

MONOGRAFÍA: ANTOLOGÍA DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN
EQUINOS

ANDRES JUAN CARREÑO OROZCO

UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
PROGRAMA MEDICINA VETERINARIA
BOGOTÁ D.C.
2020

MONOGRAFÍA: ANTOLOGÍA DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN
EQUINOS

ANDRES JUAN CARREÑO OROZCO

DIRECTOR: Dr. SEBASTIÁN BONILLA CORREAL

ASESOR EXTERNO: MSc. Dr. SERGIO ALIRIO LIZARAZO BARRERA

UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
PROGRAMA MEDICINA VETERINARIA
BOGOTÁ D.C.

2020

Nota de aceptación:

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Fecha: _____

Dedicatoria

Esta monografía primeramente se realizó de la mano de Dios; quien fue mi guía en senderos en los cuales lo creía todo perdido, así mismo me dio fortaleza para no rendirme.

A mis hijos Isaak y Thomas, quienes al llegar a este mundo y tomar esa parte de mi vida fueron el motor de impulso para iniciar esta travesía.

A mis padres y hermanas que siempre estuvieron de una u otra manera como un apoyo moral y económico, brindándome herramientas que llevaron a culminar lo propuesto.

A mi esposa Carolina y su familia por su apoyo constante e incondicional, y la paciencia en este largo camino lleno de situaciones.

Especialmente a mi tutor externo, el Dr. Sergio Lizarazo y a su hermosa familia por la confianza, apoyo y todo lo que aportaron para hacer esto posible "para que no dejes de soñar con tu futuro".

Andrés Juan Carreño Orozco.

Agradecimientos

A mi familia en general cada miembro de ella los que aún están presentes como a los que también el día de hoy ya no están aquí, todos fueron un pilar fundamental en esta carrera.

Además, quiero agradecer principalmente a la Universidad Antonio Nariño por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de conocer sus espacios y temática para formarme como profesional.

A todos aquellos docentes y tutores que hicieron parte de este arduo camino en el que transmitieron y compartieron sus conocimientos significativos, los cuales me formaron en cada paso que di.

Andrés Juan Carreño Orozco.

Tabla de Contenido

INTRODUCCIÓN.....	11
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo General.....	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. LINEAMIENTOS METODOLÓGICOS.....	16
5. ESTADO DEL ARTE.....	17
5.1 Generalidades de la Transferencia de Embriones	17
5.1.1 Técnica de la transferencia de embriones	20
5.1.2 Elementos en la transferencia de embriones.....	32
5.1.2.1 Fertilidad en el semental	32
5.1.2.2 Selección de la donante y la receptora	33
5.1.2.3 Datos de la sincronización	36
5.1.2.4 El profesional en la transferencia de embriones.....	38
5.2 Investigaciones en la Transferencia de Embriones en Equinos	39
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
6.1 Puntos Críticos del Proceso Relacionado con la TE	47
6.1.1 Puntos críticos y avances en la donante	50
6.1.2 Puntos críticos y avances en la receptora	53
6.1.3 Puntos críticos y avances en la técnica de TE.....	57
6.2 Secuencia de actividades para la TE en Campo.....	58
7. CONCLUSIONES	65
Bibliografía.....	67

Índice de Figuras

Figura 1. McKinnon - Antes de aplicar TE.....	24
Figura 2. McKinnon – Recuperación de embriones.....	25
Figura 3. McKinnon –Transferencia del embrión.....	26
Figura 4. Diagrama recuperación de embriones	28
Figura 5. Equipo para TE no quirúrgica	29
Figura 6. Propuesta – Secuencia de actividades antes de la TE.....	62
Figura 7. Propuesta- Secuencia de actividades en la RE	63
Figura 8. Propuesta – Secuencia de actividades en la TE	64

Índice de Tablas

Tabla 1. Grados de calidad del embrión	29
Tabla 2. Sincronización con progestágenos	37
Tabla 3. Sincronización con prostaglandina.....	37
Tabla 4. Transferencia de embriones en equinos	49
Tabla 5. Porcentaje esperado de parto según la categorización endometrial	54
Tabla 6. Categorización endometrial	56

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1. Recolección de embriones.....	22
Ilustración 2. Zona externa vaginal y anal.....	23
Ilustración 3. Embrión recuperado	30
Ilustración 4. Recuperación del embrión (sonda Folley).....	30
Ilustración 5. Transferencia de embrión	30
Ilustración 6. Confirmación de preñez a los 15 días.....	60
Ilustración 7. Examen clínico previo a la TE.....	60

RESUMEN

Este documento aborda lo concerniente a la técnica de transferencia de embriones para ser aplicada en campo; es definida como un procedimiento mediante el cual se realiza la recolección de embriones logrados a través del lavado uterino, esto en una yegua que se encuentra entre los seis y los diez días después de la ovulación, y que, o ha sido inseminada o se ha usado la monta natural (Torres, 2012); ese embrión recuperado es transferido en la cavidad uterina de la yegua receptora; cabe mencionar que la técnica requiere la sincronización previa entre yeguas (donante-receptora). Los lineamientos seguidos en esta investigación documental se basaron en la revisión de textos y también en documentos e investigaciones publicadas a través de plataformas como PubMed; se realizó el análisis de los documentos, seleccionando aquellos que daban respuesta a los objetivos planteados; el objetivo general fue: Compilar la información relevante sobre la transferencia de embriones en equinos, tendiente a favorecer el porcentaje de éxito en la obtención de embriones que lleguen a término, en campo; para responder a ello los objetivos específicos fueron: Establecer los aspectos que han incidido en el éxito de la transferencia de embriones, desde los inicios de la implementación de dicha técnica; Categorizar las diversas actividades que requieren ser consideradas, para favorecer el porcentaje de éxito en la transferencia de embriones en equinos; Proponer una secuencia de actividades, basado en la definición de puntos críticos del proceso para la transferencia de embriones en equinos, tendiente a favorecer el porcentaje de éxito en la obtención de embriones que lleguen a término, para ser aplicado en campo. El resultado se dirigió a presentar una propuesta de aplicación de la técnica de TE para ser aplicada en campo, presentada a través de tres momentos (antes, durante y después), en los que se listan las actividades a realizar para minimizar los puntos críticos detectados y favorecer mayores resultados óptimos; aportando así al conocimiento dos elementos relevantes, de una parte el compendio del conocimiento presente desde el inicio de la técnica hasta la fecha sobre la TE en equinos; de otra parte la secuencia de actividades para hacer la aplicación de la técnica en campo como una guía que facilita el proceso fortaleciendo los puntos críticos hallados; de igual forma se incentiva la recolección de los datos que surgen en la aplicación de la técnica para fomentar la publicación de investigaciones que mejoren los resultados y minimicen los puntos críticos.

Palabras clave: técnica de transferencia de embriones, transferencia de embriones equinos, TE equinos en campo

ABSTRACT

This document addresses what concerns the embryo transfer technique to be applied in the field; is defined as a procedure by which embryos are collected through uterine lavage, this in a mare that is between six and ten days after ovulation, and that has either been inseminated or has been used natural riding (Torres, 2012); This recovered embryo is transferred into the uterine cavity of the recipient mare; It is worth mentioning that the technique requires prior synchronization between mares (donor-recipient). The guidelines followed in this documentary research were based on the revision of texts and also on documents and research published through platforms such as PubMed; The analysis of the documents was carried out, selecting those that responded to the proposed objectives; The general objective was: Compile the relevant information on the transfer of embryos in equines, tending to favor the percentage of success in obtaining embryos that reach term, in the field; To respond to this, the specific objectives were: To establish the aspects that have influenced the success of embryo transfer, from the beginning of the implementation of this technique; Categorize the various activities that need to be considered, to favor the percentage of success in the transfer of embryos in equines; Propose a sequence of activities, based on the definition of critical points of the process for the transfer of embryos in equines, tending to favor the percentage of success in obtaining embryos that reach term, to be applied in the field. The result was aimed at presenting a proposal for the application of the TE technique to be applied in the field, presented through three moments (before, during and after), in which the activities to be carried out are listed to minimize the critical points detected and favor greater optimal results; thus contributing to the knowledge two relevant elements, on the one hand, the compendium of present knowledge from the beginning of the technique to date on TE in equines; on the other hand, the sequence of activities to apply the technique in the field as a guide that facilitates the process by strengthening the critical points found; likewise, the collection of data arising from the application of the technique is encouraged to promote the publication of research that improves results and minimizes critical points.

Keywords: embryo transfer technique, equine embryo transfer, equine TE in the field

INTRODUCCIÓN

Existen varias técnicas usadas para favorecer los procesos reproductivos en los caballos; algunas de estas técnicas de reproducción asistida (TRA), se han implementado en el país, es así como una de las primeras fue la inseminación artificial (IA), en primera instancia se empleó el semen fresco, pero una vez surgieron las posibilidades de conservar el producto sin perder las propiedades, esto es mediante la refrigeración y/o la criopreservación, la inseminación artificial amplió su cobertura geográfica y con ello aumentó su aplicación (Ángel & Bran, 2010); cabe destacar que resulta muy interesante el conocimiento que se desarrolla alrededor de las posibilidades que surgen de la aplicación de estas técnicas, en la medida en que al estudiarlas se fortalecen los aprendizajes alrededor de la fisiología, así como se genera la comprensión sobre las diversas formas en las que se manifiestan las alteraciones reproductivas y por ende, surgen ideas frente a la manera de superar esas problemáticas.

En cuanto a la Transferencia de Embriones, esta técnica favorece el desarrollo genético completo, si se tiene en cuenta que no solo se valora la historia del semental, sino que de forma paralela se puede comercializar la genética materna (Vizúete, 2016); un hecho relevante en la actualidad es que la comercialización de embriones para ser transferidos puede cruzar las fronteras y alcanzar cualquier continente; también se exalta la posibilidad que abre la TE de obtener potros de excelente exposición de raza de aquellas yeguas bien valoradas pero muy mayores para soportar una preñez adecuadamente (McKinnon, 1999), o la obtención de embriones de aquellas yeguas que se consideran superiores y por consiguiente generan una positiva influencia genética en su descendencia.

En estos tiempos se reconoce la importancia que ostenta la producción equina, no solo en Colombia sino en realidad en casi todo el mundo, por ello la técnica de transferencia de embriones es una labor significativa para el médico veterinario; es así que dependiendo de la práctica y de los conocimientos que el profesional tenga sobre el tema, la aplicación de la técnica puede conducir a resultados óptimos (Vizúete, 2016), esto desde varias perspectivas, una es el favorecer la genética, otra es el aumentar el número viable de potros por año y de por sí, mantener activa la industria equina; en otras palabras, se contribuye a: la conservación de las especies, la producción animal y por supuesto al desarrollo investigativo y económico.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la transferencia de embriones en equinos, como plantea (Torres, 2012), se consideran elementos fundamentales como: la fertilidad presente en el caballo, la condición en la que se encuentra tanto la yegua que dona el ovulo, como la yegua receptora; así mismo es imprescindible el seguimiento del proceso de ovulación de forma óptima; además, la calidad del semen y sus factores asociados: si la colecta acaba de suceder, si el semen ha sido refrigerado o congelado; la edad y las condiciones de salud y reproductivas de las yeguas, así como el entrenamiento del profesional que realiza el proceso de transferencia, resultan ser elementos a considerar como variables dentro de la transferencia.

Ahora bien, la transferencia de embriones puede realizarse en un centro especializado o puede suceder de manera ambulatoria en el lugar donde se encuentran las yeguas; lo cual implica el desplazamiento del profesional en múltiples ocasiones, a los criaderos donde se ubican las yeguas, esto debido a que es probable tener la yegua donadora en un criadero y a la receptora en otro; también la multiplicidad de desplazamientos responde al seguimiento para la detección de la ovulación, y a la búsqueda de la sincronización que debe suscitarse entre donadora y receptora, esto con el fin de lograr mayores porcentajes de preñez.

Debido a que son diversos los factores a considerar dentro del proceso de transferencia de embriones en equinos, existen diferentes protocolos que se dirigen a obtener mayor éxito; en la práctica el profesional suele adoptar un protocolo que aplica normalmente por lo cual adquiere cierta destreza y sistematización de cada una de las actividades; aun así la diversidad de variables a tener en cuenta permiten entender que son múltiples los factores limitantes que inciden: en el porcentaje de éxito en la obtención de embriones, en los porcentajes de preñez y por consiguiente en los embriones que llegan a término.

Por su parte, de acuerdo a lo presentado por (Basto & González, 2019), la fertilidad es considerada una variable de eficiencia en el desarrollo de la población equina, esto desde el punto de vista genético, por ello la transferencia de embriones juega un papel importante en los casos en los que yeguas que poseen un gran valor genético no llegan a desarrollar gestaciones normales y a término, requiriendo así la transferencia embrionaria; obviamente los protocolos de transferencia consideran, además de los factores mencionados, la aplicación de hormonas que buscan, según la etapa, realizar modificaciones al ciclo estral con tal de incidir positivamente en la sincronización entre yeguas donante y receptora y por supuesto en la tasa de fertilidad.

De ahí que autores como (Caldentey, Perkins, & Uslenghi, 2017), buscan establecer causas de mortalidad temprana en los embriones que provienen de transferencia; de esta forma exponen que deben considerarse los eventos de tipo hormonal, la recolección y el transporte del embrión, así como la sincronización de las yeguas.

Por lo expuesto, la presente monografía se dirige a recopilar, a manera de antología, a través de la revisión de diferentes documentos, la evolución dada en el tiempo de la transferencia de embriones en equinos, y de esta manera consignar respuestas para que cada profesional interesado en esta temática de la reproducción equina, encuentre ideas para mejorar los procesos reproductivos mediante la transferencia, claro está teniendo en cuenta las particularidades en cada una de las variables que asume a su consideración.

Ello surge de la necesidad de obtener parámetros como los expuestos por (Martín & Mongue, 2012), que sirven de guía cuando las condiciones no son siempre las óptimas y cuando se generan dudas en cuanto a la calidad de los productos (semen, ovulo, embrión) y los procesos; por ejemplo, caballos cuyo semen es altamente valorado, que cuentan con frecuentes colectas, que su edad es mayor a los diez años, y que además el semen debe ser congelado, transportado y posteriormente descongelado; otro ejemplo tiene que ver con la forma en la que debe establecerse la calidad, el tamaño y la edad del embrión en el momento de la recuperación de este; cabe destacar que en ocasiones las yeguas receptoras no presentan un valor genético acorde con el caballo y/o la yegua donante, aun así se espera un proceso gestacional adecuado, pero no siempre sucede, como consecuencia y motivado por diversos factores, se obtienen resultados que van desde la no implantación del embrión, la reabsorción del embrión hasta llegar a los abortos; todos estos resultados negativos llevan consigo también costos económicos que generan detrimento, para los actores involucrados en dicho proceso.

En suma, la problemática se centra en establecer los procesos adecuados para mejorar el porcentaje de éxito en la obtención embriones que lleguen a término; estos procesos deben tener en cuenta la variación de cada factor implicado en la transferencia de embriones, y deben mostrar nuevas formas de proceder con el fin de aplicar la técnica con mayor precisión en campo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Compilar la información relevante sobre la transferencia de embriones en equinos, tendiente a favorecer el porcentaje de éxito en la obtención de embriones que lleguen a término, en campo.

2.2 Objetivos Específicos

- Establecer los aspectos que han incidido en el éxito de la transferencia de embriones, desde los inicios de la implementación de dicha técnica.
- Categorizar las diversas actividades que requieren ser consideradas, para favorecer el porcentaje de éxito en la transferencia de embriones en equinos.
- Proponer una secuencia de actividades, basado en la definición de puntos críticos del proceso para la transferencia de embriones en equinos, tendiente a favorecer el porcentaje de éxito en la obtención de embriones que lleguen a término, para ser aplicado en campo.

3. JUSTIFICACIÓN

La transferencia de embriones, en términos generales, esta delineada a través de dos protocolos como lo expone (CONtextoganadero, 2017), el primero guía la extracción de los embriones de aquellas yeguas denominadas donantes, proceso que sucede generalmente después de que han transcurrido siete días desde la fertilización; por su parte el segundo protocolo maneja la fecundación de los ovocitos en un laboratorio, para luego ser implantados en la receptora.

Estos protocolos se hacen presentes cada vez más en el contexto nacional, máxime cuando se ha convertido en un negocio muy rentable la explotación de las ventajas genéticas que ostentan algunos ejemplares equinos; en este sentido, desde organizaciones como la Federación Nacional Colombiana de Asociaciones Equinas (Fedequinas), se realiza el reporte de tratamientos genéticos, tal como se expone en: (Agronegocios, 2015); esta es información que puede abstraerse a través de los registros que se diligencian con la información pertinente sobre los caballos criollos colombianos; así mismo la diferentes ferias equinas que se realizan en país resultan ser la vitrina donde se dan a conocer magníficos ejemplares equinos (yeguas y caballos), los cuales pasan a ser muy solicitados para mejorar la producción de equinos en diversos criaderos, a lo largo del país.

Dichos registros pueden ser consultados por los dueños de los criaderos equinos, así se abren las posibilidades, entre otras cosas, para realizar los cruces pertinentes que aseguren el nacimiento de un ejemplar con una carga genética reconocida; para lo cual se usan procedimientos de reproducción como la monta directa, la inseminación artificial o la transferencia de embriones; es aquí donde cobran gran relevancia los conocimientos y las habilidades en el uso de las técnicas de transferencia de embriones por parte de los veterinarios involucrados.

Ahora bien, en campo son múltiples los factores que deben tenerse en cuenta para realizar de forma óptima los procedimientos pertinentes, al igual son diversos los parámetros que deben ser considerados para tal fin; por ello se requiere tener a mano un compendio que considere la inclusión de la información que a la fecha existe sobre la transferencia de embriones en equinos, esto con el fin de favorecer el porcentaje de éxito en la obtención de embriones que lleguen a término; así mismo en campo la fecundación suele confirmarse mediante una ecografía; también se observa la ovulación de la donadora a través de la presencia de cuerpo hemorrágico.

Para lograr este objetivo se hace necesario conocer el transcurso de los aspectos que han incidido en el éxito de la transferencia de embriones, desde los inicios de la implementación de ficha técnica; lo cual denota la importancia de consignar las categorías que forman las actividades que intervienen para lograr éxito en la

transferencia de embriones en equinos; tareas que en ultimas permiten construir una secuencia de actividades para la transferencia de embriones en equinos, tendiente a favorecer el porcentaje de éxito en la obtención de embriones que lleguen a término, para ser aplicado en campo.

Cabe destacar que la transferencia de embriones favorece la obtención de más potros por cada yegua genéticamente óptima, y por consiguiente mayor número de potros en el año; lo cual exalta la actividad de sincronización del ciclo estral entre yeguas donantes y receptoras; así como la valoración de la calidad del semen, entre otros eventos inherentes al proceso; por lo expuesto se hace necesario una secuencia de actividades que considere los factores pertinentes antes de la transferencia de embriones, durante la recuperación del embrión y durante la transferencia embrionaria favoreciendo así la aplicación de la técnica en equinos con un mayor porcentaje de éxito en la obtención de embriones que lleguen a término.

4. LINEAMIENTOS METODOLÓGICOS

Desde la concepción del tema a ser abordado en la presente monografía, se siguieron algunos lineamientos propios de la metodología de la investigación, que ayudaron a organizar las ideas, a concretar los límites del escrito, por consiguiente, permitieron dar cuerpo al contenido, de tal forma que se realizó una secuencia lógica, en la que se alcanzaron los pasos que se describen a continuación.

Investigación documental: El tema seleccionado por la inquietud de favorecer el proceso de transferencia de embriones en campo, situación que se vive con bastante frecuencia en este país, y que fue una de las actividades aprendidas durante la pasantía, genero la inquietud de profundizar en la conceptualización que llevase a formar una aplicación de la técnica en campo con mejores resultados, es decir entre otras cosas, en el sentido de preservar la salud de las yeguas donadoras tanto como en las receptoras y favorecer el desarrollo a término de mayor cantidad de embriones; así pues, desde el punto de vista metodológico, esta es una investigación documental.

Fuentes de información: Como tal, la investigación documental realizada se basó en dos fuentes principales, de una parte, se revisaron textos propios de la medicina veterinaria como: *Manual of Equine Reproduction* escrito por Blanchard, T. L., Hartman, D. L., Brinsko, S. P., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., & Hinrichs, K. (2011); de otra parte se inicio una busqueda en google academico para extraer docuentos que respondieran a **palabras clave**, primero en español y

luego en inglés, así: técnica de transferencia de embriones, técnica de transferencia de embriones en equinos, transferencia de embriones en equinos, embriones equinos; bajo el uso de las mismas palabras clave se accedió a bases de datos especializadas, es el caso de *PubMed*.

Criterios de inclusión y exclusión: Tal como se adquiría la bibliografía se fue dando forma a la tabla de contenido; una vez almacenado cada documento recuperado, se revisó uno a uno, se guardaron en carpetas por tema según el esquema de la tabla de contenido; en este punto se realizó el análisis de los documentos, seleccionando aquellos que daban respuesta a los objetivos planteados, los cuales fueron adquiriendo mayor especificidad en la medida en la que se concretaban los textos a ser incluidos; así mismo se desecharon los documentos que por título parecían servir pero que, por contenido no resultaron importantes o se enfocaban a otros elementos no considerados; cabe destacar que al ir profundizando en la lectura de los documentos, la forma que tomó la monografía fue cambiando; leer y comprender a mayor profundidad la temática permitió reconocer, no solo la forma como inició la técnica, también, los puntos críticos en el proceso de aplicación de la técnica de transferencia de embriones en equinos.

5. ESTADO DEL ARTE

El estado del arte se compone de dos segmentos, el primero se dirige a describir las generalidades respecto del proceso en la transferencia de embriones; el segundo segmento consigna las investigaciones realizadas en el ámbito mundial alrededor de la transferencia de embriones, estas dos revisiones permiten contextualizar la técnica y establecen tanto el punto de partida, como la guía para el desarrollo de los contenidos de la monografía y de allí la secuencia de tareas para la transferencia de embriones equinos en campo.

5.1 Generalidades de la Transferencia de Embriones

Dentro de las biotecnologías reproductivas a disposición se encuentran la inseminación artificial y la técnica de transferencia de embriones (Suárez, 2017); ahora bien, la técnica de transferencia de embriones es un proceso mediante el cual se logra obtener un embrión, esto por medio del lavado uterino practicado en una yegua la cual se conoce como donadora; ese embrión es trasladado al útero de una yegua que hace las veces de receptora, tal como lo expone (Losinno & Aguilar, 2002); el objetivo primordial de la técnica es mejorar la eficiencia, desde el punto de vista genético, de la especie equina; con ello se puede a partir de yeguas

y/o caballos seleccionados, obtener un número mayor de potros en un lapso de un año; además favorece la producción de potros a partir de yeguas que se encuentran compitiendo en certámenes, debido a que los entrenamientos al ser exigentes y demandantes de tiempo no dan oportunidad para mantener una preñez; o bien de yeguas que presentan condiciones patológicas que no son de tipo reproductivo, pero que ostentan un gran valor genético.

En términos generales, dentro de las posibilidades que ofrece la transferencia embrionaria, como lo expone (Scherzer, 2011), en cuanto a caballos se refiere la técnica favorece la producción de más de un potro proveniente de una yegua donadora por temporada reproductiva; los estudios realizados alrededor de las hormonas inducen la búsqueda de superovulaciones y con ello la preservación de embriones viables para ser transferidos a receptoras; lo habitual es recolectar los embriones entre los días 7 a 8 posteriores a la ovulación, la tendencia se dirige a congelar aquellos embriones que se rotulan como jóvenes, es decir los recolectados a los 6 o 6.5 días.

En la transferencia puede trabajarse con embriones que han sido refrigerados durante un lapso de 12 a 30 horas según: (Losinno & Aguilar, 2002), con lo cual se tiene un tiempo más amplio para lograr la sincronización con la yegua receptora; del mismo modo, es posible trabajar con embriones que han sido conservados mediante la congelación, lo cual debe darse a más o menos 196°C; además se puede usar la vitrificación del embrión, como lo presentaron: (Hochi, Fujimoto, Braun, & Oguri, 1994), ellos realizaron un estudio en el que al final lograron obtener “un feto viable en el día 60 del periodo de gestación”.

Y es que las tecnologías reproductivas aplicadas a los caballos se ha apropiado de diversas posibilidades, como lo muestra un artículo publicado por (Squires, Carnevale, McCue, & Bruemmer, 2003), ellos comentan algunos de los avances logrados a la fecha y su favorabilidad ante la aplicación con equinos, es el caso de los embriones que suelen guardarse bajo una temperatura de 5°C, en los dispositivos en los que son almacenados pueden usarse los tapones Zwitteriónicos; como ya se sabe tanto el tamaño como la etapa del desarrollo en la que se encuentra el embrión son claves en el éxito que se logre con el proceso de congelación, es así como se tiene que, las mórulas y los blastocistos que poseen menos de 300 micras requieren una secuencia lenta para el enfriamiento, lo cual puede llegar a la vitrificación; con este tipo de embrión se han reportado “tasas aceptables de preñez” tras el procedimiento de la transferencia de embriones; en general las yeguas donantes proveen de a un ovulo a la vez, esto porque no es fácil lograr superovulaciones con la misma frecuencia; aun así se recomienda el extracto de pituitaria, el cual posee un buen porcentaje de FSH, con ello se promueve mayor producción ovárica y de esta manera se puede llegar al aumento en la recuperación de los embriones a ser transferidos. Las técnicas de

reproducción asistida pueden llegar a favorecer los procesos gestantes en yeguas más añosas y también en subfértiles; otro punto que refieren los autores es que la transferencia embrionaria que se realiza a partir de yeguas donadoras jóvenes y que además reportan excelente estado de salud, influye en el estado de preñez que se presenta en las receptoras llegando al 70% y 80%.

Para los procesos en los que se va a hacer uso de la congelación de los embriones, es importante valorar la calidad, el tamaño y por supuesto la edad del embrión; en el caso de la calidad, deben seleccionarse aquellos valorados en G I, o G II (ver tabla 1); se sabe que los resultados son eficientes al seleccionar para congelar en estado de mórula y también en blastocistos tempranos, en los que no se evidencie ni el blastocele ni la cápsula de glicoproteína circundante; de tal forma que así puede llegar a recuperarse el 80% de los embriones (Acosta, 2019), lo cual fácilmente se traduce en un índice de preñez ubicado entre el 50% y el 60% que puede llegar a un máximo del 86%.

Otra forma de lograr la transferencia de embriones es realizando el proceso intratubárico (Losinno & Aguilar, 2002), en donde se efectúa recolección de oocitos en los folículos de la yegua seleccionada, esta aspiración se realiza con asistencia del ecógrafo; una vez obtenidos se introducen en el animal receptor, previa aspiración de folículos, y se incluye una dosis de espermatozoides; esta forma de transferencia es conocida desde 1987; otra es la inyección intracitoplasmática de espermatozoides es una forma de usar la técnica de transferencia de embriones, en donde: “el oocito maduro recibe un espermatozoide en su citoplasma” para este propósito el espermatozoide es transferido mediante una inyección por micropipeta, la cual tiene conexión al micromanipulador.

Respecto a los oocitos equinos, un estudio que busco establecer el “efecto de los suplementos: fluido folicular y suero fetal bovino sobre la maduración in vitro de oocitos equinos” (Restrepo, y otros, 2010), concluyo que el uso del suero fetal bovino, favorece ampliamente la maduración in vitro de los oocitos equinos si se compara con el fluido folicular.

En cuanto a la fecundación in vitro en equinos, puede decirse que aún no reporta resultados eficientes ante las tasas de fertilización; esto es porque para su aplicación se necesitan importantes y no tan accesibles recursos técnicos, así mismo se hace necesaria una fuerte inversión económica; los resultados denotan, entre otras cosas, la dificultad para establecer el medio adecuado que favorezca el desarrollo embrionario (Restrepo, y otros, 2010); los reportes indican insuficiencia en el estado in vitro para lograr la maduración correcta del oocito. Otro factor que aún no cuenta con una definición clara es “el intervalo óptimo de maduración para

producir embriones de alta calidad”, por ello la efectividad marca blastocistos en una tasa “entre el 10 y el 41% (Ruíz, 2019).

5.1.1 Técnica de la transferencia de embriones

Esta técnica es definida como un procedimiento mediante el cual se realiza la recolección de embriones logrados a través del lavado uterino, esto en una yegua que se encuentra entre los seis y los diez días después de la ovulación, y que, o ha sido inseminada o se ha usado la monta natural (Torres, 2012); ese embrión recuperado es transferido en la cavidad uterina de la yegua receptora; cabe mencionar que la técnica requiere la sincronización previa entre yeguas (donante-receptora).

Por su parte, la recolección de embriones, surge entre los días seis a diez posteriores a la ovulación, parte con el lavado, realizado a la donadora, a nivel uterino; el proceso inicia al introducir en la vía cervico-uterina “una sonda tipo Folley” calibre (14 a 16 g), la cual es fijada al útero por “la insuflación del balón de aire” este puede contener agua o aire (Vizúete, 2016), tras la adecuada fijación se introduce hasta dos litros de lavado en el útero, el líquido es recolectado con el apoyo de un filtro que recoge al embrión, como se aprecia en la ilustración 1; posterior a esto se requiere el lavado del embrión para liberarlo de restos celulares y demás componentes que perjudiquen el paso a la receptora. Así pues, el embrión es acomodado en una pajuela y adosado a un catéter que permite el transporte que guía al lugar de la transferencia, para finalmente ser depositado en la yegua receptora.

Es claro al revisar diferentes referentes, que si bien es cierto la técnica de la TE es la aplicación correcta de pasos, una vez se cuenta con el embrión y hasta depositarlo en la yegua receptora, también es cierto que la efectividad dependerá de todo el proceso que debe seguirse desde la selección de los equinos; así pues y con esta perspectiva, se presentan a continuación algunas de las variaciones que ha vivido la técnica a través del tiempo, desde décadas anteriores para llegar a las prácticas actuales.

El primero de los referentes encontrados, que de una forma relativamente completa presenta la técnica de TE, considerando los tres momentos del proceso, es decir el antes, la aplicación de la técnica como tal y el resultado (McKinnon, 1999); para la década de los noventa el uso dado a la TE, se dirigió frecuentemente a obtener embriones de yeguas consideradas mayores y valiosas, así mismo a tener mayor producción de yeguas superiores, dando así más importancia a la genética materna; a finales de la década e inicios del 2000, la

priorización se centró en los caballos; retomando, la forma de visualizar el proceso en los noventa, lo cual está contenido en el texto presentado por (McKinnon, 1999); y se representa en las figuras siguientes, donde la figura 1, corresponde a los eventos previos a la aplicación de la técnica de TE, se considera relevante la secuencia de acciones para preparar tanto la yegua donante como la receptora, por ello las dos requieren valoraciones medicas completas, con especial atención a la parte reproductiva.

McKinnon resalta de manera especial la revisión de los costos antes de iniciar el proceso, esto es, tener en cuenta los precios totales del procedimiento, e incluir la proyección respecto del valor potencial que puede otorgarse al potro producto de la TE; como se observa en la figura 1, lo deseable es que los tres animales involucrados en el proceso se encuentren bajo condiciones similares de salud alimentación y que estén en el mismo lugar donde se aplicara la técnica; dependerá ya del veterinario la atención que se mantenga a los ciclos estrales de las yeguas, esto con el propósito de realizar un procedimiento eficiente; por ello se promueve la revisión diaria en la búsqueda de ovulación.

Una vez detectada la ovulación debe realizarse el procedimiento de inseminación a la yegua donante, por consiguiente, las dos yeguas deben estar sincronizadas, para que a partir de esto se realice la recuperación de ese embrión entre los días seis a ocho; este protocolo promueve tras la recuperación del embrión, suministrar a la yegua donante prostaglandina con la finalidad de regresar al estado anterior en el menor tiempo posible.

Ahora bien, durante el breve periodo en el que se aplica la técnica, existe una secuencia de acciones cruciales para llegar al buen término propuesto desde el inicio, en este segmento cobra total relevancia la asepsia que maneje el veterinario responsable de aplicar la técnica, esto inicia con la recuperación del embrión y finaliza con la transferencia del mismo a la yegua receptora; por lo expresado la secuencia que se presenta a partir de la figura 2, es vital para evitar infecciones o la presencia de células externas que impidan la implantación normal del embrión.

Entonces, la figura 2 representa las actividades que requieren ser realizadas antes de aplicar la técnica de TE; de esta forma queda claro que el proceso inicia con la gestión de donantes, una vez se tiene la certeza sobre los parámetros reproductivos de las donantes, y se realiza la valoración secuencial, en lo posible diaria, para detectar la ovulación, al sucederse se debe disponer del semen, bien sea por monta directa o por inseminación, realizando así el primer procedimiento; con lo cual desde los seis días siguientes se efectúa la recuperación del embrión, esto se resume en la figura 2.

Por su parte, en la figura 3 se presenta de manera sucinta, las formas más frecuentes de implementar la transferencia de embriones; de una parte, se presentan las dos formas quirúrgicas las cuales difieren en la manera de llegar al lumen del cuerno uterino debido a que, en la primera se accede por una incisión midiventral y en la otra por incisión en el flanco, las dos son relativamente más costosas que al realizar la transferencia de embriones sin la intervención quirúrgica.

Las transferencias no quirúrgicas requieren abordaje por la vía del cuello uterino; la diferencia radica en que en una se usan pipetas sin protección y en la otra se usa protección para la varilla de inseminación, en todo caso el proceso inicia con limpieza y desinfección de la zona externa vaginal y anal, zona que se observa en la ilustración 2, cabe anotar que ese espacio anatómico debe quedar completamente seco, la descarga del embrión, en los dos casos, requiere cuidado y retirar el elemento usado para la descarga con sumo cuidado.

La práctica en el procedimiento hizo que, con el tiempo, la técnica de transferencia de embriones se hiciera más eficaz; aun así la aplicación de la técnica reporta en algunos casos imperfecciones como por ejemplo, que a pesar del esfuerzo realizado los embriones no pegan adecuadamente, son reabsorbidos o se han perdido por infecciones y otros malestares que presenta la receptora en el proceso de la transferencia o después de ella; en búsqueda de resultados más eficientes investigadores de diversas partes del mundo revisan el proceso y concentran su atención en aquellas fallas o puntos críticos que consideran, son determinantes a la hora de mejorar en pro de la obtención de mayor número de preñeces, que resulten en potros saludables, por ende en mayor número de embriones recuperados y mayor número de embriones implantados que se sostengan.

Ilustración 1. Recolección de embriones



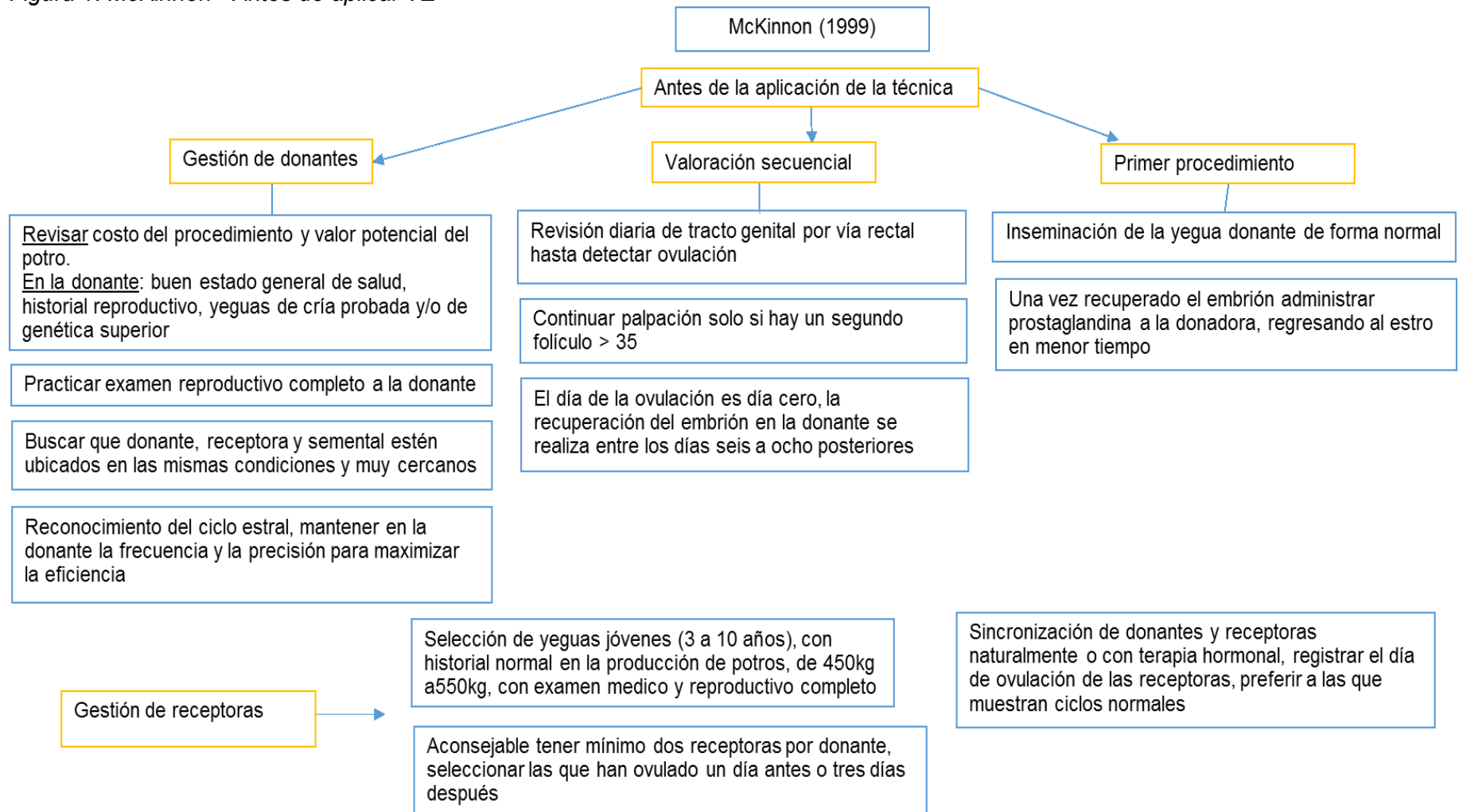
Fuente: (Riera, 2009, pág. 189)

Ilustración 2. Zona externa vaginal y anal



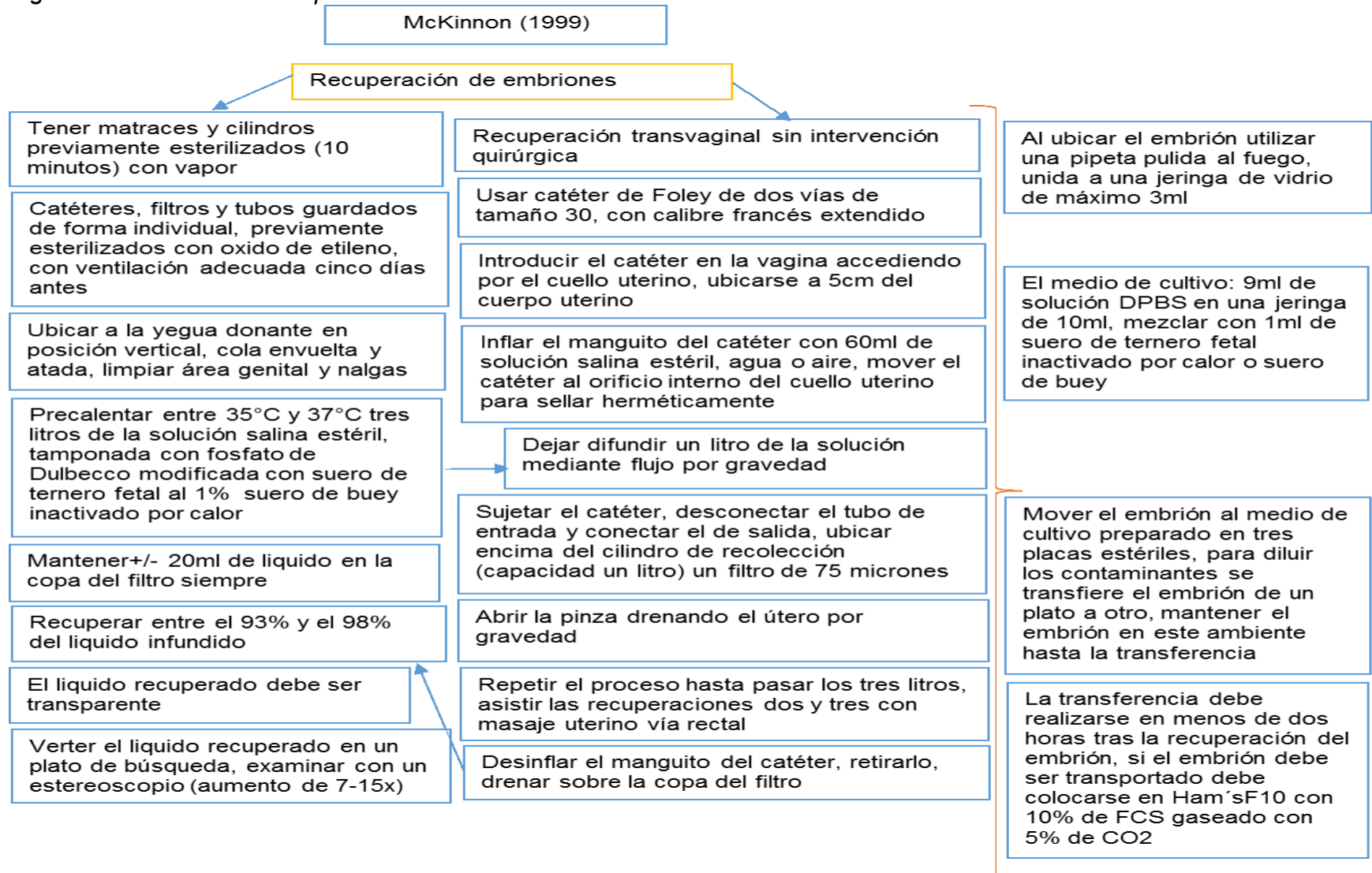
(Samper, 2000, pág. 173)

Figura 1. McKinnon - Antes de aplicar TE



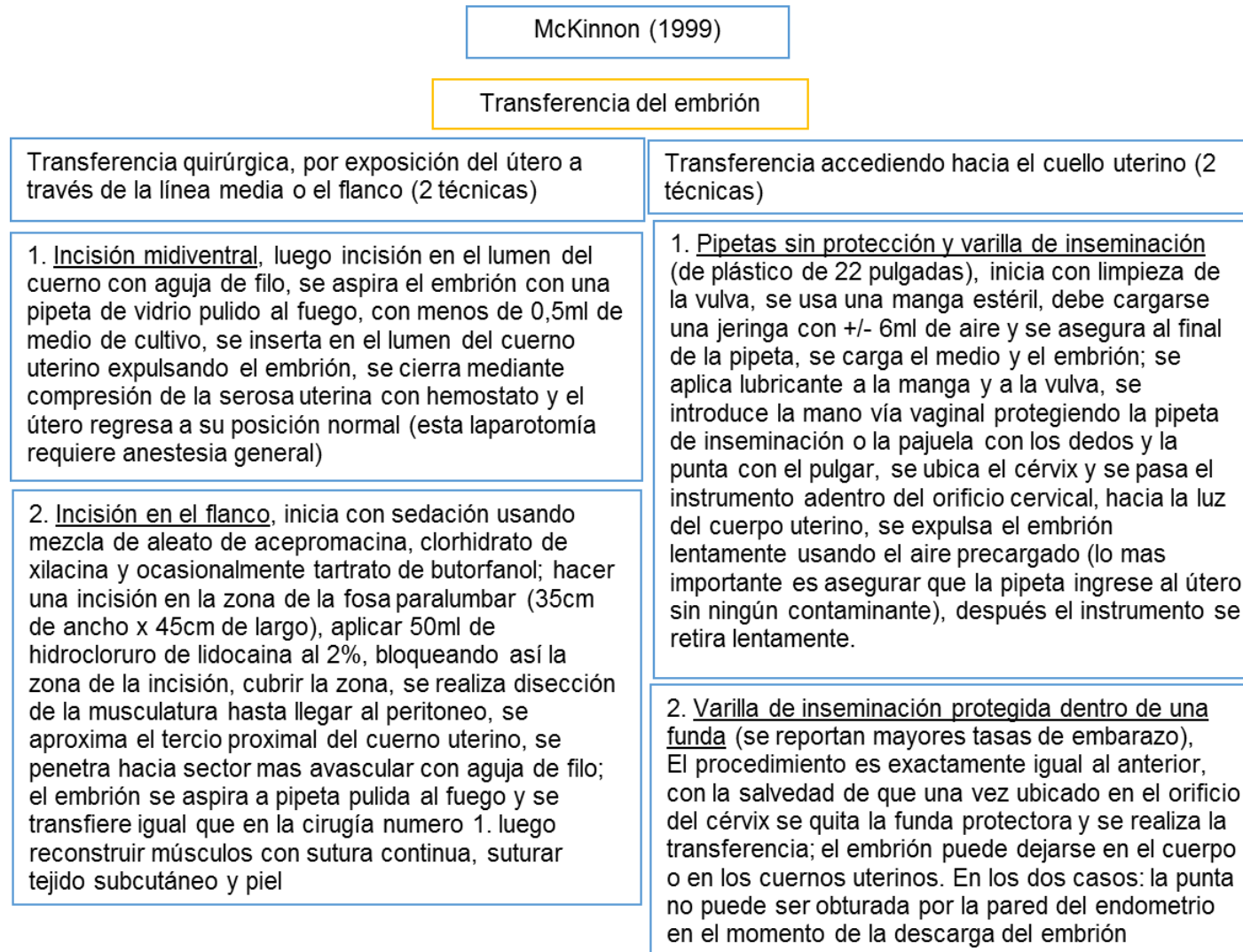
Fuente: el autor a partir de (McKinnon, 1999).

Figura 2. McKinnon – Recuperación de embriones



Fuente: el autor a partir de (McKinnon, 1999)

Figura 3. McKinnon –Transferencia del embrión



Fuente: el autor a partir de (McKinnon, 1999), complemento de (Vanderwall & Woods, 2007)

Ahora bien, una vez terminado el proceso de transferencia, a las yeguas cuya transferencia se realizó por abordaje quirúrgico, según (McKinnon, 1999) debe administrarse penicilina procaína a razón de nueve millones de UI, de forma intramuscular durante cinco días; debe mantenerse en observación por un lapso de tiempo comprendido entre los cinco y siete días posteriores a la transferencia, si no se presenta ninguna novedad, se puede integrar la yegua a su espacio habitual; dado el caso que la transferencia suceda de manera no quirúrgica, la yegua puede regresar de forma inmediata a la normalidad. Es de anotar que las yeguas requieren varias revisiones que deben suceder entre los quince y hasta los sesenta días posteriores a la transferencia embrionaria, este monitoreo debe retomarse en la época cercana a la fecha probable de parto.

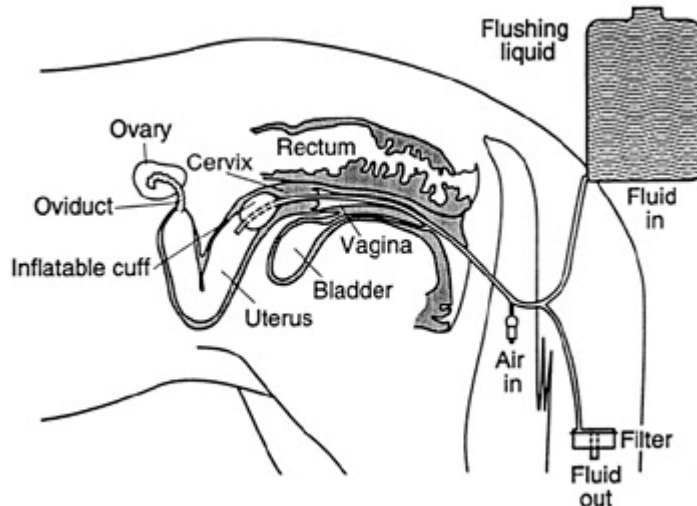
En otro documento revisado (Marenzi, 2015), expone que la recuperación del embrión debe darse entre los días 6 y 7 máximo 8, en atención a que, el embrión presenta un tamaño menor, lo cual es favorable para su preservación y para la aplicación de la técnica en la transferencia, reportándose así mayores cifras de éxito; hace énfasis en que un evento importante además del lavado y la desinfección de la zona genital y anal externa de la yegua donadora y de la yegua receptora, es el proceso de secado de la zona para evitar cualquier tipo de contaminación.

Otros elementos considerados sobre la transferencia embrionaria en equinos, fueron expuestos en el Manual of Equine Reproduction (Blanchard, y otros, 2011), estos indican que al revisar a la yegua donante debe buscarse en los ovarios la presencia de más de un cuerpo lúteo, lo cual favorece el desarrollo de múltiples embriones; en el proceso de recuperación del embrión, estos autores sugieren, usar un catéter fabricado en silicona, el cual debe presentar en la punta un balón, la longitud debe ser entre 80cm y 150cm; ahora bien, el balón debe contener entre 60cm³ y 80cm³ de, como lo expuso (McKinnon, 1999) agua, aire o solución salina estéril, e inmediatamente debe ser llevado hacia atrás de tal forma que quede pegado hacia el orificio cervical interno, con lo cual se sella el espacio entre el cuello uterino y el cuerpo, evitando con ello la pérdida de líquido; Blanchard y otros, establecen que el lavado debe realizarse hasta cuatro veces, y que la solución salina debe amortiguarse con fosfatos (puros o modificados), conocidos como DPBS, también debe tener el 1% de suero fetal o albumina de suero fetal bovino, esto evita que el embrión se adhiera a la silicona o al plástico usado en la recuperación; pero McKinnon expuso que este suero o la albumina suele hacer burbuja y por ello la búsqueda del embrión se hace difícil.

En cuanto a la composición del líquido para realizar el lavado de extracción del embrión, (Vanderwall D. , 2004) establece que además de lo ya expuesto debe incluirse penicilina a razón de 100 u/ml y también estreptomicina a razón de 100ug/ml; en cada descarga el útero puede llenarse con un máximo de dos litros,

para un total que no exceda los ocho litros; el cuidado radica en que el filtro de embriones no debe rebosarse ni secarse, una vez recuperado el embrión (ilustración 3) se requiere ubicarlo en mínimo “tres gotas de 1ml de DPBS con suero al 10%(v/v) esterilizado con un filtro de jeringa de 0,22 μ ” (Vanderwall D. , 2004); el diagrama del sistema de lavado para recuperar embriones uterinos se presenta en la figura 4.

Figura 4. Diagrama recuperación de embriones



Fuente: (Vanderwall & Woods, 2007, pág. 212)

Como ya se ha expuesto, debe recuperarse al menos el 90% del líquido usado para el lavado del embrión, de no ser así, (Blanchard, y otros, 2011) aconsejan el uso intravenoso de oxitocina de 20UI, con lo cual se favorece la salida de ese líquido retenido.

En el proceso de ubicación del embrión se tiene que los embriones viables suelen irse al fondo de la caja de Petri, y ser visibles fácilmente (ilustración 3); normalmente se usa en la recuperación pajillas con capacidad entre 0,25cm³ y 0,5cm³, que se unen a una jeringa, claro está que también, puede unirse a la jeringa una pipeta capilar de vidrio que tenga 25 μ l; una vez detectado el embrión es valorado según la escala de (Palma, 2008); aquí se hace necesario incluir la escala que califica al embrión según grados de calidad, de esta forma se hace previsible el desarrollo del embrión y el nacimiento a término, la escala de calidad se presenta en la tabla 1; como se observa en la tabla, el grado uno corresponde al embrión calificado como excelente esto porque su desarrollo equivale a ese día en el que se recolectó y valoró; más abajo se encuentra el grado dos, lo cual dice que el desarrollo del embrión es bueno, pero sus características morfológicas no son exactas a cómo debe verse, aun así es viable; por su parte en el grado tres el embrión es calificado con una calidad regular, debido a que se detectan algunos defectos; finalmente el grado cuatro, expone un embrión malo es decir no viable.

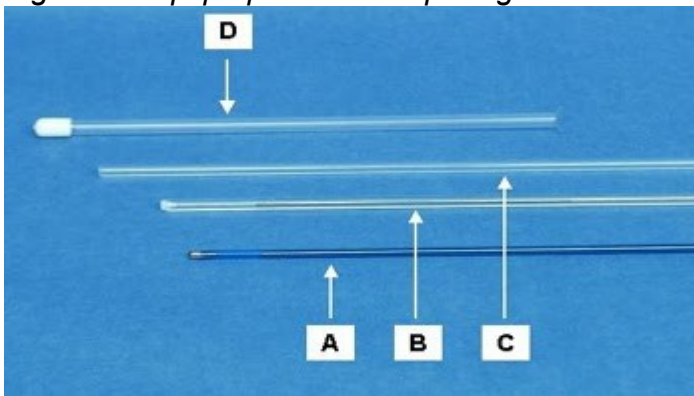
Tabla 1. Grados de calidad del embrión

Grado	Calificación	Descripción
G I	Excelente	Desarrollo correspondiente al día de recolección, no hay defectos visibles, se observan con claridad los blastómeros, color y estructura uniformes, se observa simetría, forma esferoide, zona pelúcida intacta
G II	Bueno	Presenta pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de detritus celulares, forma ligeramente irregular
G III	Regular	Se observan varios defectos: detritus celulares, forma irregular, color o muy oscuro o muy claro, y/o ligero agrietamiento en la zona pelúcida
GIV	Malo	Se observan muchos defectos: además de los expuestos en GIII, ruptura de la zona pelucida, desarrollo retardado, fuera de la forma asimétrica, tendencia a la desintegración: granulación/vacuolización de blastómeros; esta categoría denota la no transferencia

Fuente: Elaborado a partir de (Palma, 2008)

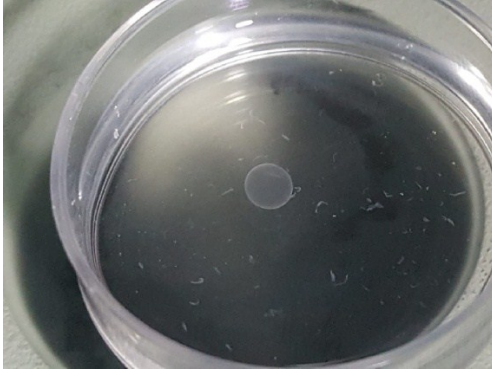
En cuanto el equipo necesario para la transferencia del embrión (Vanderwall D. , 2004), incluye además de la pipeta usada en los procesos de inseminación artificial, una pistola de inseminación, generalmente está hecha en un material plástico desechable, pero también la hay elaborada en acero inoxidable, lo cual la hace reutilizable, en la figura 5, se muestra uno de los equipos de transferencia de embriones usado en la técnica no quirúrgica, consta de: A: pistola de inseminación, B: pistola de inseminación de plástico (desechable), C: pipeta estándar de inseminación, D: protector exterior. Además, se usan lubricante, mangas, desinfectante y papel absorbente entre otros; se observa la recuperación en la ilustración 4 y la transferencia en la ilustración 5.

Figura 5. Equipo para TE no quirúrgica



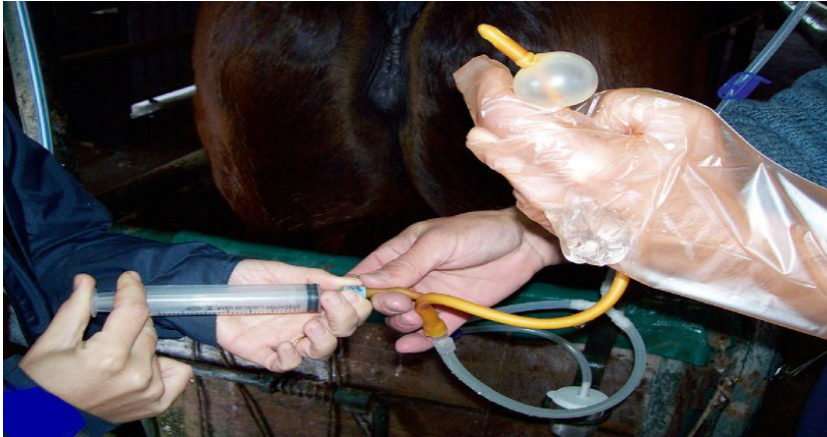
Fuente: (Vanderwall D. , 2004, pág. 17)

Ilustración 3. Embrión recuperado



Fuente: el autor

Ilustración 4. Recuperación del embrión (sonda Folley)



Fuente: (Riera, 2009, pág. 190)

Ilustración 5. Transferencia de embrión



Fuente: (Riera, 2009, pág. 192)

5.1.2 Elementos en la transferencia de embriones

De acuerdo a lo dicho, la transferencia de embriones requiere la disponibilidad de semen proveniente de caballos certificados, yeguas con reconocido valor genético y yeguas capaces de sacar adelante el embrión; así mismo se considera el contar con personas capacitadas en la técnica. En este sentido, los factores relevantes a ser considerados se presentan en los siguientes párrafos, en los cuales se contempla de manera particular la fertilidad del semental, la selección de las donantes y de las receptoras, aquí también se destaca la transferencia de embriones exitosa según la capacitación del profesional a cargo; igualmente se exponen datos investigados para lograr la sincronización entre las yeguas.

5.1.2.1 Fertilidad en el semental

La fertilidad en los caballos es un factor que incide de forma directa en los datos que se reportan con la tasa de recuperación de embriones, por ello resulta vital la calidad del semen a utilizarse (Torres, 2012), ahora bien, este producto no solo puede ser usado fresco, también está abierta la posibilidad de refrigerarse y dado el caso hasta congelarse.

El paso previo para selección del caballo debe partir de una valoración clínica general considerando la capacidad reproductiva, debe ser observada toda la apariencia física teniendo en cuenta la valoración de todos aquellos elementos que puedan ser determinantes en la herencia; por su parte la valoración detallada incluye los segmentos corporales implicados en la monta directa, y los necesarios para obtener el semen de óptima calidad; también se tiene en cuenta el estado de la libido, de igual forma requiere ser explorada como tal la capacidad de monta (Boeta, Díaz, & Hayen, 2011); así pues, un equino que se perfila como semental cuenta en su valoración clínica con los datos sobre el estado del aparato reproductor y por supuesto con la valoración completa del semen; cabe anotar que estos animales deben tener al día su ciclo de vacunas y mantener la desparasitación regular.

Un componente relevante a la hora de valorar la producción de semen es el tamaño testicular (Boeta, Díaz, & Hayen, 2011), esto debido a que el tamaño se relaciona directamente con la producción que se hace a diario de espermatozoides, ya que “depende del número de células producidas por gramo de tejido testicular”, es de anotar que este tamaño suele ser heredable.

Respecto de la colecta, suele implementarse el uso de la vagina artificial, por supuesto aplicando las indicaciones propias para tal fin, de tal forma que este

producto pueda ser transportado o conservado en frío para posteriores usos; y también permite la valoración del semen, esto incluye, entre otros ítems, establecer el volumen, el pH, la motilidad y cantidad de los espermatozoides, así como la coloración del líquido.

El uso dado al semen en el proceso de reproducción, como ya se mencionó anteriormente, puede suceder de forma inmediata una vez colectado, también puede refrigerarse a una temperatura entre los 5° y los 8°C previamente diluido mediante la aplicación de un extender (fuentes de energía, buffers, electrolitos, antibióticos, estabilizadores de membrana) (Maqueda, 2000); cabe anotar que de acuerdo al tiempo que se pretenda conservar el semen, los diluyentes pueden manejar una durabilidad corta, media o larga.

Es importante referir que, el semen refrigerado tiene un tiempo útil ubicado entre las 12 y las 36 horas poscolecta; por su parte el semen que ha sido congelado mediante la aplicación de criopreservación y por consiguiente guardado en nitrógeno líquido, puede ser usado hasta años después.

Cabe anotar que además de aumentar el volumen inseminante, la composición de los diluyentes debe ser tal que realicen la protección adecuada y por tanto aseguren la supervivencia de los espermatozoides, además los componentes deben suplantar el aporte metabólico, es el caso de la glucosa que funciona como fuente energética (Wernli, 2010); el shock térmico puede prevenirse con el uso de lipoproteínas, como las que se encuentran en el huevo o la leche; el diluyente también requiere incluir una “sustancia tampón” con el fin de impedir la lesión por tóxicos.

Aunado a lo anterior, la valoración en cuanto a la calidad del semen, es de suma importancia, tal como lo presentan los autores consultados, por ello deben verificarse: la cantidad de espermatozoides presentes en el volumen espermático, el número de espermatozoides vivos, la motilidad presente así como la normalidad morfológica (Wernli, 2010), este análisis también es básico para aplicar las técnicas de criopreservación.

5.1.2.2 Selección de la donante y la receptora

La selección de la yegua donante requiere de la revisión de varios aspectos, es así como la edad, el estado de salud, el historial reproductivo y su condición reproductiva al momento de la selección (Torres, 2012), juegan un papel importante; en el proceso se requiere verificar los signos de estro en las yeguas así como hacer un reconocimiento físico del aparato genital, en el que se observe la región vulvar, el vestíbulo vaginal y cervical, de encontrarse anomalías

puede pensarse en problemas que impiden la fertilidad (Boeta, Díaz, & Hayen, 2011); en esta elección es de considerar también el valor potencial del potro, por ello resulta racional el seleccionar “yeguas de cría probada o de genética superior” (McKinnon, 1999); así se justifica que al igual que en los caballos el examen de selección resulta ser primordial en el momento previo, con tal de responder adecuadamente a los requerimientos dentro de la transferencia de embriones.

Para el veterinario es importante tener claros ciertos conceptos que le permiten adentrarse en el tema con toda seguridad, uno de ellos es entender la acción de las hormonas en el desarrollo del ciclo estral de las yeguas, además debe recordar las implicaciones que se derivan del sistema metabólico, un ejemplo de ello es: para que se rompa la pared folicular por acción del líquido folicular, el cual es influenciado por el funcionamiento adecuado de la interacción de los sistemas metabólicos (Peña, 2019). Otro de los conceptos importantes es reconocer la influencia que ejerce el hipotálamo en el control hormonal, de tal forma que se explore el control que ese sector del cerebro ejerce sobre el sistema reproductivo (Andrade, y otros, 2011), tener presente estas conceptualizaciones apoya las decisiones del profesional en torno al uso debido de refuerzos hormonales para los procesos de sincronización entre yeguas, esto sin terminar afectando la salud hormonal y por ende corporal de estos animales.

Estas yeguas requieren una revisión transrectal uterina, lo cual junto a la valoración con ultrasonido permite establecer el estado reproductivo (Boeta, Díaz, & Hayen, 2011); esta técnica de palpación debe ser realizada por el especialista de forma precisa, con lo cual se obtiene información del cérvix, del útero y de los ovarios; una de las funciones es vigilar la etapa folicular, detectar la ovulación y así poder extraer el producto en el momento correcto, para realizar el proceso de monta directa o inseminación.

Cuando el proceso de reproducción sucede en campo, es decir de forma ambulatoria, el seguimiento que se lleva a cabo tanto en la donante como en la receptora puede ser muy demandante en la medida en la que se requiere realizar ecografías frecuentes para determinar los días hábiles de ovulación dentro del ciclo; es aquí donde el profesional puede optar por el uso de medicamentos que inducen el transcurso de ovulación eficientemente (Torres, 2012); esto es realizar manipulación al ciclo reproductivo, en donde se practica la sincronización del ritmo endógeno, en otras palabras, dar inicio al ciclo estral.

De acuerdo a lo anterior, la aplicación de elementos hormonales tiene variados fines, de una parte se encuentran los que poseen función análoga para obtener ovulación, por su parte los estrógenos ayudan en la “sincronización de estros” (Boeta, Díaz, & Hayen, 2011); los progestágenos, entre otras funciones, favorecer el mantenimiento del periodo gestacional; mientras la oxitocina promueve la

presencia de contracciones y es útil para realizar limpieza uterina; a su vez las prostaglandinas promueven el regreso natural del cuerpo lúteo morfológica y funcionalmente.

Respecto de la receptora, la valoración contempla el estado reproductivo, el estado de desparasitación, las condiciones nutricionales deben ser optimas, el estado de salud y por supuesto la edad; la preferencia se ubica en yeguas jóvenes que se encuentren entre los tres y los doce años aproximadamente y de preferencia que hayan tenido un parto; esto para minimizar la posibilidad de una pérdida del embrión; para que la transferencia suceda en forma adecuada, se requiere que el útero de esta receptora, se encuentre en condiciones similares desde el punto de vista hormonal a la donadora (Vizúete, 2016); en este caso la asincronía puede variar sin riesgo, si la ovulación de la receptora con respecto de la donadora sucede un día antes y hasta tres después de la donadora.

Así mismo se requiere tener en cuenta el tamaño/madurez (frame) de la receptora con respecto a la donadora, debido a que debe guardar cierta similitud, de esta forma se evita la afectación en el desarrollo fetal intrauterino y posnatalmente, con lo cual se puede obtener un desarrollo por encima o por debajo de lo deseado; así como evaluar el estado muscular y la salud dentaria, resulta importante considerar la función mamaria, (Marenzi, 2015) con lo cual se asegura la lactancia adecuada del potro; no menos valorada debe ser la docilidad de la yegua y el historial materno adecuado para atender al potro; además considerar las formas para evitar el estrés durante la gestación es primordial en la receptora, asegurando un potro de buen tamaño y excelente estado al nacer, igualmente la yegua receptora debe estar libre de procesos infecciosos que puedan incidir negativamente en la gestación tras la transferencia embrionaria.

Una vez realizada la transferencia embrionaria el chequeo, a través de ecografía, debe darse en el periodo aproximado de cinco a siete días, y luego hacia los treinta días debe repetirse la revisión (Vizúete, 2016), a esta altura ya debe obtenerse el latido cardiaco. Es de aclarar que en el proceso de sincronización se requiere un manejo tanto de la regulación endocrina como de la actividad folicular entre donante y receptora.

Ahora bien, un estudio que va más allá de la transferencia embrionaria a la receptora es el presentado por (Wilsher, Lefranc, & Allen, 2012), teniendo como base el hecho de que durante la transferencia el embrión es capaz de soportar un “amplio grado de asincronía negativa, en cambio la asincronía positiva mayor a dos días finaliza con muerte del embrión”, aun no queda claro si el suceso se da por “incapacidad del embrión para producir luteostasis” o porque el entorno uterino no es adecuado; este artículo muestra los resultados tras estudiar la supervivencia y el desarrollo sucedidos en el embrión “en un ambiente uterino avanzado”; para

realizar el seguimiento, el equipo genero dos situaciones, en la primera 13 embriones del día 7 fueron transferidos a receptoras con prolongación lútea, la asincronía entre donante y receptora se dio entre + 13 y + 49 días; en la segunda situación embriones del mismo día (7) transferidos a yeguas receptoras en los días de gestación: “18(n:2), 15(n:2), 14(n:4), 12(n:4) y 11(n:4); luego los embriones del día 8 se transfirieron a cuatro yeguas receptoras el día 11 de la gestación, las yeguas estaban preñadas; los resultados exponen que no hubo preñeces posteriores a la transferencia realizada a receptoras con asincronía entre + 13 y + 49 días; dentro del grupo de yeguas preñadas usadas como receptoras se dio un 25% de preñez gemelar, es decir 5 sobre el total de yeguas receptoras; cuatro de ellos fueron de la transferencia del embrión del día 8 a la yegua receptora del día 11; todos los embriones presentaron crecimiento retardado, de los cinco murieron cuatro, lo cual representa el 80%; como era de esperarse, la conclusión “enfatisa la importancia de un ambiente uterino apropiado para el crecimiento embrionario”, así mismo queda claro que “un embrión equino no sobrevivirá la transferencia a un útero mayor a dos días avanzado; “la asincronía entre el embrión y el útero puede explicar ciertos casos de muerte embrionaria”.

5.1.2.3 *Datos de la sincronización*

Un elemento que requiere bastante atención por parte del veterinario, es la sincronización, que debe darse entre yegua receptora y yegua donante, diferentes autores como (Vanderwall D. , 2004) revelan que el momento perfecto se logra cuando la receptora ovula entre un día antes y dos después de la donadora; o como refiere (Stout, 2006) que puede llegarse a tres días después de la ovulación de la donadora; en la mayoría de los casos si no es posible contar con un grupo apto de receptoras que se han sincronizado de forma natural, debe acudir al suministro de medicamentos que ayuden a llegar a ese estado.

Como existe variedad en las posibilidades respecto a la terapia hormonal, lo relevante radica en suministrar el medicamento seleccionado a la donante y 24 horas después a la receptora (Marenzi, 2015); es previsorio realizar la sincronización de la donante con dos receptoras, esto porque en caso de tener dos embriones se transfieren a cada una, o si por alguna razón falla una receptora esta la disponibilidad de la otra yegua, esto según lo expuesto por (Blanchard, Vaner, Love, & Brinsko, 2003).

Es propio decir que, en el proceso de sincronización pueden administrarse progestágenos, progesterona y estradiol, y otro tipo de terapias hormonales, dos de las formas de establecer la secuencia es como lo plantea (Marenzi, 2015), y se presenta en la tabla 2 y en la tabla 3.

Tabla 2. Sincronización con progestágenos

Donante		Receptora	
día 1	Inicia Altrenogest	día 2	Inicia Altrenogest
día 15	Finaliza Altrenogest	día 16	Finaliza Altrenogest
día 16	Inicia Prostaglandina	día 17	Inicia Prostaglandina
días 20 a 22	Comienza Estro y finaliza con ovulación	días 21 a 23	Comienza Estro y finaliza con ovulación

Fuente: Elaborado a partir de (Marenzi, 2015, pág. 16)

Tabla 3. Sincronización con prostaglandina

Donante		Receptora	
día 1	Prostaglandina	día 2	Prostaglandina
día 14	Prostaglandina	día 15	Prostaglandina
días 18 a 20	Comienza Estro y finaliza con ovulación	días 19 a 21	Comienza Estro y finaliza con ovulación

Fuente: Elaborado a partir de (Marenzi, 2015, pág. 17)

Un referente más reciente es el artículo presentado por (Oliveira, y otros, 2018), quienes estudiaron la “sincronización de yeguas receptoras de embriones cíclicos y acíclicos con yeguas donantes”; realizaron una comparación entre los apoyos hormonales utilizados en diferentes momentos del año: el anestro, transición de la primavera y las etapas del ciclo estral, evaluaron las características uterinas y registraron los datos de las preñeces posteriores a la transferencia embrionaria; la población de receptoras fue de 160, divididas en grupos así: el grupo de control se formó con las yeguas que presentaron ovulación espontánea; “G2: anestro, G3: transición de la primavera, G4: estro temprano, G5: estro, G6: diestro, G7: diestro temprano/1 dosis de dinoprost, G8: diestro temprano/2 dosis de dinoprost”; el proceso seguido fue: se inició el día cuarto suministrando dinoprost y estradiol-17 β a los G2 y G7”; el estradiol fue repetido en los días (3, -2, -1); ya en el día cero se aplicó “altrenogest de acción prolongada”; justo antes de las SE TE suministroo una dosis de altrenogest, después se realizaron las transferencias embrionarias a todas las receptoras, este procedimiento se realizó a partir del día +3 y hasta el día +8; seguido a lo anterior se realizó la evaluación uterina; los controles de gestación se realizaron en los días 7, 30, 60, y 120; se realizó aplicación de LA-P4 cada semana hasta llegar a los 120 días; en las valoraciones las yeguas de los grupos 1 a 6 y 8, presentaron edema a nivel del útero, con tasa de preñez menor o igual al 65%, es probable que al repetir la aplicación de dinoprost al grupo ocho se asegurara la luteólisis y así mismo una adecuada respuesta al estrógeno; concluyendo que el tratamiento de carga hormonal funciona adecuadamente en la sincronización de receptoras y donantes.

5.1.2.4 *El profesional en la transferencia de embriones*

El último elemento a ser considerado en la transferencia de embriones, pero no por ello el menos importante, es el médico veterinario encargado del proceso, por cuyo desempeño se espera “una tasa de recuperación” embrionaria ubicada entre el 50% y el 80% lo cual debe evidenciarse además, en el mismo resultado de preñeces (Torres, 2012); luego, depende de la capacitación y practica del profesional acercarse a estos valores de una forma eficiente, de ahí que se requiera un entrenamiento; el proceso puede ser optimizado al tener dos personas realizando las labores, de tal forma que se distribuyan las tareas que se relacionan hasta la obtención del embrión de la donadora y aquellas que llegan a la ejecución de la transferencia, en todo caso debe minimizarse todas esas prácticas que puedan generar contaminación y por ende perdidas embrionarias, por ello se entiende que las prácticas de esterilización deben además incluir el uso de materiales nuevos para cada vez que se realicen los procedimientos.

En manos del profesional capacitado esta la aplicación correcta de la biotecnologías aprovechadas en la reproducción, es así como la efectividad logra generar un impacto positivo en el sistema productivo alrededor de los equinos (Ángel & Bran, 2010), en la medida en la que se visualizan los caballos y las yeguas genéticamente apreciados, de ellos se derivan potros sucesores de la herencia, lo cual favorece el mantenimiento de las razas, el mejoramiento genético de la especie y por consiguiente el crecimiento económico de quienes son actores dentro de la cadena.

Uno de los campos en donde se requiere la investigación constante del veterinario, es el de la búsqueda de la superovulación, desde finales de la década de los 90' como lo expone (McCue, 1996), se requiere llegar a un estado en el que la superovulación en las yeguas donantes sea “exitosa, segura y disponible”, con lo cual el abastecimiento embrionario sería mucho más eficiente; pero en realidad el déficit también está marcado por la anatomía propia de la yegua, donde de una parte el área en la fosa de ovulación es muy limitada, y de otra parte el folículo preovulatorio tiene un gran tamaño; en síntesis las ovulaciones en las yeguas puede estar “fisiológicamente limitada por el tamaño de la cohorte folicular”, es posible mejorar la actividad con la aplicación de gonadotropinas.

Para hacer más efectivo el procedimiento, es el profesional quien busca obtener más de una ovulación por vez, con lo cual es posible conseguir más de un embrión viable a la hora de realizar la transferencia (Ángel & Bran, 2010); por ello es el profesional el que debe conocer y reconocer el ciclo estral de las yeguas (donante y receptora) buscando establecer la sincronización adecuada para obtener gran eficiencia reproductiva; por lo expuesto hasta aquí, se hace

comprensible que sea el profesional encargado de la TE quien realice el examen reproductivo completo a los animales implicados en el proceso, tal como lo expone desde décadas anteriores (McKinnon, 1999).

Así mismo resulta importante resaltar que, de la experticia del veterinario depende la valoración que se haga del embrión una vez recuperado de la donante; aunque existen varias escalas para este tipo de valoración, es la observación del profesional la que determina el punto de la escala que ocupa el embrión observado (Palma, 2008), por ende la previsión de su desarrollo.

5.2 Investigaciones en la Transferencia de Embriones en Equinos

Las investigaciones relacionadas sobre la transferencia de embriones se refieren a los inicios de su aplicación, así como también incluye aquellas exploraciones y revisiones documentales que permiten establecer sucesos dentro de línea del tiempo que se construye a partir de la década de los 70´.

En la década de los 70 se realizaron las primeras transferencias de embriones en equinos, una de ellas es la mencionada por (Ángel & Bran, 2010) al describir que en 1972 Alen y Rowson reportaron un procedimiento de TE exitoso; otra transferencia es la citada por (Losinno & Aguilar, Universidad Nacional de Río Cuarto - Facultad de Agronomía y Veterinaria - Depto. Producción Animal - Cátedra de producción equina, 2002) quienes exponen que en 1974 Oguri y Tsutsumi realizaron también el reporte de una TE triunfante; una década después algunos países como Argentina practicaron ensayos hasta obtener transferencias que llegaron a termino con potros saludables, esto primordialmente en yeguas de polo.

En la misma década de los 70, inicio en Colombia la aplicación de la técnica de transferencia de embriones, las incursiones se realizaron con conejos y en ganado bovino, así mismo y con excelentes resultados se implanto “un embrión equino en una mula” (Castaño, Múnera, Gómez, & Moncada, 2008), por lo cual la Universidad de Caldas se convirtió en la época en un referente; hubo un tiempo de adecuaciones y ya para las décadas de los 80´y los 90´la transferencia de embriones recobro importancia, y a la fecha es muy usada en las diferentes especies que se comercian.

De acuerdo a lo descrito por (Braun, 1994), en ese tiempo la transferencia de embriones en equinos, no era una técnica ni muy conocida ni muy usada en Alemania, expone como una ventaja la posibilidad de registrar los potros que son resultado de la aplicación de la técnica, la desventaja radica en la imposibilidad de lograr fácilmente superovulaciones en las yeguas; expone además, que es una

limitante el hecho de que los embriones puedan ser recuperados por un espacio de tiempo muy corto; así mismo que un gran avance radica en la “aspiración de ovocitos de manera transvaginal” debido a la guía que ofrece el uso de los ecógrafos; el autor establece que dentro de las perspectivas futuras, están las investigaciones que se iniciaron en esa época respecto a la “producción in vitro de embriones, la fertilización y el cultivo de embriones”, lo cual será fundamental en el crecimiento de la aplicación que la técnica pueda tener.

En su momento, el artículo de (Dowsett, Woodward, & Boderó, 1988) llamó la atención de la comunidad científica, puesto que se trató del reporte que mencionó éxito en recuperación embrionaria para transferencia no quirúrgica, en donde se realizaron 15 intentos de transferencia a yeguas receptoras, de los cuales 9, es decir, el 60% llegaron adecuadamente a término; aquí relatan que realizaron cinco intentos desde febrero hasta abril (1982), y solo uno fue exitoso, coincidentemente el registro de este demostró que tanto donante como receptora ovularon el mismo día; luego, ocho de los diez intentos realizados desde septiembre a diciembre, del mismo año, resultaron con potros vivos, en cuyos casos las sincronizaciones realizadas entre donantes y receptoras, variaron de 0 a 2 días; así mismo refieren que el uso de la pistola de Cassou es más fácil, comparada con la pipeta de inseminación artificial, aunque en últimas no incide en el resultado obtenido.

Un resumen de lo sucedido, en cuanto a la transferencia de embriones, fue presentado por (Squires, McCue, & Vanderwall, The Current Status of Equine Embryo Transfer, 1999), ellos comentan que el uso de la técnica de TE no quirúrgica, ha ido aumentando significativamente, aun así comentan que existen limitaciones técnicas y además se han descrito características biológicas únicas, lo cual limita el uso generalizado de la técnica en los caballos, aducen que por el contrario el crecimiento de la industria ganadera utilizando este tipo de técnicas reproductivas es exponencial; se han reportado varios factores que afectan la recuperación del embrión: el día de recuperación del embrión, el número de ovulaciones, la edad de la donante y por supuesto la calidad del semen; se han buscado ovulaciones múltiples usando extracto de pituitaria equina, ya que la hormona FSH de ovinos tanto como la porcina no ejercen ninguna influencia en la búsqueda de múltiples ovulaciones; además reportan que los factores que afectan las tasas de preñez después de la transferencia son la sincronización entre donante y receptora, la calidad del embrión y por supuesto el manejo que se le da a la receptora; así mismo estos investigadores resaltan la mejora significativa a la TE, que genera la capacidad de almacenar embriones a 5°C, y enviarlos a las estaciones centralizadas para poder realizar las transferencias a las receptoras, en ese momento solo funcionaba la congelación de embriones del día seis, que respondían bien al proceso de descongelamiento y se implantaban de forma adecuada, por ello reconocían que faltaba avance en este sentido; a pesar de las

fallas presentes en las técnicas de reproducción asistida resaltan los avances que permiten recolectar ovocitos equinos usando la punción transvaginal que es guiada por el uso del ultrasonido, y luego transferir los ovocitos a receptoras con la producción consecuente de preñeces, concluyen diciendo que la demanda frecuente de tecnología para las diferentes técnicas de reproducción asistida será la que conlleve mejoras significativas en el futuro.

En esos inicios, generalmente la técnica de transferencia de embriones se realizó en lugares donde se tenía la disponibilidad inmediata de los tres animales requeridos para el procedimiento; también se crearon centros de transferencia embrionaria, a ellos acudían las yeguas donadoras y receptoras; a finales de la década de los 80 se reconoció una forma de refrigerar los embriones, con tal suerte que, como lo presenta (Ángel & Bran, 2010), se generó el transporte de embriones, sobreviviendo fuera del útero hasta por 24 horas, este transporte redujo los costos del procedimiento y favoreció la implementación de la TE con una mayor cobertura.

Una de las preguntas más frecuentes en los círculos veterinarios que dedican parte de su quehacer profesional a la reproducción, es la que buscaron resolver (Aurich, König, & Budik, 2011) al “establecer los efectos de la recolección repetida de embriones sobre la tasa de recuperación de embriones en yeguas fértiles”, como es bien sabido los ciclos estrales de las yeguas donantes suelen ser muy aprovechados para extraer la mayor cantidad posible de embriones, con miras a obtener un buen número de potros; ello sin revisar los efectos de esas recolecciones frecuentes, por ejemplo en la tasa de recuperación embrionaria, o en la “influencia de la yegua de forma individual y la temporada en las tasas de recuperación embrionaria”; el proceso se realizó con una población de 9 yeguas, para un total de 153 recolecciones embrionarias durante un periodo de 30 meses; así pues reportaron una “tasa global de recuperaciones del 64%”; al realizar recolección sucesiva de embriones no hubo un aumento significativo, por el contrario reportan que tres de las donantes perdieron la capacidad de ovular transitoriamente por tres meses, las otras seis yeguas continuaron la producción de embriones

Como uno de los problemas reportados por los investigadores ya mencionados, fue la necesidad de buscar estrategias para buscar mayores ovulaciones en las yeguas donantes, el estudio realizado por (Raz, Green, Carley, & Card, 2011) trabajo en la foliculogénesis para establecer parámetros embrionarios y de la receptora después de haber realizado la transferencia, en la búsqueda de mejorar las tasas de preñez tras la aplicación de la hormona estimulante del folículo equino (eFSH), esto en yeguas donantes durante el ciclo; considerando que las ovulaciones múltiples pueden incidir positivamente en la eficiencia de la técnica de transferencia de embriones equinos, se realizó el estudio para determinar el efecto

de la (eFSH) sobre la tasa de éxito que puede obtenerse en un programa de TE, este proceso se llevó a cabo en la Universidad de Saskatchewan, en Canadá, el grupo de estudio se conformó de 12 yeguas donantes, 37 yeguas receptoras; las donantes se usaron dos ciclos estrales seguidos: (primer ciclo: control, segundo ciclo: aplicación de eFSH), en el ciclo de control con presencia de folículo en 35mm, se aplicó gonadotropina coriónica (hCG) buscando incidir en la ovulación, en el segundo ciclo al detectar el folículo de 25mm, se aplicó (eFSH) dos veces al día, hasta tener el folículo en 35mm momento en el que se aplicó (hCG); las donantes fueron inseminadas y después de ocho días de la ovulación, se obtuvieron los embriones para ser transferidos a yeguas receptoras previamente sincronizadas; los resultados reportaron que la aplicación de (eFSH) favoreció la presencia de mayor número de ovulaciones y por ende mayor número de embriones recuperados, pero estos embriones presentaron menor grado morfológico en comparación con los embriones de control, por consiguiente la tasa de preñez de las receptoras de acuerdo a los embriones transferidos fue menor a lo esperado.

De otra parte, para el año 2002 se aprobó el registro de potros que eran resultado de la TE, esto en la Asociación de Cuarto de Milla, en EEUU; esta autorización género que la técnica fuera usada con mayor amplitud, según (Marenzi, 2015) en la década de los 90', y con el fin de mantener y mejorar la genética de los caballos usados en el juego de polo, la técnica se popularizó en Argentina.

Ahora bien, en Brasil se realizó un estudio para determinar la influencia de la serorreactividad en la leptospira con las fallas reproductivas en las yeguas receptoras dentro de los programas de transferencia de embriones, la investigación realizada por (Pinna, Martinis, Souza, & Lilenbaun, 2013) inicio con una valoración serológica desde agosto hasta marzo de 2007, fue aplicada en cinco hatos ubicados en Rio de Janeiro, en los que los reportes mostraron altas tasas de insuficiencia reproductiva con presencia de muerte embrionaria, abortos y muertes perinatales; los estudios practicados a 338 yeguas en donde 226 con la prueba de aglutinación microscópica fueron serorreactivos especialmente a los serovares Bratislava y Copenhageni, con lo cual se abstraer que esta serorreactividad se asocia a problemáticas reproductivas, resultando que una yegua serorreactiva presenta mayor riesgo relativo de presentar problemas reproductivos (muerte embrionaria temprana, abortos y muerte perinatal) si se compara con una yegua seronegativa, en conclusión la serorreactividad en la leptospira se asocia con las fallas reproductivas en las yeguas receptoras dentro de los programas de transferencia de embriones.

En Colombia, el proceso de transferencia de embriones ha hecho uso de varios recursos dentro de las posibilidades que ofrece el resguardo de embriones; este es el reporte del primer caso descrito por (Martínez, y otros, 2014), quienes

realizaron una TE en equinos a partir del uso de un embrión vitrificado por criopreservación, obteniendo una gestación normal y como consecuencia un potro de raza criolla colombiana en perfecto estado; cabe destacar que en Colombia se pueden lograr todo el año debido a que no se tienen estaciones.

Aquí se destaca, un tema importante en la preservación de la genética equina el cual es reportado por (Jimenez & Castillo, 2014), en donde fue inseminada una yegua con semen que fue congelado, el cual provino del ordeño epididimal (caballo criollo colombiano, 5 años de edad), esta preñez fue confirmada mediante una ultrasonografía; la importancia de este proceso, además de ser el primer reporte de este tipo en el país, demuestra que es posible conservar el esperma de un caballo, que por alguna razón (no relacionada con el semen) entro en riesgo, haciendo viable el ordeño epididimal como una fuente para mantener la genética de calidad, que puede ser usada en procesos de transferencia de embriones.

En el mismo año, un estudio retrospectivo sobre los factores que afectan las ovulaciones múltiples, en el cual se tiene en cuenta la recuperación, la calidad y el diámetro de los embriones, esto dentro de un programa de transferencia de embriones, presentado por (Panzani, Rota, Marmorini, & Vannozzi, 2014), tomaron 198 yeguas donantes, con “diferentes razas, rango de edad y categoría reproductiva”; para la inseminación se usó “semen fresco, enfriado y congelado”, así como también se usó embriones congelados y enfriados, el proceso se realizó en centros especializados de transferencia y de inseminación artificial, esto por diez temporadas; se llegó a la conclusión que, de una parte la tasa de ovulación así como las ovulaciones múltiples se ven altamente entorpecidas por: edad, raza, categoría reproductiva; de otra parte la recuperación de embriones también se ve afectada por los mismos factores y además por “el tipo del semen, el número de ovulaciones y la ubicación de la inseminación artificial; todos los factores mencionados se presentan como influencia para el diámetro que presente el embrión a la hora de la recuperación; al contrario no se halló ninguna afectación por el proceso de lavado de embriones ni “sobre la distribución del a calidad del embrión”.

Con un propósito similar a la anterior investigación, (Marinone, y otros, 2015) estudiaron “el efecto de la edad de la yegua sobre la tasa de ovulación múltiple, la recuperación de embriones, la tasa de preñez posterior a la transferencia, el intervalo interovulatorio” esto en un programa comercial dedicado a la transferencia embrionaria en Argentina; organizaron tres grupos de donantes por edad así: G1: potras de 3 y 4 años; G2: yeguas de 5 a 10 años; G3: yeguas de 13 a 25 años; las variables revisadas fueron: ovulaciones múltiples y recuperación de embriones contra intervalos interovulatorios y tasas de preñez. Encontraron que en los grupos 1 y 2, sucedió más recuperación de embriones; los grupos 2 y 3 presentaron mayor probabilidad de presentar ovulaciones múltiples; la edad en la

tasa de preñez no arrojó un efecto significativo; los intervalos interovulatorios fueron influenciados por factores como la edad y el día de la rubefacción; en cuanto a la tasa de recuperación de embriones se observó influencia en los grupos 1 y 2, de la duración de los intervalos interovulatorios previos. Destacan que la tasa de preñez posterior a la transferencia no se vio afectada.

En la misma línea el artículo publicado por (Cuervo-Arango, y otros, 2015) relata los hallazgos en un estudio que buscó establecer “el efecto del intervalo desde la luteólisis inducida hasta la ovulación sobre la fertilidad de yeguas en dos granjas”, la población objeto fueron 215 yeguas en la G1 y 179 en la G2; los procedimientos en la granja 1 partieron de la inseminación con semen descongelado, esto se realizó durante 513 ciclos estrales, en 7 temporadas reproductivas seguidas, se buscó el estro con la aplicación de “análogos de $\text{PGF2}\alpha$ por 179 ciclos. En la segunda granja a 65 yeguas donantes se les realizaron 375 lavados de embrión, estas fueron “inseminadas con semen fresco”, 327 lavados fueron posteriores a “la inseminación artificial después de inducir la luteólisis inducida con PGF”; en las dos granjas se establecieron “intervalos de tratamiento con PGF: menos de 6 días, 6 a 8 días y más de 8 días”; llegaron a la conclusión de que los intervalos de ovulación afectaron las tasas de preñez y las de recuperación de embriones; “la fertilidad se redujo en la medida en la que los intervalos se hacían más cortos.

Sin duda la vitrificación de los embriones, en equinos, es un instrumento que favorece no solo la conservación de las especies, sino que además, permite el desarrollo genético que tiende a optimizar lo deseado dentro de la comercialización existente; (Vizúete, 2016); por ello dentro de los adelantos recientes se encuentra el enfriamiento de los embriones para ser transportados, aplicando la técnica expuesta por (Carnevale, Squires, & McKinnon, 1987), en donde se usan, entre otros componentes como suero de ternero fetal, penicilina y estreptomocina, los nutrientes Ham's F-10 para retener y también para enfriar.

En época reciente (Dijkstra, Cuervo-Arango, Stout, & Claes, 2019) realizaron una investigación sobre: “preñeces múltiples monocigóticas después de la transferencia de embriones equinos producidos *in vitro*”; buscaban establecer si a pesar de ser poco común este tipo de preñez en caballos podría ser más frecuente tras la transferencia del embrión producido *in vitro*; trabajaron con 496 blastocistos producidos *in vitro* “frescos *in vivo*” y con 410 que estaban congelados y fueron descongelados, producidos “por inyección intracitoplasmática de espermatozoides, de maduración *in vitro* con ovocitos de yeguas Warmblood” (raza antigua de sangre tibia); estos embriones se transfirieron a receptoras y se realizó el registro de cualquier preñez múltiple sucedido; con lo cual se obtuvo: posterior a la transferencia del embrión se calculó la probabilidad de preñez de un único embrión obteniendo que de 410 (descongelados) sucedió en 254 lo que representa el 62% de los embriones y de los 496 (*in vivo*) se presentó en 413 lo

cual denota un 83%; en ellos la incidencia de preñez múltiple solo fue del 1.6% es decir 4 de los 254 (descongelados) y cero para el grupo (in vivo); ahora bien, solo fue detectada una vesícula embrionaria en las valoraciones realizadas antes del desarrollo adecuado del embrión, la detección de múltiples cuerpos embrionarios sucedió después en la búsqueda del latido cardiaco y en la verificación del embrión como tal, también fueron detectados ante el aborto de la yegua, fue el caso de dos preñeces gemelares en los que las yeguas presentaron abortos espontáneos una a los tres meses de gestación y la otra a los nueve meses; el caso restante fue confirmado como perdida al día 50 de gestación. A pesar de ser un resultado pobre para ser extrapolado, surge la inquietud en torno a la posible intervención a partir de las crecientes técnicas de reproducción asistida en torno al fomento de preñeces gemelares en yeguas por transferencia embrionaria.

Continuando la temática in vitro, (Cuervo-Arango, Claes, & Stout, 2019) abordaron el tema de los embriones equinos producidos in vitro “como una ventana muy estrecha de sincronía uterina de la yegua receptora aceptable en comparación con los embriones derivados in vivo”. Desde hace un tiempo también se ofrece el servicio de sexado de semen equino, esto por si el propietario de la donadora desea que se le realice un embrión macho o hembra.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este capítulo se compone de dos elementos fundamentales, de una parte se presentan aquellos factores hallados en la documentación revisada, que a juicio del autor representan posibles impedimentos para la eficiencia en la aplicación de la técnica de transferencia de embriones, estos impedimentos se describen como puntos críticos; de otra parte se presenta una propuesta sugerida para obtener mayor eficiencia en la aplicación de la técnica de TE, este aparte se denomina: Secuencia de actividades para la TE en campo, se construye tomando de los documentos revisados en el estado del arte, aquellos factores que pueden ser usados en el proceso llevado a cabo en campo, lo cual favorecería el porcentaje de éxito en la obtención de embriones que lleguen a término, debido a que las condiciones varían notablemente entre la aplicación de la TE en campo contra un lugar especializado llámese clínica de reproducción, esta variación es mayor si se tiene a cada uno de los animales de forma dispersa (criaderos diferentes, ciudades distantes).

En definitiva una de las nuevas realidades que favorecen la aplicación de técnicas reproductivas como la TE, está en la eventualidad de aplicar la técnica de criopreservación de embriones (Marenzi, 2015); para lo cual se puede acceder a uno de los dos métodos: congelamiento o vitrificación; en el congelamiento se emplean concentraciones bajas de crioprotectores, con la aplicación de niveles vigilados de enfriamiento, con lo cual se deshidratan las células de tal forma que no se lleguen a cristalizar; por su parte la vitrificación sucede de forma rápida, debido a que por un corto tiempo se realiza una incubación en la que se aplican altas concentraciones de crioprotectores antes de sumergir el embrión en nitrógeno líquido.

En este sentido (Hochi S. , 2003) expone que, estudiando la sensibilidad de los embriones equinos preimplantatorios y a los ovocitos foliculares, ante la criopreservación se encontró que la supervivencia de los blastocistos tras haber sido congelados en dos pasos, usando glicerol como agente criopreservador, se vio influenciada por el desarrollo que presentó la capsula embrionaria; entendió que el uso del etilenglicol con sacarosa usados como medio de crioprotección mejoro de forma muy notoria la supervivencia de los blastocistos una vez realizo el proceso de descongelación, con lo cual la transferencia embrionaria a las yeguas receptoras se realizó sin eliminar los crioprotectores; además de esto, logro concluir que de tener blastocistos criopreservados a través de la vitrificación, se podrán desarrollar ya sea in vitro o in vivo siempre y cuando los embriones sean expuestos a la solución de vitrificación de forma escalonada.

En cuanto a la vitrificación, se puede decir que es una forma de criopreservación de embriones, competitiva debido a que por un lado no promueve la formación de cristales, lo que puede dañar severamente al embrión; también es favorable debido a que no registra alteraciones en el embrión (Acosta, 2019), ni por su consumo de glucosa ni por el del piruvato.

En suma, se tiene que para el éxito del programa de congelamiento de embriones, se requiere tener en cuenta además del tamaño, el estadio del desarrollo en el que se encuentra dicho embrión; por ello resulta importante considerar aspectos como los que envuelven la sincronización y las formas más útiles para buscar superovulaciones (Martín & Mongue, 2012), con el fin de no subutilizar las acciones que favorece la TE.

En este punto cabe destacar el estudio presentado por (Porrás, Castro, & Abril, 2007) en el que seleccionaron cuatro grupos de yeguas de similares características para establecer el mejor mecanismo inductor de superovulaciones, esto en la raza criolla colombiana; el grupo uno, denominado de control recibió 5cc de suero fisiológico IM, 2 veces al día; el grupo dos, se le aplicó IM 6,25mg de extracto pituitario de origen porcino (Foltropin – v), 2 veces al día; el tercer grupo recibió IM de EHE (extracto de hipófisis equina) a razón de 8,3mg, 2 veces al día; el cuarto grupo también vía IM recibió una dosis más alta de EHE 12,5mg, 2 veces al día; el tratamiento aplicado a los siete días después de la ovulación y mantenido por entre 7 y 10 días; demostró que la observación de mayor crecimiento folicular ($\geq 35\text{mm}$), sucedió con la aplicación de los 12,5mg aplicados de EHE y que además inducen varias ovulaciones, lo cual resulta aplicable a los programas de transferencia embrionaria, aun así, también exponen que no se obtiene un número de embriones que se corresponda con la cantidad de yeguas tratadas.

De otra parte, un elemento para tener en cuenta, es el contar con semen homogéneo que presente una “concentración espermática constante”, para lo cual se requiere mantener agotada la reserva espermática extragonadal, así pues, debe proveerse al semental de montas y colectas frecuentes (Wernli, 2010). Por lo descrito a continuación se presenta en resumen los puntos críticos en la aplicación de la técnica de la transferencia de embriones y se exponen algunos hallazgos fruto de investigaciones realizadas a lo largo de las dos últimas décadas, que pueden favorecer los resultados finales.

6.1 Puntos Críticos del Proceso Relacionado con la TE

Un punto crítico que ha sido reportado a lo largo de la revisión realizada, se relaciona con que el progreso genético en equinos no es comparable con el

logrado en el ganado; esto porque no se ha desarrollado un método efectivo para obtener un gran número de ovulaciones en las yeguas donantes, con lo cual de ellas se llega a obtener un máximo de 8 preñeces por temporada; otros de los factores incidentes es, de una parte la no utilización de semen congelado, y de otra el llegar a un buen nivel en el tema de la recuperación de embriones por ciclo; además en campo suele verse la paradoja de tener buenas yeguas donantes, pero muy difícilmente se consiguen yeguas receptoras aptas; o por el contrario se tienen receptoras pero no se tiene fácilmente el acceso a sementales genéticamente superiores.

Así mismo, desde el reporte de (McKinnon, 1999), aún el procedimiento es considerado como costoso, el veterinario generalmente emplea demasiado tiempo desde el proceso de selección de las yeguas, su sincronización hasta la obtención del potro, esto contando con aquellos embriones que se reabsorben, o los fetos que se mueren por una u otra razón.

Si bien es cierto que la técnica tiende no solo a mejorar, sino que además llega a más lugares, goza de imperfecciones, una de ellas es la ausencia de receptoras adecuadas a la contextura de los donantes (yegua y caballo), suele hallarse yeguas receptoras de menores calidades, lo cual afecta el desarrollo del feto y el proceso natal y posnatal (Marenzi, 2015).

Otros puntos débiles en la TE, pueden ser de una parte la calidad del embrión cuando se encuentra calificado por debajo de G II, de otra parte la aplicación correcta de la técnica, la cual cuenta con numerosos pasos todos importantes, así que se puede terminar reportando transferencias de embriones fallidas y cuando menos, yeguas infectadas por contaminación bacteriana, por procedimientos, que desde el punto de vista aséptico, han sido equivocados; aquí también cuentan los desórdenes hormonales causados a las yeguas en los intentos de sincronización, o en el uso incorrecto de antibióticos que suelen acompañar el final de la transferencia (Marenzi, 2015).

Cabe mencionar en este momento, un reporte de caso realizado por (Ruiz, Perez, Espinosa, Valencia, & Jaramillo, 2018), en el que exponen la “placentitis bacteriana como causa de aborto en yeguas”, en el documento comentan que el aborto de la yegua sucedió a los nueve meses de la edad gestacional; uno de los hallazgos fueron los cocobacilos Gram negativos, se encontraban en adherencia a las vellosidades corioalantóicas y en el material de características proteicas; dentro de las conclusiones sugieren que en los programas de reproducción equina se tenga en cuenta la valoración de la estructura de la placenta y también las “condiciones fetales en las gestaciones tardías”, evaluación que siempre debe realizarse en los casos en los que al parecer hay la presencia de signos como:

“flujo vaginal, lactancia prematura, excesiva distensión de la cavidad abdominal y partos distócicos anteriores.

Desde el punto de vista estadístico, los datos muestran una gran diferencia entre el número de yeguas donadoras que reportan un embrión y el número de embriones recuperados, esto contra el número de embriones implantados que se encuentran para los días 14 a 21, y el mismo referente, pero entre los 45 y los 60 días, lo cual se ejemplifica en la tabla 4, y suele suceder en la práctica conservando distancia considerable entre los embriones recuperados y los potros nacidos vivos.

Tabla 4. Transferencia de embriones en equinos

Período	No. de Lavados	No. y % de embriones recuperados	No. y % de gestaciones día 14 a 21	No. y % de gestaciones día 45 a 60
1990 -91	120	73 (59.8)	13 (17.8)	11 (15.1)
1991-92	207	166 (80.1)	72 (43.4)	56 (33.7)
1992-93	258	170 (75.1)	75 (44.0)	38 (38.0)
1993-94	283	233 (82.3)	132 (56.6)	122 (52.4)
1994-95	173	160 (92.4)	99 (61.1)	90 (56.2)
1995-96	794	156 (80.4)	103 (66.0)	94 (60.0)
1996-97	61	44 (72.0)	22 (50.0)	20 (45.4)
1997-98	236	163 (69.0)	91 (55.8)	74 (45.3)
Primavera	282	71 (25.2)	51 (71.8)	-
1998	-	-	-	-
Total	1616	1236 (76.4)	685 (53.2)	505 (45.4)

Fuente: (Samper, 2008)

Un factor relevante siempre será el hecho de tener a disposición yeguas jóvenes de fertilidad comprobada a disposición para funcionar como receptoras (Castaño, Múnera, Gómez, & Moncada, 2008), de igual forma las donadoras deben ser muy bien manejadas y portar excelente calidad genética y salud reproductiva.

Otro elemento que puede incidir en la cantidad de embriones que lleguen a término, es la producción de embriones in vitro, para luego ser transferidos a yeguas receptoras, en este sentido (Hinrichs, 2010), los ovocitos pueden extraerse

de ovarios que han sido extirpados después de la muerte de una yegua donadora, también puede venir de folículos que aún no son maduros o que están en fase preovulatoria; de los procesos in vitro se tiene que, la maduración de ovocitos genera normalmente un 60% de ovocitos en estado de madurez, así pues la fertilización se realiza regularmente con una inyección intracitoplasmática con carga de espermatozoides; este cultivo de embriones necesita que el medio presente glucosa en alto porcentaje, esto es básico para el desarrollo apropiado de los blastocistos. De esta forma las tasas de preñeces producto de la transferencia de estos embriones asumen porcentajes muy similares a la forma tradicional de transferir embriones.

En suma, puede establecerse que los puntos críticos dentro del proceso de TE, giran alrededor de factores como el número de ovulaciones, calidad y transporte del semen, la recuperación de embriones por ciclo, receptoras adecuadas, calidad del embrión, estado de salud hormonal de las yeguas implicadas, número de embriones recuperados frente al número de embriones que llegan a término, aplicación adecuada de la técnica y los costos del proceso; ahora bien, manteniendo la relación establecida en los momentos (antes, durante y después) de aplicación de la técnica, se incluye una revisión más detallada en algunos de los elementos que hacen parte de la transferencia embrionaria (donante, receptora y aplicación de la técnica), junto con intervenciones que pueden ayudar a superar los momentos críticos.

6.1.1 Puntos críticos y avances en la donante

Un aporte interesante es el realizado por (Campbell, 2014), en su artículo de revisión denominado: Transferencia de embriones en caballos de competición: manejo de yeguas y expectativas, aquí el autor expone que, factores como: calor, ejercicio, lavado de embriones a repetición, manipulación del ciclo reproductivo con aplicación de hormonas pueden causar un impacto negativo sobre la fecundidad de las yeguas donantes; el artículo presenta una revisión de casos reportados en los que estos factores han sido comentados junto a la no recuperación de embriones en yeguas jóvenes que participan en competencias y que no refieren algún tipo de anomalía reproductiva; lo cual induce a plantear la necesidad de suspender el ejercicio en el periodo periovulatorio y también en el periodo que existe entre la ovulación y el enrojecimiento del embrión, en algunos casos se requerirá además el tratamiento de la endometritis a la que se llega por el sofoco y por supuesto incluir la mínima manipulación del ciclo reproductivo con la aplicación de hormonas; si será posible mejorar las tasas e recuperación de embriones que ha descendido sin causa aparente.

La inducción que se realiza para obtener una ovulación, representa un momento crítico en la medida en la que debe seleccionarse un inductor apropiado para, en lo posible lograr una ovulación múltiple, lo cual lleva a mejorar la tasa de recuperación embrionaria; la consideración del intervalo tratamiento ovulación (ITO), es decir el tiempo transcurrido entre la aplicación de inductores y la ovulación como tal, genera un efecto que se traduce en la mayor o menor recuperación embrionaria, entonces si ese intervalo de tiempo es mayor o igual a seis días, más fácilmente se obtiene la recuperación embrionaria que se espera (Losinno & Pietrani, 2018); por lo cual resulta razonable esperar hasta que el folículo regrese a su estado o a que la donante se encuentre en nueva etapa de celo de forma natural, lo cual termina representando un mayor bienestar para la yegua desde el punto de vista hormonal, un ahorro en materiales y tiempo para el veterinario y probablemente el mismo número de embriones.

Respecto a lo anterior, se encontró el reporte realizado por (Pietrani, Losinno, & Cuervo, 2019) quienes presentan el “efecto del intervalo desde el tratamiento con prostaglandina F2 alfa hasta la ovulación en las tasas de eficiencia reproductiva en un programa equino comercial de transferencia de embriones”, la población estuvo formada por 180 yeguas de polo argentino, catalogadas como donantes, los datos resultantes parten de 2.228 ciclos examinados; en el proceso emplearon semen fresco proveniente de 31 caballos; los lavados embrionarios sucedieron entre los 7 y 8 días a partir de la ovulación; una vez realizado el lavado se le suministro a las donantes el análogo de prostaglandina F2 alfa es decir cloprostenol/250mg; en los resultados reportan que la tasa de recuperación embrionaria aumento así como el intervalo del análogo de prostaglandina F2 alfa; se presentó la tasa de recuperación embrionaria más baja en la yeguas con el intervalo menor a cuatro días (30.7%), y la más alta para donantes con un intervalo de diez días (78.3%); el número de la tasa de embriones por lavado y de ovulación múltiple fue aumentando de forma gradual así como el intervalo del análogo de prostaglandina F2 alfa; lo cual les permitió concluir que dicho intervalo se relaciona de forma directa y positiva con la recuperación de los embriones y las ovulaciones múltiples.

Siguiendo la misma línea (Roser, y otros, 2019) investigaron sobre las “tasas de superovulación, recuperación embrionaria y preñez estacionalmente en yeguas donantes anovulatorias tratadas con FSH equina recombinante (reFSH)”; buscando establecer la efectividad de este tipo de tratamientos con FSH equina recombinante, trabajaron con 40 yeguas donantes, con folículos menores a los 10mm de diámetro y sin presencia con anestro profundo, las ubicaron en cuatro grupos para realizar cuatro diferentes aplicaciones así: G1: 0.65mg de reFSH, dos veces/día, IM; G2: 1.3mg de reFSH, una vez/día, IM; G3: 0.32mg de reFSH, dos veces/día, IM; G4: solución salina, una vez/día, IM (grupo control). Las

aplicaciones se realizaron hasta obtener un folículo de 35mm o hasta completar diez días de tratamiento; al obtener el folículo mayor o igual a 35mm, a aplicación de hCG se le dejó de hacer y 36 horas más tarde fueron inyectados 2500UI de hCG IV; las donadoras que recibieron hCG se inseminaron “con semen fresco cada 48 horas hasta la ovulación”; ocho días después de la ovulación se realizó la recuperación de los embriones y fueron transferidos a receptoras anovulatorias que fueron tratadas con estrógeno/progesterona; las preñeces se diagnosticaron a través de ecografía a los siete, los catorce y los veintinueve días. Así las cosas, todas las yeguas a las que se les aplicó reFSH respondieron al tratamiento presentando crecimiento folicular mayor a 35mm en un promedio de 6.5 días; esto se presentó en el 80% de las yeguas de G1 y G2; también en el 50% de las yeguas ubicadas en G3 y como era de esperarse ninguna en el grupo de control. Concluyeron que en el grupo total de las yeguas ovuladas no se encontró diferencia ni en el número de ovulaciones, ni en el número de embriones recuperados; además el promedio de recuperación de embriones por yegua ovulada correspondió a una tasa del 88%, “la tasa promedio de recuperación de embriones por ovulación fue de 43%”, y una tasa de preñez del 59%; es decir que “el tratamiento con reFSH durante el anestro profundo favorece el desarrollo folicular”; también que una aplicación al día de reFSH resulta eficaz para obtener el “desarrollo, la ovulación de ovocitos fértiles y la producción de embriones”, lo cual se tradujo en preñeces viables después de realizada la transferencia embrionaria.

La recuperación de embriones se ha representado a lo largo de las revisiones realizadas con una gran variabilidad porcentual, debido en parte a todos los factores que inciden y que han sido ampliamente revisados, tal es el caso de la calidad del semen, la edad y estado general y reproductivo de la yegua, la técnica empleada en el lavado de recuperación (Losinno & Pietrani, 2018); aquí se destaca que la mayor cantidad de embriones normales se obtienen de yeguas normales y no tan añosas.

Ahora bien, para realizar un registro lo aconsejable es tener el número de embriones recuperados por ciclo; otra forma es el número de embriones recuperados por ovulación, lo cual genera las tasas que permiten mantener un registro y con ello verificar la efectividad y la eficiencia de los procesos inmersos en la TE.

El lavado uterino con miras a la recuperación de embriones también presenta puntos críticos, en la revisión realizada se encontró que los intentos de recuperación en el día sexto, no son tan fructíferos como si sucede entre los días siete a ocho y máximo nueve; de acuerdo a lo expuesto por (Losinno & Pietrani, 2018), en el caso de las yeguas añosas, puede suceder que use más tiempo en el tránsito tubárico y que además el crecimiento embrionario sea menor, por lo cual se acepta un lavado entre los días nueve y diez.

Variados reportes exponen el lavado de recuperación embrionaria, no solo una vez con un litro, sino una secuencia de lavados filtrados hasta llegar a cuatro litros; se sabe que un porcentaje cercano al 70% habla de la recuperación con el primer litro, ahora bien si el lavaje ha llegado a más litros sin lograr la recuperación del embrión y los demás factores son buenos (calidad del semen, calidad de la donante, etc.), se recomienda realizar un lavado uterino usando “20 UI de oxitocina IV” (Losinno & Pietrani, 2018).

6.1.2 Puntos críticos y avances en la receptora

Se ha visto a través de las referencias consultadas que muy pocos criaderos equinos suelen fijar su atención en una buena reserva de yeguas receptoras; por lo general el servicio de receptoras es prestado en otras instancias, en términos económicos las yeguas receptoras que no están cargadas, representan un costo de mantenimiento; es probable que al realzar el valor de las receptoras también cambie la tasa de preñeces que llegan a término; estas yeguas requieren una atención especial que a la larga representara mayor beneficio.

Un estudio realizado por (Martínez M. , 2016) busco evaluar cualitativa y cuantitativamente las perdidas gestaciones de yeguas, para lo cual considero los factores propios de la etapa; dentro del trabajo se denominaron potrancas a las yeguas entre 3 y 4 años, jóvenes a las yeguas entre los 5 y los 9 años, medianas con 10 a 15 años y viejas a las de 16 y más años; como factor intrínseco se determinó que la mayor edad (≥ 16), influye disminuyendo la capacidad fértil así mismo se encontró que en las yeguas mayores se observaron los mayores casos en cuanto perdida de embriones; de los 5 a cercanos los 15 años se reportó la mayor posibilidad de gestar y parir sin problemas; y finalmente el reporte muestra que la muerte temprana de los embriones se sucede con mayor frecuencia en las potrancas (3 a 4) y en las más añosas (≥ 16).

Definitivamente, la edad de la receptora debe estar entre los 3 y los 12 años máximo, además de los reportes de salud con normalidad en todos los aspectos, la yegua no debe presentar obesidad; de forma especial (Losinno & Pietrani, 2018) recomiendan realizar una biopsia endometrial, en donde el grado 1 o 2 A sean considerados como aceptables para ser receptoras; es preciso hacer un paréntesis en este punto para exponer la relación del resultado de la biopsia endometrial con la muerte embrionaria temprana; de acuerdo al estudio realizado por (Kenney R. M., 1978), en el que analizo los “cambios cíclicos y patológicos del endometrio de la yegua, detectados por biopsia”, encontrado que estos cambios podían categorizarse en cuatro grados, tal como se presenta en la tabla 6.

Con la categorización presentada en la tabla 6, (Kenney & Doing, 1986), elaboraron una tabla en la que se expone el porcentaje que puede esperarse de parto según esa categorización endometrial; lo cual se presenta en la tabla 5.

Este porcentaje permite al veterinario decidir la forma de proceder para que la receptora cumpla la función asignada, con lo cual se genera una posibilidad ante la espera de una gestación en evolución normal, esto induce la predicción de un parto en condiciones de normalidad. Al utilizar esta información adecuadamente se reduce de manera significativa la tasa que reporta la pérdida embrionaria en las receptoras, con lo cual se reducen, también los costos del procedimiento.

Tabla 5. Porcentaje esperado de parto según la categorización endometrial

Grado	Daño	% Parto esperado
I	Ausente	90-80
II A	Leve	80-50
II B	Moderado	50-10
III	Severo	<10

Fuente: (Kenney & Doing, 1986)

Aunado a lo anterior, el artículo publicado por (Cuervo-Arango J. , Claes, Ruijter-Villani, & Stout, 2018), expone que “la probabilidad de preñez después de la transferencia de embriones se reduce en yeguas receptoras con un estro anterior corto”; con una población de 350 embriones que fueron recuperados e 161 donadoras y que se transfirieron a 231 receptoras; aquí para lograr establecer el efecto sobre la gestación y la pérdida temprana de embriones, las variables analizadas fueron: “año de transferencia, temporada de transferencia, edad de la receptora y la donante, operador que realiza la transferencia, embrión (único o gemelo), tamaño del embrión, numero de transferencias/receptora, aplicación de d-cloprostenol, HCG en la receptora, día de ovulación de la receptora para la TE, numero de cuerpos lúteos, y duración del estro en la receptora. Después de los análisis pertinentes concluyeron que: “la probabilidad de preñez en las receptoras se correlaciona de forma positiva con la duración del edema endometrial durante el estro anterior a la transferencia embrionaria”; por ello afirman que la carga de estrógenos bien realizada en el estro incide en “la receptividad del útero y la supervivencia del embrión”.

Un factor importante a tener en cuenta, se refiere a la progesterona (P4), esta hormona se origina en los ovarios y en el cuerpo lúteo; la concentración de progesterona suele variar pero normalmente se concentra en niveles superiores a 4ng/ml; estos valores se tienen como apropiados para mantener el proceso gestacional en la receptora (Cortés, y otros, 2018); en todo caso, tanto la verificación como el seguimiento que se haga al estado gestacional debe contar

con el uso del ultrasonido, establecer el latido del corazón, y registrar no solo el crecimiento también la ubicación embrionaria al interior de la vesícula; autores como (Paredes, Jiménez, & Hernández, 2012), describen que la medición en plasma de progesterona no es importante en el seguimiento a la gestación por cuanto no se obtiene una variación significativa, por el contrario tiende a mantenerse constante “sin variaciones posteriores al día 40 de la gestación”.

Tabla 6. Categorización endometrial

Grado	Daño	Descripción
G I	Ausente	Sin signos de hipoplasia, no hay atrofia, no hay evidencia de cambios patológicos (fibrosis o inflamación), endometrio sano (pueden presentarse cambios difusos no relevantes)
G II A	Leve	Cambios histopatológicos con infiltración inflamatoria difusa ligera a moderada en el estrato compacto, pueden existir focos dispersos en el epitelio luminal, el estrato compacto, y en el esponjoso; compromiso disperso de las ramas glandulares individuales con cierto grado de severidad (1 a 3 capas) o un máximo de dos nidos fibróticos por cada cuatro campos ópticos. Las lagunas linfáticas deben ser detectadas a la palpación, pero si producto de un tratamiento desaparecen, el endometrio regresa a categoría grado I; la atrofia parcial del endometrio previo a la estación reproductiva es otro criterio de esta categoría. Yeguas que han estado secas por dos o más años y presentan este cambio se considerará categoría IIB. Los hallazgos inflamatorios, fibróticos, atrofia o cambios glandulares importantes son aditivos, por ello de presentarse más de uno juntos, se agrupara en la categoría siguiente.
G II B	Moderado	Los cambios inflamatorios son focos diseminados, difusos o moderadamente severos ubicados en el epitelio luminal, el estrato compacto y esponjoso. Las modificaciones fibroticas son más severas y extensas que en la categoría anterior, la fibrosis incluye ramas individuales de forma diseminada y uniforme, usualmente 4 a 10 capas, con la existencia de un nido por campo óptico lineal, en cuatro o más campos. Además, una dilatación glandular quística y atrofia insemínada, pero no uniforme, caracterizan también esta categoría. Los hallazgos también son aditivos, por ello uno o más cambios en conjunto caracterizan la siguiente categoría.
G III	Severo	Una inflamación diseminada, difusa y severa que compromete al estrato compacto, esponjoso, de ubicación periglandular y perivascular, caracteriza el endometrio de esta categoría. Fibrosis de las ramas glandulares, uniformemente diseminada, con más de diez capas, con cinco o más nidos por campo óptico lineal y lagunas linfáticas. Si la yegua presenta severa atrofia endometrial durante la estación reproductiva, se considera categoría III. Si uno o más de estos cambios se presentan juntos el cuadro es aún más desfavorable, debido a que ya el endometrio es completamente incapaz de gestar.

Fuente: (Rivera, 2003)

6.1.3 Puntos críticos y avances en la técnica de TE

Como ya se ha descrito en los años 90' se pasó de la aplicación de la técnica quirúrgica a la técnica no quirúrgica con entrada transcervical, se sabe que en un principio no funciono adecuadamente entre otras cosas, pudo ser que existiera demasiada manipulación del cérvix, lo cual indujo la liberación de prostaglandinas y en muchos casos se generó contaminación en el útero; es así que uno de los factores decisivos en la ejecución adecuada de la transferencia embrionaria, es la habilidad del veterinario para realizar dicho procedimiento sin lesionar o causar infecciones no deseadas, por lo cual se ha pensado que además de conocimientos se requiere el entrenamiento exhaustivo del profesional, quien debe plasmar gran calidad para que el procedimiento surja los resultados esperados.

Esta preocupación llevo a la búsqueda de una solución que tendiera más a tecnificar el proceso para minimizar el posible error humano; es así como (Wilsher & Allen, 2010), presentan en su artículo científico “un método mejorado para la transferencia de embriones no quirúrgica en la yegua”, ellos introdujeron a la técnica el uso de “un espéculo vaginal trivalvo y una pinza cervical de Wilsher, de esta forma ellos comprobaron que se facilitaba enormemente el ingreso transvaginal de la pistola de transferencia embrionaria, logrando no solo minimizar la manipulación del cérvix sino que además, se evitó el contacto que pudiese ser lesivo con el instrumental utilizado en el proceso; el articulo reporta la mejora significativa del reporte de preñeces logradas tras la implementación de la mejora.

Un aporte interesante, pero por ahora difícil de aplicar en campo, es el presentado en el artículo de (Brogan, Henning, Stout, & de Ruijter-Villani, 2016), presentan la relación existente entre “la evaluación ecográfica Doppler de flujo de color de la actividad del cuerpo lúteo y las concentraciones de progesterona en yeguas después de la transferencia de embriones; este Doppler es usado para hacer una valoración rápida del cuerpo lúteo, esto debido a que sus vasos sanguíneos se “correlacionan con las concentraciones de progesterona circulantes en las yeguas que se ubican en el ciclo estral”; este proceso investigativo buscó establecer la posible relación entre el tamaño del cuerpo lúteo, la vascularización y la circulación durante la preñez temprana en yeguas, así mismo se quiso determinar si el flujo sanguíneo de dicho cuerpo es una ayuda que favorece la selección de la receptora para la transferencia de embriones; trabajaron con “48 embriones recuperados” al octavo día posterior a la ovulación; antes de realizar la transferencia, se realizó ecografía para valoración del segmento transversal del cuerpo lúteo, así como los vasos sanguíneos, la valoración se acompañó de toma de muestra sanguínea en la yugular con el objeto de medir el plasma en las receptoras; posterior a la transferencia embrionaria y después de cuatro días, se repitió el mismo examen, también en los días once, dieciocho y veinticinco; los

resultados les mostraron que el área ocupada por el cuerpo lúteo y su flujo sanguíneo se correlacionan con la progesterona circulante al realizar la transferencia embrionaria y también en el momento inicial de la preñez; aun así este tipo de evaluación ecográfica Doppler de flujo de color no favorece la selección de receptoras y mucho menos permite predecir los resultados de la preñez de una mejor forma a los métodos usados en la actualidad.

Un estudio posterior realizado por (Cuervo, Claes, & Stout, 2018), busco establecer la comparación entre los resultados logrados con la aplicación de la técnica de transferencia de embriones normal, contra el uso de los dispositivos sugeridos por Wilsher y Allen; para lo cual conto con la aplicación de la técnica con varios ejecutores que contaban con diferentes grados de experiencia en la aplicación de la técnica; los resultados permitieron establecer, que el uso de los dispositivos mejoro la tasa de preñez, reportaron que dos expertos en la aplicación de la técnica tradicional obtuvieron una tasa de preñez que alcanzo entre el 78,8% y el 79,7%, mientras que los ejecutores del procedimiento que tenían nula o mínima experiencia en la aplicación de la técnica, pero apoyados en el uso de los dispositivos, lograron reportar una tasa de preñez que llego a ser del 90,9%, el 91,2% y el 93,4%.

Con el aporte de todos los expertos, consignados a lo largo de esta revisión monográfica, se presenta a continuación la secuencia de actividades que puede ser aplicada en campo, cuya intención es de servir de apoyo para aquellos veterinarios que deciden incursionar en el campo de la reproducción equina.

6.2 Secuencia de actividades para la TE en Campo

Esta secuencia de actividades para realizar la transferencia de embriones en campo, es el resultado del análisis que guía la toma de aspectos considerados a lo largo de los capítulos tratados en este documento; esta propuesta, se alimenta no solo del examen de los textos incluidos, también es consecuencia de la comprensión de los eventos, que suceden en la pasantía, al momento de aplicar la técnica de transferencia de embriones en campo; en donde una vez ubicadas tanto la donante como la receptora y realizado el proceso de sincronización, se acude a pedir el semen, que muy frecuentemente proviene de otros departamentos del país, obtenido el semen se procede a continuar con las actividades del proceso; de tal forma que esta secuencia de actividades es una construcción propia con los aportes de las referencias consignadas, plasmada a través de tres momentos (antes, durante y después); también se presenta teniendo en cuenta los puntos críticos hallados en la donante, en la receptora y en la aplicación de la técnica propiamente dicha; en suma, el resultado es la

secuencia de actividades para cada uno de los momentos, adaptando el proceso a su aplicación en campo.

Algunos aspectos relevantes, para llevar a buen término la aplicación del protocolo de transferencia embrionaria, quedan claros a través de los referentes consultados, es así como la capacidad de previsión del veterinario con respecto a cada momento de la TE (antes, durante, después) aseguran el éxito; es el caso dentro de los momentos previos a la aplicación de la técnica, en donde debe revisarse con atención el historial reproductivo de las yeguas, de esta forma el profesional podrá vislumbrar cual podrá ser la tasa de recuperación embrionaria por año; aunque sigue siendo un factor que dificulta el nacimiento más frecuente de nuevos potros, tener a los tres animales involucrados en el proceso para una TE perfecta es también un precepto de buen resultado (McKinnon, 1999), esto en la medida en la que la familiarización con los ciclos se facilita para el médico veterinario.

Teniendo en cuenta lo dicho, se presenta a manera de figuras la secuencia de acciones en cada uno de los momentos definidos a lo largo de la revisión realizada; en primera instancia se consideran las acciones requeridas antes de realizar la transferencia embrionaria, lo cual parte de la revisión del estado de salud y en especial lo relacionado con la reproducción, esto en el caballo usado como semental, así mismo de la yegua donadora y de la yegua receptora, algunas de estas actividades se presentan en la ilustración 7; luego se realiza la secuencia necesaria hasta obtener la sincronización de las yeguas, lo cual permite generar el embrión en la donadora, hasta aquí ira el primer momento.

A partir de las acciones pertinentes para recuperar el embrión se inicia el segundo momento, queda claro a través de las revisiones realizadas que el máximo de pulcritud es necesario en estos procedimientos para evitar la contaminación del embrión y de la yegua receptora, con lo cual se espera que la implantación se realice adecuadamente y que con las revisiones posteriores se confirme la preñez (ver ilustración 6), en cuanto a la donadora se requiere la intervención que permita regresarla a su estado normal hormonalmente hablando. El momento final inicia una vez realizada la transferencia embrionaria, aquí la atención se centra en la salud de la receptora y en los seguimientos periódicos que permitan establecer una preñez en curso en términos de normalidad, la vigilancia debe mantenerse hasta la obtención del potro y los posteriores cuidados que requiera la yegua receptora, con el fin de asegurar que el potro salga adelante; en algunos casos se tiene que, es otro profesional el que se encarga desde los últimos días gestacionales, tanto de la yegua como del potro. La figura 6, presenta la secuencia de acciones para ser realizada antes de la TE, por ello se relacionan elementos como los equinos involucrados, y en ellos factores como la salud y la calidad; y

tareas como la sincronización, la inseminación, hasta quedar a puertas de la recuperación del embrión.

La figura 7 presenta las actividades dentro del proceso de recuperación del embrión de la donadora; lo cual se expone de forma secuencial hasta llegar a la valoración del embrión; por último, la figura 8 registra de forma ordenada las actividades para la transferencia embrionaria; cabe destacar que en cada una de las figuras se sugiere realizar un registro que además de favorecer el control y seguimiento, promueve la generación de datos susceptibles de ser analizados y publicados.

Ilustración 6. Confirmación de preñez a los 15 días



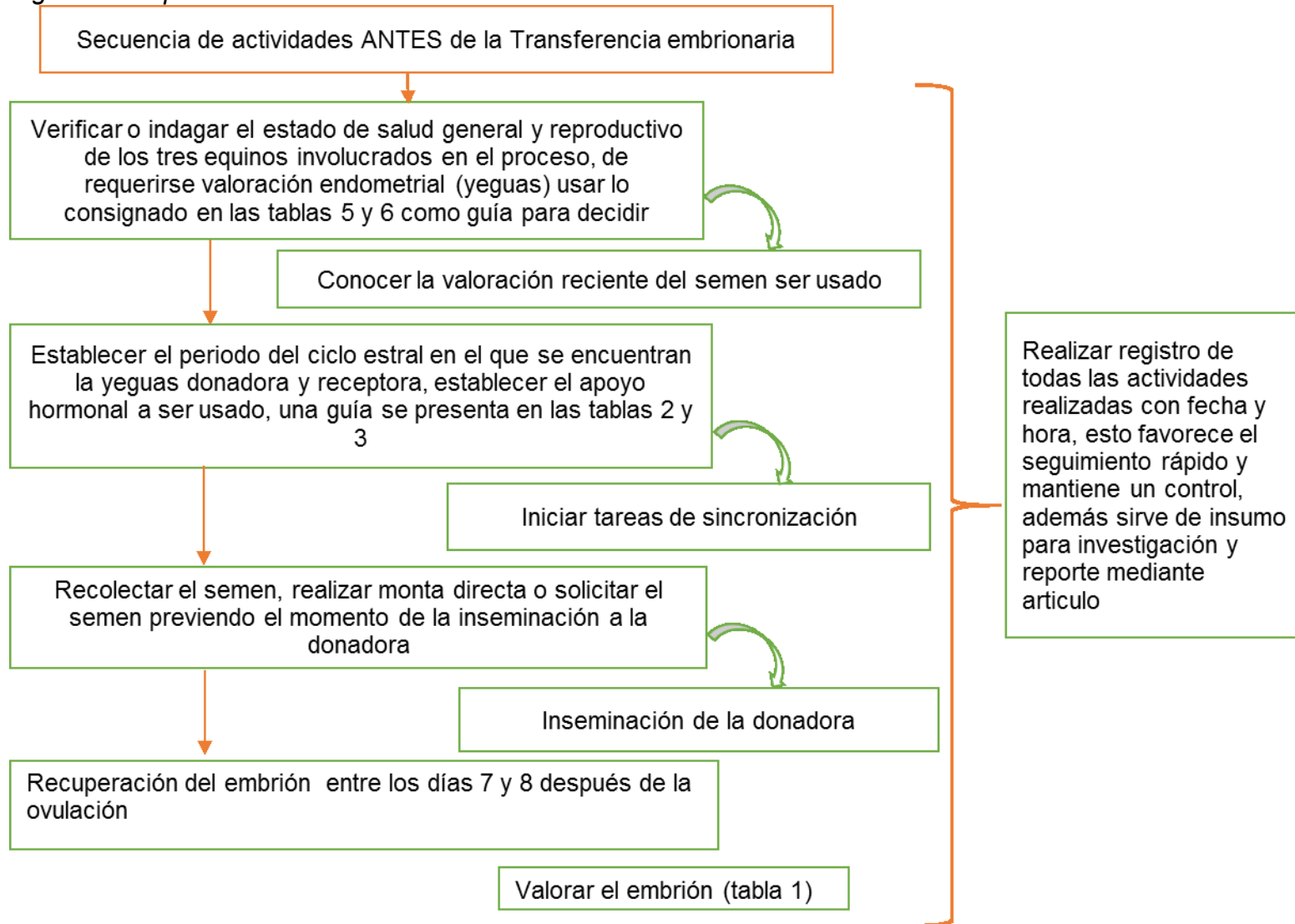
Fuente: el Autor

Ilustración 7. Examen clínico previo a la TE



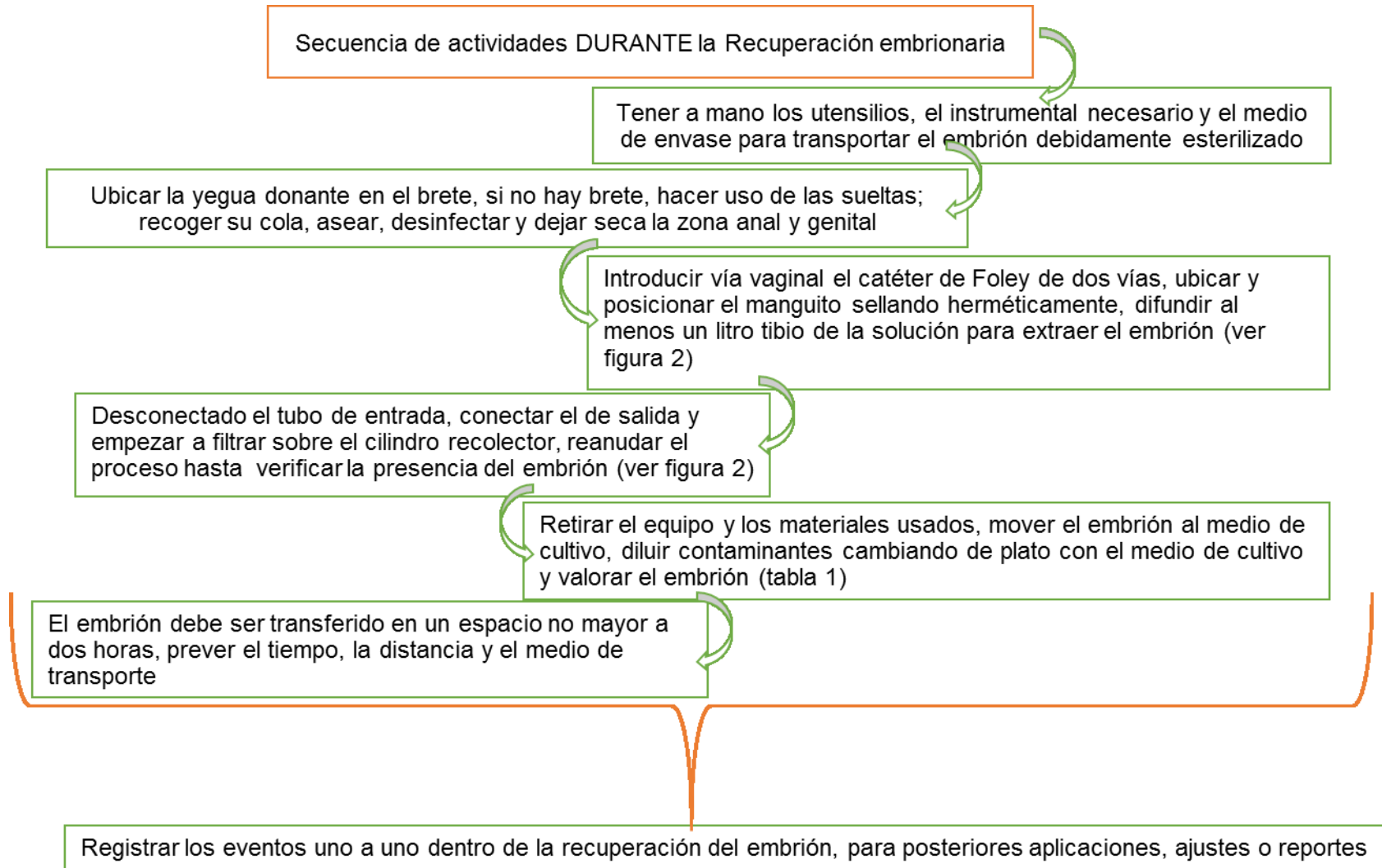
Fuente: el Autor

Figura 6. Propuesta – Secuencia de actividades antes de la TE



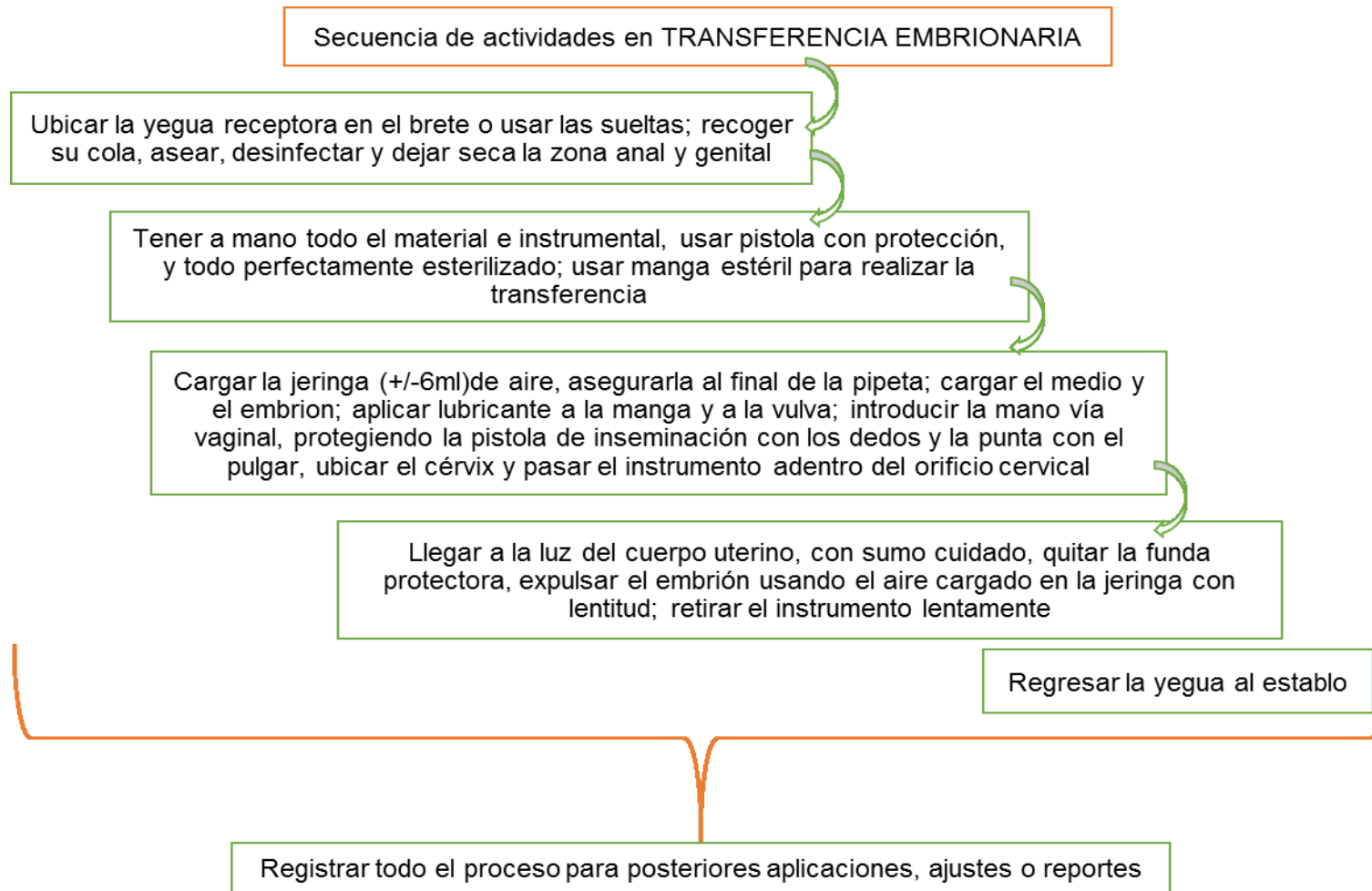
Fuente: el Autor

Figura 7. Propuesta- Secuencia de actividades en la RE



Fuente: el Autor

Figura 8. Propuesta – Secuencia de actividades en la TE



Fuente: el Autor

7. CONCLUSIONES

En este segmento final de la monografía se exponen las principales conclusiones generadas, teniendo en cuenta en su descripción los objetivos propuestos para llevar a buen término el presente documento.

En primera instancia el objetivo general: “Compilar la información relevante sobre la transferencia de embriones en equinos, tendiente a favorecer el porcentaje de éxito en la obtención de embriones que lleguen a término, en campo”, requirió la búsqueda, selección, análisis y reporte de la información proveniente de libros de texto propios de la Medicina Veterinaria, así como la exploración de bases de datos tanto generales como especializadas, con ello se concluye que la obtención de la información necesaria en la construcción del documento respondió a un ejercicio concentrado y demandante, que fortalece y amplía los conocimientos, lo cual se evidencia en la lectura de esta monografía donde se verifica la obtención de la compilación relevante sobre la transferencia de embriones en equinos, organizada de tal forma que pueda ser aplicada en campo.

Ahora bien, sin duda el logro del objetivo general se respalda a través del logro de cada uno de los objetivos específicos propuestos, es así como el primero: “Establecer los aspectos que han incidido en el éxito de la transferencia de embriones, desde los inicios de la implementación de dicha técnica”, se reporta como logrado, esto porque para llegar a establecer los aspectos que han incidido se requirió primero adentrarse en el conocimiento de la técnica para detectar y plasmar los elementos fundamentales para obtención de éxitos, lo cual se reporta en el análisis realizado a las investigaciones incluidas; en este mismo proceso fue posible detectar los puntos críticos expuestos en los fracasos.

Los aspectos que han incidido en el éxito de la transferencia de embriones, desde los inicios de la implementación de dicha técnica, se contienen en la secuencia de acciones previas (desde la selección de los equinos), las actividades propias en la generación del embrión a partir de la donante y el semen del caballo y por supuesto la aplicación correcta de la transferencia del embrión; todo dentro de los parámetros de calidad y asepsia.

La aplicación de las técnicas que se ofrecen en la biotecnología reproductiva, en especial la transferencia de embriones en los equinos, es de amplio crecimiento en el sistema de producción equino, y dentro de las opciones existentes no representa un alto costo, si se compara con técnicas como la fertilización mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), o con la transferencia intrauterina de gametos (TIG); la transferencia embrionaria, fomenta el mejoramiento de la especie equina desde la perspectiva genética, logrando mayor

número de crías al año, esto de ejemplares reconocidos en el medio por su alta calidad.

Respecto al segundo objetivo específico: “Categorizar las diversas actividades que requieren ser consideradas, para favorecer el porcentaje de éxito en la transferencia de embriones en equinos”; se concluye que la categorización incluida en este documento sobre actividades antes de la aplicación de la técnica de transferencia de embriones, actividades durante la recuperación del embrión y actividades durante la transferencia del embrión, permitió organizar las diversas tareas que requieren ser consideradas, para favorecer el porcentaje de éxito en la transferencia de embriones en equinos, esto en campo.

Esta categorización permitió develar los puntos críticos encontrados a lo largo de los tres momentos que componen la aplicación de la técnica de transferencia de embriones en equinos, estos puntos críticos se encontraron respecto del proceso de aplicación de la técnica, y de manera específica en las tareas realizadas con la donadora así como con la receptora; para fortalecer esta categorización se aunaron los avances reportados a la fecha para lograr un manejo más asertivo en esos puntos críticos.

En consecuencia y haciendo referencia al último objetivo específico: “Proponer una secuencia de actividades, basado en la definición de puntos críticos del proceso para la transferencia de embriones en equinos, tendiente a favorecer el porcentaje de éxito en la obtención de embriones que lleguen a término, para ser aplicado en campo”, con la revisión realizada se hizo posible proponer una secuencia de actividades, basada en la revisión documental, para la transferencia de embriones en equinos, tendiente a favorecer el porcentaje de éxito en la obtención de embriones que lleguen a término, para ser aplicado en campo.

Esta secuencia de actividades que se propone, es el resultado de combinar elementos de las diferentes secuencias halladas para la aplicación de la técnica, realizando una adaptación para ser aplicada en campo, con lo cual se busca realizar un aporte al conocimiento de los profesionales que ejecutan la técnica y para aquellos que quieren adentrarse en este campo.

Finalmente cabe resaltar que no se encontraron publicaciones secuenciales, realizadas por algún grupo de investigación en Colombia, sobre reportes de las diversas temáticas alrededor de la transferencia de embriones en equinos, lo cual abre una posibilidad en torno a la investigación y publicación en el tema, máxime cuando se tiene una raza propia como lo es el caballo criollo colombiano; con el fin de facilitar la investigación se sugiere a los profesionales que trabajan en el tema reproductivo de caballos realizar un registro minucioso del acontecer diario, de tal forma que esos datos sirvan de insumo para la construcción de artículos, que contextualicen la TE en el país.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, J. (2019). *Actualizaciones en las diferentes técnicas de transferencia de embriones existentes en la producción equina*. Fusagasugá: Universidad Nacional Abierta y a Distancia - Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente - Programa de Zootecnia.
- Agronegocios. (9 de Julio de 2015). *Agronegocios*. Recuperado el 28 de Septiembre de 2020, de Los tratamientos genéticos en los caballos han expandido el negocio en el país:
<https://www.agronegocios.co/ganaderia/tratamientos-geneticos-han-expandido-el-negocio-2621080>
- Andrade, F., Pérez, J., D'Olivera, A., Do Vale, V., Marc, H., Chacón, L., & Arias, S. (2011). Folliculogénesis y ovulación en la especie equina. *Revista de Medicina Veterinaria*, 43-50.
- Ángel, D., & Bran, J. A. (2010). Reproducción asistida en equinos: aportes desde la teoría. *Revista CES - Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 56-69.
- Aurich, C., König, N., & Budik, S. (2011). Effects of repeated embryo collection on embryo recovery rate in fertile mares. *Revista Reprod Domest Anim - PubMed*, 419-422.
- Basto, A. M., & González, Y. P. (2019). Fertilidad en diferentes protocolos de transferencia de embriones en yeguas. *Medicina Veterinaria y Zootecnia - Universidad Cooperativa de Colombia*, 1-13.
- Blanchard, T. L., Hartman, D. L., Brinsko, S. P., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., & Hinrichs, K. (2011). Embryo Transfer. En S. P. Brinsko, T. L. Blanchard, & D. L. Hartman, *Manual of Equine Reproduction* (págs. 276-287). Newyork: Mosby - Elsevier.
- Blanchard, T., Vaner, D., Love, C., & Brinsko, S. (2003). *Manual of Equine Reproduction*. Texas: Mosby.
- Boeta, M., Díaz, M., & Hayen, S. (2011). *Manual de la práctica de profundización en reproducción equina*. México D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México - Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Braun, J. (1994). Embryo transfer in horses--current status and future perspectives. *Revista Tierarztl Prax - PubMed*, 558-566.
- Brogan, P. T., Henning, H., Stout, T. A., & de Ruijter-Villani, M. (2016). Relationship between colour flow Doppler sonographic assessment of

corpus luteum activity and progesterone concentrations in mares after embryo transfer. *Revista Anim Reprod Sci - PubMed*, 50-62.

- Caldentey, F. J., Perkins, G., & Uslenghi, G. (2017). *Una posible causa de mortalidad embrionaria temprana en el trasplante embrionario equino*. Buenos Aires: Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires - Facultad de Ciencias Veterinarias.
- Campbell, M. L. (2014). Embryo transfer in competition horses: Managing mares and expectations. *Revista Equine Veterinary Education*, 322-327.
- Carnevale, E. M., Squires, E. L., & McKinnon, A. O. (1987). Comparison of Ham's F10 With CO₂ or Hepes Buffer for Storage of Equine Embryos at 5 C for 24h. *Revista Journal of Animal Science*, 1775-1781.
- Castaño, D. F., Múnera, R., Gómez, J. E., & Moncada, H. (2008). Transferencia de embriones en equinos: evaluación de un programa. *Revista Politécnica*, 65-74.
- CONtextogadero. (28 de Abril de 2017). *Conozca cuáles son los protocolos de transferencia de embriones*. Recuperado el 28 de Septiembre de 2020, de CONtextogadero: <https://www.contextogadero.com/ganaderia-sostenible/conozca-cuales-son-los-protocolos-de-transferencia-de-embriones>
- Cortés, Z., Aréchiga, C., Rincón, M., Rochín, F., López, C., & Flores, G. (2018). Revisión: El Ciclo reproductivo de la yegua. *Revista Abanico Veterinario*, 14-41.
- Cuervo, J., Claes, A., & Stout, T. (2018). Effect of embryo transfer technique on the likelihood of pregnancy in the mare: a comparison of conventional and Wilsher's forceps-assisted transfer. *Revista Veterinary Record BMJ Journals*, 183-323.
- Cuervo-Arango, J., Claes, A. N., & Stout, T. A. (2019). In vitro-produced horse embryos exhibit a very narrow window of acceptable recipient mare uterine synchrony compared with in vivo-derived embryos. *Revista Reprod Fertil Dev. - PubMed*, 1904-1911.
- Cuervo-Arango, J., Claes, A. N., Ruijter-Villani, M., & Stout, T. A. (2018). Likelihood of pregnancy after embryo transfer is reduced in recipient mares with a short preceding oestrus. *Revista Equine Vet J - PubMed*, 386-390.
- Cuervo-Arango, J., Mateu-Sánchez, S., Aguilar, J. J., Nielsen, J. M., Etcharren, V., Vettorazzi, M. L., & Newcombe, J. R. (2015). The effect of the interval from

- PGF treatment to ovulation on embryo recovery and pregnancy rate in the mare. *Revista Theriogenology*, 1272-1278.
- Dijkstra, A., Cuervo-Arango, J., Stout, T. A., & Claes, A. (2019). Monozygotic multiple pregnancies after transfer of single in vitro produced equine embryos. *Revista Equine Veterinary Journal*, 1-4.
- Dowsett, K. F., Woodward, R. A., & Boderer, D. A. (1988). A Study of Nonsurgical Embryo Transfer in the Mare. *Revista Theriogenology*, 631-642.
- Hinrichs, K. (2010). In vitro production of equine embryos: state of the art. *Revista Reprod Domest Anim - PubMed*, 3-8.
- Hochi, S. (2003). Cryopreservation of Follicular Oocytes and Preimplantation Embryos in Cattle and Horses. *Revista Journal of Reproduction and Development*, 13-21.
- Hochi, S., Fujimoto, T., Braun, J., & Oguri, N. (1994). Embarazos posteriores a la transferencia de embriones equinos criopreservados por vitrificación. *Revista Elsevier - Universidad de Agricultura y Medicina Veterinaria de Obihiro*, 483-488.
- Jimenez, C., & Castillo, J. M. (2014). Primera preñez en una yegua obtenida en Colombia, como resultado de inseminación con semen congelado obtenido por lavado epididimal. *Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia - Clínica de Reproducción Animal*, 10-12.
- Kenney, R. M. (1978). Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *Revista Journal of the American Veterinary Medical Association*, 241-262.
- Kenney, R. M., & Doing, P. A. (1986). Equine Endometrial Biopsy. En A. C. Pickles, *Current Therapy in Theriogenology* (págs. 723-729). Philadelphia: Equine Veterinary Journal - Beva.
- Losinno, L., & Aguilar, J. (22 de Noviembre de 2002). *Universidad Nacional de Río Cuarto - Facultad de Agronomía y Veterinaria - Depto. Producción Animal - Cátedra de producción equina*. Recuperado el 30 de Septiembre de 2020, de Reproducción y biotecnologías en la producción equina: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_equinos/curso_equinos_I/14-reproduccion_y_biotecnologias.pdf
- Losinno, L., & Pietrani, M. (2018). Programas comerciales de transferencia embrionaria: consideraciones para mejorar la eficiencia. *Compendio de las*

Memorias del IX Seminario Internacional de Medicina, Cirugía, Ortopedia y Reproducción Equina - CES Medicina Veterinaria y Zootecnia, 219-227.

- Maqueda, L. (12 de Enero de 2000). *Engormix*. Obtenido de Conservación de la calidad del Semen: Diluyentes, Empaque, Temperatura y Transporte: <https://www.engormix.com/porcicultura/articulos/conservacion-semen-diluyentes-empaque-temperatura-y-transporte-t25879.htm>
- Marenzi, M. I. (2015). *Aspectos operativos en transferencia embrionaria equina y análisis del potencial de la tecnología de criopreservación*. Trabajo final de grado para optar por el título de: Ingeniero en producción agropecuaria, Pontificia Universidad Católica Argentina, Facultad de Ciencias Agrarias - Ingeniería en Producción Agropecuaria.
- Marinone, A. I., Losinno, L., Fumoso, E., Rodríguez, E. M., Redolatti, C., Cantatore, S., & Cuervo-Arango, J. (2015). The effect of mare's age on multiple ovulation rate, embryo recovery, post-transfer pregnancy rate, and interovulatory interval in a commercial embryo transfer program in Argentina. *Revista Animal Reproduction Science - Elsevier*, 1-7.
- Martín, I., & Mongue, A. (2012). Congelación de embriones equinos: factores a tener en cuenta y desarrollo de la técnica. *Revista -complutense de Ciencias Veterinarias - I Congreso Solidario de Clínica Equina -*, 114-121.
- Martínez, M. (2016). *Pérdidas gestacionales en un haras de yeguas tipo salto*. Tandil: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos AAires - Facultad de Ciencias Veterinarias.
- Martínez, N. N., Pnzón, J. E., Porras, J. L., Pérez, J. N., Buitrago, E. R., Zambrano, J. L., & Jiménez, C. (2014). Criopreservación de embriones equinos primer reportede un potro de raza criolla colombiana nacido por transferencia de un embrión equino vitrificado. *Revista de Medicina Veterinaria*, 21-43.
- McCue, P. M. (1996). Superovulation. *Revista Vet Clin North Am Equine Prac - PubMed*, 1-11.
- McKinnon, A. (23 de febrero de 1999). *Harness.org.au - Documentos de la Conf World Trotting*. Obtenido de La cría y su tecnología: ahora y en el futuro - Traslado de embriones equinos: <https://www.harness.org.au/hra/papers/PMCKINN5.HTM>
- Oliveira, I., Canisso, I., Segabinazzi, L., Dell'Agua, C., Alvarenga, M., Papa, F., & Dell'Agua, J. (2018). Synchronization of cyclic and acyclic embryo recipient mares with donor mares. *Revista Anim Reprod Sci - PubMed*, 50-62.

- Palma, G. A. (2008). Evaluación Morfológica de los Embriones. En G. A. Palma, *Biotechnología de la Reproducción* (págs. 76-84). Mar del Plata: Córdoba Rebiotec.
- Panzani, D., Rota, A., Marmorini, P., & Vannozzi, I. (2014). Retrospective study of factors affecting multiple ovulations, embryo recovery, quality, and diameter in a commercial equine embryo transfer program. *Revista Theriogenology Animal Reproduction - Elsevier*, 807-814.
- Paredes, M. d., Jiménez, C., & Hernández, A. (2012). Progesterona plasmática y algunas características uterinas y embrionarias en la gestación temprana de yeguas criollas colombianas. *Revista de Medicina Veterinaria*, 123-136.
- Peña, M. M. (2019). *Factores reproductivos y metabólicos que intervienen en el proceso de la ovulación de la yegua*. Bogotá: Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA) - Facultad de Ciencias Agropecuarias - Pregrado en Medicina Veterinaria.
- Pietrani, M., Losinno, L., & Cuervo, J. (2019). Effect of the Interval From Prostaglandin F2alpha Treatment to Ovulation on Reproductive Efficiency Rates in a Commercial Equine Embryo Transfer Program. *Journal of Equine Veterinary Science*, 123-126.
- Pinna, A., Martinis, G., Souza, G., & Lilenbaun, W. (2013). Influence of Seroreactivity to Leptospira and Reproductive Failures in Recipient Mares of Equine Embryo Transfer Programmes. *Revista Reproduction in Domestic Animals*, e55-e57.
- Porras, J. L., Castro, J. L., & Abril, J. G. (2007). Evaluación del tratamiento superovulatorio con extracto de hipófisis equina en yeguas criollas. *Revista de Medicina Veterinaria*, 51-60.
- Raz, T., Green, G. M., Carley, S. D., & Card, C. E. (2011). Folliculogenesis, embryo parameters and post-transfer recipient pregnancy rate following equine follicle-stimulating hormone (eFSH) treatment in cycling donor mares. *Revista Australian Veterinary Journal*, 138-142.
- Restrepo, G., Giraldo, J. J., Gómez, J., Vásquez, N., Vázquez, E., Ortega, J. A., & Córdoba, L. F. (2010). Efecto de los suplementos fluido folicular y suero fetal bovino sobre la maduración in vitro de oocitos equinos. *Revista Perspectivas y Avances de Investigación - de la serie Lasallista Investigación y ciencia*, 217-230.
- Rivera, G. A. (2003). *Caracterización histopatológica del endometrio de yeguas con antecedentes clínico reproductivos de subfertilidad*. Valdivia: Universidad

Austral de Chile - Facultad de Ciencias Veterinarias - Instituto de Patología Animal.

- Roser, J., Etcharren, M., Miragaya, M., Mutto, A., Colgin, M., Losinno, L., & Ross, P. (2019). Superovulation, embryo recovery, and pregnancy rates from seasonally anovulatory donor mares treated with recombinant equine FSH (reFSH). *Revista Theriogenology Animal Reproduction - Elsevier*, 1-21.
- Ruíz, F. A. (2019). Consideraciones en la aspiración folicular (OPU), fertilización in vitro (FIV) e inyección intracitoplasmática (ICSI) en la especie equina. *Universidad Cooperativa de Colombia - Villavicencio*, 1-13.
- Ruiz, J., Perez, J., Espinosa, J., Valencia, A., & Jaramillo, D. (2018). Placentitis bacteriana como causa de aborto en yeguas: reporte de caso. *Revista Orinoquia - Universidad de los Llanos*, 236- 247.
- Samper, J. (2008). *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. Canada: Saunders .
- Scherzer, J. (2011). Artificial insemination and embryo transfer in mares. *Revista Compend Contin Educ Vet - PubMed*, 1-5.
- Squires, E. L., Carnevale, E. M., McCue, P. M., & Bruemmer, J. E. (2003). Embryo technologies in the horse. *Revista Theriogenology*, 151-170.
- Squires, E. L., McCue, P. M., & Vanderwall, D. (1999). The Current Status of Equine Embryo Transfer. *Revista Theriogenology - Elsevier Science Inc.*, 91-104.
- Stout, T. A. (2006). Equine embryo transfer: review of developing potential. *Revista Equine Vet J*, 467-478.
- Suárez, J. A. (2017). *Informe de pasantía internacional en el Departamento de Reproducción de la Universidad Nacional Autónoma de México*. Tunja: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.
- Torres, J. G. (2012). Puntos críticos en un programa de transferencia embrionaria. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias - I Congreso Solidario de Clínica Equina - Universidad de Córdoba*, 108-113.
- Vanderwall, D. (2004). Current Equine Embryo Transfer Techniques. En B. A. Ball, *Recent Advances in Equine Reproduction* (págs. 1-18). EEUU: Ivis.
- Vanderwall, D. K., & Woods, G. (2007). Embryo Transfer and Newer Assisted Reproductive Techniques for Horses. En R. S. Youngquist, & W. R. Threlfall, *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (págs. 211-218). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.

- Vizquete, G. (2016). *Implementación de la vitrificación embrionaria en razas equinas como herramienta para su conservación y progreso*. España: Universidad de Cordoba - Facultad de Veterinaria - Departamento de Medicina y Cirugía Animal.
- Wernli, J. (2010). *Actualidad sobre la congelación del semen equino y análisis de nuevas propuestas en la composición de los diluyentes*. Bogotá: Universidad de La Salle - Facultad de Ciencias Agropecuarias - Medicina Veterinaria.
- Wilsher, s., & Allen, W. R. (2010). An improved method for nonsurgical embryo transfer in the mare. *Revista Equine Veterinary Education - AAEP - Beva*, 39-44.
- Wilsher, S., Lefranc, A. C., & Allen, W. R. (2012). The effects of an advanced uterine environment on embryonic survival in the mare. *Revista Equine Vet J*, 432-439.