento determinado. Este procedimiento ofrece la habilidad de obtener oocitos de una yegua valiosa cada 14 días. Y es preferible sobre

la aspiración del folículo pre-ovulatorio porque no requiere el seguimiento del ciclo estral o preocuparse por el momento adecuado para la administración de la gonadotropina y consecuentemente de la aspiración. Al final cuando los oocitos son madurados *in vitro*, este método provee un mayor número de oocitos maduros por sesión de aspiración. Aunque se incurre en un bajo riesgo de problemas de salud o en efectos perjudiciales en la capacidad reproductiva de la yegua. Para realizar la TVA, un transductor sectorial de 5 mHz adaptado a una sonda transvaginal que tiene una guía para la aguja es introducido en la vagina. Una aguja de doble lumen calibre 12 o 15 es usada para aspirar los folículos. Una persona sostiene el ovario transrectalmente y lo desplaza caudalmente hacia donde está el transductor transvaginal. La sonda es empujada hacia el fondo de vagina para obtener la imagen del ovario en la pantalla del ecógrafo. El folículo que va a ser aspirado es alineado con la línea guía de la aguja en la pantalla del ecógrafo. La persona encargada de la aguja la avanza a través de la pared de la vagina, entre el ovario y finalmente en el folículo que va a ser aspirado.

El folículo es aspirado y es lavado repetidas veces con un medio que contiene heparina, para prevenir que se bloquee la aguja o la línea de aspiración que conecta con la botella de colección. Mientras se está aspirando, la aguja se rota en ambas direcciones tratando de curetear la pared del folículo al mismo tiempo que el ovario es movido suavemente en diferentes direcciones. Una bomba de aspiración es usada para aspirar los fluidos en una botella de colección. Al final de la sesión de aspiración el contenido de la botella es filtrado a través de un filtro de embriones y la botella es lavado varias veces con el mismo medio que se usó para lavar los folículos durante la aspiración. Los oocitos son localizados entre las células filtradas y después transferidos a un medio de transporte (Medio EH).

Aunque la tasa de recobro de oocitos es más baja para folículos inmaduros (40 a 50%) que para el folículo pre-ovulatorio (70 a 80%) el mayor número de folículos presentes en el ovario que pueden ser aspirados resultando en un promedio de 5 oocitos recuperados por yegua por cada sesión de TVA.

Los oocitos pueden ser mantenidos en el medio de transporte a una temperatura de 22-25 °C por 18 horas sin ningún efecto perjudicial en la tasa de maduración o tasa de formación de blastocitos. Esto ofrece la posibilidad de que veterinarios recolecten los oocitos en la finca del cliente o en sus propios sitios de trabajo y después enviarlos al laboratorio donde van a ser fertilizados *in vitro*.

Colección de oocitos post-mortem

Los oocitos también pueden ser colectados de ovarios post-mortem de yeguas que mueren inoportunamente. Ambos, ovarios u oocitos previamente colectados por el veterinario pueden ser enviados al laboratorio para ICSI y cultivo embrionario *in vitro* para obtener blastocitos. Nuestra recomendación es que si se va a realizar la eutanasia de la yegua, los ovarios deben ser removidos antes de administrar el agente eutanásico. Para esto se anestesia la yegua con xylazina y ketamina y luego los ovarios son removidos. Para enviar los ovarios, estos son mantenidos a temperatura ambiente en una caja de icopor o en un equitainer® a temperatura ambiente. Los mejores resultados se han obtenido cuando los ovarios llegan al laboratorio en menos de 6 horas desde el momento de la extracción.

Si el tiempo de transporte va a ser superior a las 6 horas, la mejor opción es coleccionar los oocitos y luego enviarlos en medio de transporte al laboratorio. Para coleccionar los oocitos de los ovarios, los folículos visibles son abiertos en dos usando una cuchilla de bisturí y toda la pared folicular es cureteada usando una cureta de hueso mediana. El contenido de la cureta es enjuagado en una placa de Petri pequeña con medio (M 199 Hank's salts) y el oocito es localizado en el tejido obtenido usando un microscopio de disección.

Los oocitos deben ser movidos a una placa de Petri de colección con medio limpio mientras todos los folículos son cureteados. Al finalizar con la colección de oocitos estos son puestos en medio de transporte (EH) y son enviados al laboratorio para maduración y fertilización.

Fertilización por transferencia de oocito

Para transferir el oocito maduro en el oviducto de una yegua receptora, la actividad folicular de la yegua donante y receptora debe ser sincronizada de una manera que la ovulación pueda ser estimulada casi al mismo tiempo. El folículo preovulatorio de la yegua donante es aspirado como fue descrito anteriormente. Posteriormente si el oocito es encontrado, el folículo preovulatorio de la yegua receptora es aspirado con el propósito de remover su propio oocito y evitar la fertilización de este.

Alternativamente, una yegua que no esté cerca de la ovulación (en estro temprano o en anestro) puede ser utilizada como receptora de este oocito. Estrógenos deben ser administrados antes de la ovulación de la donante y progesterona después de la transferencia.

El semen utilizado para inseminar la yegua receptora debe ser de la mejor calidad, ya que esta va a ser inseminada utilizando los métodos estándares. La yegua receptora es típicamente inseminada 12 a 24 horas antes de la transferencia del oocito.

Para transferir el oocito en el oviducto de la receptora, el ovario contralateral o ipsilateral a donde se realizó la aspiración del folículo debe exteriorizarse a través del flanco. El oocito es cargado en una pipeta de vidrio o en un catéter Tomcat con el menor medio posible. El infundíbulo del oviducto es sostenido con una pinza de mano, el oviducto es visualizado desde la superficie de la serosa y finalmente el catéter es introducido en el oviducto. El contenido de la pipeta es expresado en la ampulla y el ovario es puesto de vuelta en el abdomen y la incisión suturada.

Una alta tasa de preñez (70%) ha sido reportada utilizando esta técnica en yeguas de investigación que son reproductivamente sanas. Tasas más bajas (35%) han sido reportadas cuando se utiliza en yeguas viejas o con problemas reproductivos en las cuales el oocito puede no ser de la mejor calidad.

Fertilización por ICSI

El uso de ICSI, inyección de un solo espermatozoide en un oocito maduro, evita la necesidad de realizar la cirugía y todo el trabajo que el procedimiento anterior implica. Este es el método de elección cuando un número grande de oocitos son obtenidos. Una ventaja adicional del ICSI es la habilidad de usar menor concentraciones de semen o semen de menor calidad. Es posible descongelar una sola pajilla de semen, diluirla a menor concentración y re-congelar numerosas pajillas que puedan ser usadas posteriormente para realizar ICSI. Esto incrementa el número de intentos que pueden ser realizados con una sola pajilla de semen del reproductor deseado. Ya que la fertilización *in vitro* estándar (combinar los oocitos y los espermatozoides en una placa de Petri) todavía es infectiva en el caballo, ICSI es la única técnica de fertilización *in vitro* que es exitosa en esta especie en este momento. Aunque requiere equipos de alto costo como un micro-manipulador, incubadoras de CO₂ y gas mixto y personal experimentado.

Otras técnicas de reproducción asistidas

Clonación o transferencia nuclear de una célula somática es otra técnica que puede ser empleada. Con esta técnica los genes de un caballo de alto valor genético que no puede producir hijos, como capones que sobresalen en diferentes modalidades deportivas o animales viejos que tiene problemas de salud pueden ser rescatados.

El clon como el mismo reproductor podría tener hijos con la misma información genética de su antecesor.

Para realizar la clonación, células somáticas del caballo que desea replicarse son colectadas y congeladas para uso posterior si así se desea. Típicamente, se realiza una biopsia de piel en la que se colectan fibroblastos. La muestra es enviada al laboratorio para procesamiento y cultivo celular. Las células son cultivadas por varias semanas para permitir que se propaguen y luego son crio-preservadas. La colección del tejido y el cultivo celular son de bajo costo económico y una

vez congeladas las células pueden permanecer en ese estado indefinidamente. Esto permite tomar la decisión de realizar la clonación en cualquier momento.

Para clonar, un oocito fertilizable es usado como el “anfitrión”. Entonces el DNA del oocito anfitrión es removido utilizando el micro-manipulador y una célula del caballo que se desea clonar es introducida. El oocito reconstruido es estimulado para empezar hacer un embrión y luego cultivado *in vitro* para que desarrolle un blastocito de igual manera que se hace con los oocitos después de realizar ICSI. Entonces se produce un embrión con el DNA del caballo deseado.

Otras técnicas que hemos desarrollado en nuestro laboratorio son la biopsia y la vitrificación de embriones. La biopsia permite identificar enfermedades genéticas determinadas en caballos cuartos de milla como Parálisis Periódica por Hipercalemia (HYPP), Astenia regional de la dermis (HERDA) o deficiencia de la enzima de glucógeno ramificadora (GBED) o también puede ser utilizado para identificar el sexo de un embrión determinado. La biopsia del embrión es realizada utilizando el micro-manipulador y las células obtenidas son guardadas para el posterior análisis usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar la enfermedad o el sexo del embrión. Durante el procedimiento de la biopsia, el rompimiento de la capsula y la aspiración de fluido del blastocele permite tener unos mejores resultados en la vitrificación de blastocitos. Con una nueva técnica de vitrificación hemos obtenido tasas de preñez hasta del 70% para embriones día 7 lo cual no había sido posible en equinos hasta este momento.