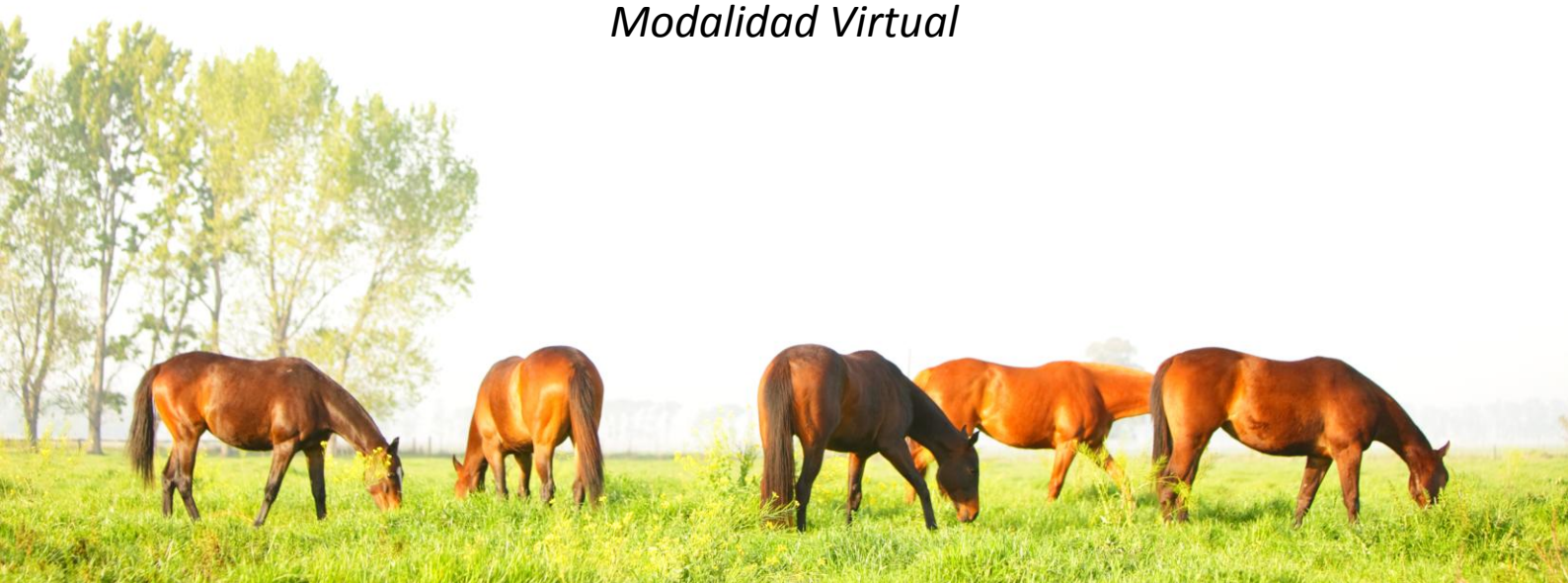
sate Sociedad Argentina de Tecnologías Embrionarias

IV Jornadas de Biotecnologías Reproductivas en Equinos

LIBRO DE RESÚMENES

22, 23 y 24 de Septiembre 2021

Modalidad Virtual



BIENVENIDOS

Buenos Aires, 22 de Septiembre de 2021

Desde la Sociedad Argentina de Tecnologías Embrionarias (SATE) les damos la bienvenida a nuestras IV Jornadas de Reproducción en Equinos. Al igual que nuestro Congreso de 2020, en esta oportunidad y debido a estos tiempos complejos de pandemia COVID 19, la virtualidad una vez más ha tomado una importante relevancia, que nos permite además tener un alcance sin límites. Son varios los años recorridos por esta sociedad, siempre vinculada y comprometida para promover, fomentar, mejorar y desarrollar todo lo relacionado con la investigación, estudio y aplicación práctica de las biotecnologías de la reproducción. Como desde 2015, año en que llevamos adelante las primeras jornadas en equinos, seguimos con el compromiso y apostando, como legado, a la difusión del conocimiento. Argentina se posiciona entre de los países con mayor producción mundial de equinos con fines productivos y deportivos. Cuenta con recursos humanos destacados internacionalmente que intervienen en la industria del equino. Es por ello que desde SATE, sentimos que esta especie posee un rol central para nuestra sociedad y creemos que debemos trabajar para generar buenas condiciones para nuestros socios para la aplicación de estas biotécnicas.

Las IV Jornadas de Reproducción en Equinos contarán con disertaciones de los más reconocidos profesionales del ámbito académico y práctico del ámbito nacional y con vasto reconocimiento internacional. Los asistentes podrán disfrutar de las últimas actualizaciones en temas como superovulación, manejo de receptoras y potrillos, criopreservación, producción *in vitro* de embriones, clonación, ICSI entre otros, que sin dudas harán de estos días unas jornadas con nivel de excelencia e imperdibles.

Agradecemos a los disertantes por la buena predisposición y a empresas e instituciones por el apoyo a nuestra propuesta.

José Javier de la Mata
Presidente CD de SATE, periodo 2020-2022

ÍNDICE

Comisión Directiva **4**

Sub-Comisión Organizadora del Evento **4**

Patrocinantes **5**

Programa **8**

Resúmenes de Presentaciones Orales **10**

- ¿PUEDE NUESTRA EXPERIENCIA EN LA REPRODUCCIÓN EQUINA RESCATAR A LOS RINOCERONTES DE LA EXTINCIÓN? 11
- AVANCES EN CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS EQUINOS: NACEN EN ARGENTINA LOS PRIMEROS POTRILLOS A PARTIR DE ICSI DE OVOCITOS VITRIFICADOS 13
- ASPIRACIÓN TRANSVAGINAL EN YEGUAS: UN NUEVO HORIZONTE EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN EQUINOS 15
- APLICACIÓN DE LA BIOPSIA DE EMBRIONES Y LA DETERMINACIÓN DEL SEXO MEDIANTE PCR EN UN PROGRAMA COMERCIAL DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (TE) EN ARGENTINA. 19
- PRIMEROS CUIDADOS NEONATALES A CAMPO Y DERIVACIÓN DEL POTRO CRÍTICO 28
- SUPEROVULACIÓN, RECUPERACIÓN EMBRIONARIA Y PREÑEZ DE YEGUAS ANOVULATORIAS TRATADAS CON FSH EQUINA RECOMBINANTE (REFSH) 37
- AVANCES EN CLONACIÓN, EDICIÓN GÉNICA Y REVERSIÓN DE SEXO EN EQUINOS 44
- IMPACTO DE LA BIOTECNOLOGIA EN LA CRIA DE CABALLOS DE POLO 47

Resúmenes de Trabajos Seleccionados **54**

- MANEJO Y SELECCIÓN IN VITRO DE ESPERMATOZOIDES EQUINOS CRIOPRESERVADOS CON POTENCIAL CAPACIDAD FECUNDANTE PARA SU USO EN BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS EN ESTA ESPECIE 55
- PROGRAMA COMERCIAL DE FOTOESTIMULACION ARTIFICIAL EN YEGUAS RECEPTORAS PARA TRANSFERENCIAS DE CLONES EQUINOS 57
- COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE ICSI CONVENCIONAL Y PIEZO-ICSI EN YEGUAS 59

SOCIEDAD ARGENTINA DE TECNOLOGÍAS EMBRIONARIAS

Comisión Directiva

Javier J. de la Mata. MSc. MV.

Presidente

Andrés Tríbulo MSc. MV.

Vicepresidente

Secretario: MV. Juan Rodríguez Pérsico
Prosecretario: MV. Sebastián Laurenti
Tesorero: MV. Adrián Vater
Protesorero: MV. Gastón Cuestas

Vocales Titulares:

1. MV. Mario Nigro
2. MV. Santiago Pérez Wallace
3. Dr. Gabriel Vichera

Vocales Suplentes:

1. MV. Carlos Munar
2. MV. Martín Narbaitz
3. MV. Emanuel Martín

Revisores de cuenta titulares

1. MV. Gabriel A. Bó
2. MV. Arturo de la Mata

Revisores de cuenta suplentes

1. MV. Lucio Scardaccione
2. MV. Ignacio Mujica

Sub-comisión organizadora del evento

Chairman: Dr. Gabriel Vichera
Integrantes: Dra. Mariana Suvá, MV. Victoria Arnold, MV. Roberto Jordan y Dr. Juan Ignacio Bastón.

PATROCINANTES

www.over.com.ar

Deslogest

INDUCTOR DE LA OVULACIÓN EN YEGUAS

ACETATO DE DESLORELINA

- **Práctica dosificación:**
  1 ml por animal.
- **Caja conteniendo 5 frascos de 1 ml.**

over® MEDICINA VETERINARIA 40 AÑOS

KHEIRON
BIOTECH
LA MÁS AVANZADA TECNOLOGÍA
EN CLONACIÓN
www.kheiron-biotech.com / Instagram: kheironlabs / Tel: 02304300080

IV Jornadas de Biotecnologías Reproductivas en Equinos

22, 23 y 24 de Septiembre 2021

Modalidad Virtual

PROGRAMACIÓN MIÉRCOLES 22 DE SEPTIEMBRE

18:00 hs. Apertura. Introducción a las Jornadas.

Dr. Gabriel Vichera (Chairman) y MV. Javier de la Mata (Presidente SATE)

18:20 hs. ¿Pueden nuestra experiencia en la reproducción equina rescatar a los rinocerontes de la extinción?

Dr. Daniel Salamone

19:00 hs. Avances en criopreservación de ovocitos equinos: nacen en Argentina los primeros potrillos a partir de ICSI de ovocitos vitrificados

Dra. Marina Sansiñena

19:40 hs. Aspiración transvaginal en yeguas: un nuevo horizonte en reproducción asistida en equinos.

Dr. Jacobo Rodríguez

Moderadores: Dr. Gabriel Vichera; MV. Victoria Arnold; MV. Roberto Jordán

PROGRAMACIÓN JUEVES 23 DE SEPTIEMBRE

18:00 hs. Aplicación de la biopsia de embriones y la determinación del sexo mediante PCR en un programa comercial de transferencia de embriones en Argentina.

MV. Fernando Riera

18:40 hs. **Primeros cuidados neonatales a campo y derivación del potro crítico.**

MV. Natalia Pallarols

19:20 hs. *Exposición de resúmenes científicos seleccionados*

Manejo y selección *in vitro* de espermatozoides equinos criopreservados con potencial capacidad fecundante para su uso en biotecnologías reproductivas en esta especie.

Dra. Claudia Osycka-Salut

19:40 hs. Superovulación, recuperación embrionaria y preñez de yeguas anovulatorias tratadas con FSH equina recombinante (FSHr).

Dr. Adrian Mutto.

Moderadores: Dra. Mariana Suvá; MV. Victoria Arnold; MV. Roberto Jordán

PROGRAMACIÓN VIERNES 24 DE SEPTIEMBRE

18:00 hs. Avances en clonación, edición génica y reversión de sexo en equinos.

Dr. Gabriel Vichera

18:40 hs. *Exposición de resúmenes científicos seleccionados*

Programa comercial de fotoestimulación artificial en yeguas receptoras para transferencias de clones equinos.

Mv. Roberto Jordan

Comparación de las técnicas de ICSI convencional y PIEZO-ICSI en yeguas.

Dr. Gabriel Alvarez

19:20 hs. Impacto de las biotecnologías reproductivas en el deporte (Entrevista).

Sr. Adolfo Cambiaso

19:30 hs. Impacto de la biotecnología en la cría de caballos de polo.

Sr. Santiago Ballester

Moderadores: Dr. Juan Bastón; Dra. Mariana Suvá; Dr. Gabriel Vichera.

20:20 hs. Cierre de las jornadas.

22:00 hs. Reunión de camaradería. Antares Pilar (Colectora Panamericana Km 51, Pilar).

RESÚMENES DE PRESENTACIONES ORALES

¿PUEDE NUESTRA EXPERIENCIA EN LA REPRODUCCIÓN EQUINA RESCATAR A LOS RINOCERONTES DE LA EXTINCIÓN?

D. F. Salamone, M. B. Rodríguez, O. Briski

Laboratorio Biotecnología Animal, Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, y Instituto de Investigaciones en Producción Animal, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

En equinos las fallas en la superovulación y la fecundación *in vitro* convencional (FIV) han favorecido la aplicación de la *Inyección Intracitoplasmatica del Espermatozoide* (ICSI), tecnología reproductiva que tiene buenos resultados en esta especie. Por el contrario, en los rumiantes la superovulación y la FIV son muy eficientes pero la ICSI no. La familia *Equidae* tiene un solo género, pero en el orden en que se encuentran los equinos están los tapires y rinocerontes, ambas especies amenazadas. Una hipótesis que hemos elaborado es que en las especies emparentadas filogenéticamente pueden ser abordadas bajo las mismas tecnologías de reproducción asistida. En este sentido la técnica de ICSI ha ganado protagonismo y se posiciona como la mejor opción en especies silvestres de équidos. ¿Podrá cumplirse entonces esta hipótesis en especies emparentadas como los tapires y rinocerontes? Estudios recientes reportaron un gran avance en la producción de embriones *in vitro* de animales en vías de extinción. En este caso el protagonista fue el rinoceronte blanco del norte africano (*Ceratotherium simum cottoni*), del cual solo quedan dos hembras, especie de la que se logró obtener y congelar embriones por medio de la ICSI combinada con la técnica de *ovum pick up* (OPU) (Hildebrandt y col., 2018).

Una de las mayores problemáticas a enfrentar cuando se trata de especies salvajes en vías de extinción es la posibilidad de obtener gametas. Ante esta dificultad se podría pensar en algunas alternativas estudiadas previamente como el uso de cruzamientos heteroespecíficos. Este tipo de cruzamientos ha sido ampliamente utilizado como modelo para el estudio de las diferentes interacciones entre especies, cuanto más alejadas estén entre sí más probabilidades habrá de un bloqueo a nivel de la zona pelúcida (ZP) o la membrana plasmática durante la fecundación. Sin embargo, hemos observado que si se sortean estas barreras usando la ICSI, la fecundación y el desarrollo es posible. Esto último fue demostrado utilizando la inyección de espermatozoides equinos en oocitos maduros de otras especies, como por ejemplo oocitos de cerdas, y con este abordaje produjimos blastocistos heteroespecíficos. Esto nos lleva a una interesante reflexión: ¿habrá posibilidades para el nacimiento de híbridos extremos?

Para afrontar este problema pensamos que las quimeras podrían dar soluciones. Estas en la mitología griega son seres fantásticos que tienen en su estructura partes de diferentes especies. Sin embargo, la quimera biológica hace referencia a individuos que tienen células

provenientes de diferentes embriones. Recientemente en nuestro laboratorio hemos realizado experimentos con quimeras heteroespecíficas. En estos ensayos obtuvimos lo que llamamos quimeras transitorias, en la cual produjimos embriones en la que los precursores de las células placentarias son de una especie (trofoblasto) y los precursores de las células fetales son híbridas (macizo celular interno). Esta metodología tal vez nos permitirá gestar un híbrido o especie diferente no tan emparentada y que el producto final no sea quimérico.

Por último, otra técnica que suma posibilidades al rescate de estas especies es la edición génica. Con ella se puede llegar a eliminar progenies celulares enteras. Por ejemplo, la deleción del gen *Nanos 2*, suprime totalmente la línea germinal masculina. Con esta tecnología un testículo de un padrillo libre de la línea germinal propia puede ser colonizado por células germinales de otra especie, por lo que un equino eventualmente podría producir espermatozoides de otra especie como la de un rinoceronte ¿ficción o realidad? Un análisis apasionado de las posibilidades.

AVANCES EN CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS EQUINOS: NACEN EN ARGENTINA LOS PRIMEROS POTRILLOS A PARTIR DE ICSI DE OVOCITOS VITRIFICADOS

G. J. Clérico[1,7]; G. Taminelli[1]; J.C. Veronesi[2], J. Polola[3,4], N. Pagura[3], C. Pinto[6], M. J. Sansiñena[1,6,7]

[1]Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Pontificia Universidad Católica Argentina. [2]Frigorífico Lamar, Buenos Aires, Argentina. [3]Haras La Aguada – El Dok, Buenos Aires, Argentina. [4]Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario. [5]School of Veterinary Medicine, Louisiana State University. [6]Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Universidad del Salvador. [7]Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

La vitrificación de ovocitos equinos para el banqueo de genética es considerada una técnica experimental, habiéndose reportado a la fecha únicamente tres nacimientos en el mundo. El objetivo de este trabajo fue describir el estado oxidativo de ovocitos equinos vitrificados, y analizar el efecto de la suplementación con melatonina sobre el estado oxidativo general (ROS), la producción de especies reactivas del oxígeno de origen mitocondrial (mROS) y el desarrollo embrionario. Se recuperaron ovocitos inmaduros a partir de ovarios de faena, y fueron vitrificados en una concentración final de 20% EG, 20% DMSO y 0.65 M de trehalosa. Se utilizaron las tinciones de fluorescencia DCHF-DA y MitoSOX™ para cuantificar las ROS totales y mROS, respectivamente. La fecundación fue realizada mediante la técnica de ICSI y los embriones fueron cultivados durante 7-10 días. Las variables continuas fueron analizadas mediante prueba de Kruskal-Wallis, y el desarrollo embrionario mediante un modelo lineal generalizado. El proceso de criopreservación incrementó las ROS totales respecto a ovocitos no-criopreservados. Se detectó disminución significativa de mROS en ovocitos vitrificados versus el control sin vitrificar con la adición 10^{-9}M melatonina en IVM. No se encontraron diferencias en mROS entre ovocitos vitrificados versus control en ausencia de melatonina en IVM. Los resultados de desarrollo post-ICSI y transferencias se presentan en Tabla 1.

Tabla 1. Desarrollo ICSI, transferencias y preñeces de ovocitos vitrificados y frescos, con y sin tratamiento de melatonina durante la maduración.

Grupo	N	Maduros Mean % ± SEM	Clivados Mean % ± SEM	Blastocistos Mean % ± SEM	No. embriones grado 1-2	No. embriones grado 3-4	No. embriones transferidos	% Preñez (receptora)	♂:♀
Fresco melatonina (+)	100	65±4.8 (65/100)	75±5.3 (49/65)[a]	29±5.7 (19/65)[a]	17	2	5*	50% (2/4)	1 : 1
Fresco melatonina (-)	137	53±4.2 (73/137)	77±5.0 (56/73)[a]	26±5.1 (19/73)[a]	16	3	7*	83% (5/6)	2 : 3
Vitrificado melatonina (+)	110	54±4.8 (59/110)	61±6.3 (36/59)[ab]	15±4.9 (9/59)[ab]	6	3	8**	17% (1/6)	1 : 0
Vitrificado melatonina (-)	106	54±4.7 (57/106)	46±6.6 (26/57)[b]	9±3.8 (5/57)[b]	4	1	3	33% (1/3)	0 : 1

*2 de los blastocistos transferidos a una receptora; **2 de los embriones clasificados como grado 3 debido a espacio perivitelino anormal fueron transferidos junto a un embrión grado 1; [a,b] Superíndices diferentes en columna indican diferencias significativas, $p<0.05$.

Este trabajo resultó en el nacimiento de los potrillos a partir de ovocitos vitrificados, madurados, fecundados y cultivados *in vitro* en el país. Se demostró para la especie equina que, al igual que en otras especies, la vitrificación incrementa las ROS. La melatonina logró reducir las ROS mitocondriales y mejorar el desarrollo embrionario, pero la obtención de tasas de preñez inferiores al control sin suplementar debería ser estudiada en detalle en próximos ensayos.

Palabras clave: vitrificación, ovocito, ICSI, equino

ASPIRACIÓN TRANSVAGINAL EN YEGUAS: UN NUEVO HORIZONTE EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN EQUINOS

J. S. Rodriguez

Vista Equine Colorado, Fort Collins, Colorado, USA

Una de las técnicas más comunes para la obtención de oocitos es la aspiración folicular por vía transvaginal (TVA), la cual ha incrementado mucho en la práctica privada en los últimos años no solamente en EE.UU sino también en el resto del mundo. Los oocitos recuperados por TVA son destinados a la producción de embriones mediante la técnica de ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides). Esta técnica es especialmente recomendada para yeguas problema (ya sea por endometritis crónicas, bloqueo de oviductos, problemas cervicales, metabólicos o musculoesqueléticos) o por factores relacionados con los padrillos (ya sea padrillos sub-fértiles con bajo número de espermatozoides o semen de baja calidad, pocas dosis disponibles/ alto valor, padrillos muertos, semen congelado de epidídimo o disponibilidad de semen sexado).

Sin embargo, TVA también puede ser utilizada como una herramienta de diagnóstico o en programas de transferencia de embriones para sincronización de receptoras. El objetivo de este resumen es poder brindar la mayor información acerca del uso de TVA y de la obtención de oocitos para la producción de embriones.

Para TVA, la yegua se introduce en una manga, se hace una limpieza del área perineal con previa sedación usando Acepromazine (10-20mg) (1cc IM), Detomidine (2mg/ml) (0.6-0.8cc IV) y Butorphanol (10mg/ml) (1cc IV). Antes de la introducción del transductor por la vagina se administra N-butylscopolammonium, Buscopan® (0.3mg/kg) (6-7cc IV) para relajación rectal y facilitar la manipulación ovárica. Se utiliza una mordaza al momento de la punción. Después de la aspiración se administra una sola dosis de Flunixin Meglumine (1.1mg/kg) (10cc IV) y Excede (12cc, IM). Se recomienda tomar la temperatura diaria por un periodo de 3 días para detectar complicaciones, como por ejemplo peritonitis aguda o abscesos ováricos. Es importante antes de la punción folicular tener en cuenta el ligamento ancho, fosa de ovulación del ovario, la ubicación del cervix y una buena estabilización del ovario. Evitar punciones innecesarias del parénquima ovárico para evitar futuros hematomas o adherencias.

TVA para la colecta de oocitos

TVA puede ser realizada cada 2-3 semanas. Personalmente aspiro las yeguas cada 3 semanas, 4-5 días después de la administración de una PGF2α (si es que la yegua fue previamente aspirada). Lo más importante al momento de la aspiración de oocitos inmaduros

es la presencia de edema uterino al comienzo de la onda folicular. Generalmente se aspiran todos los folículos mayores a 8mm. En caso de TVA bi-semanal puede ser que las yeguas no formen suficiente cantidad de folículos al momento de la aspiración, especialmente en yeguas viejas que muchas veces necesitan más tiempo o que forman menos folículos. Está reportado que repetidas aspiraciones no afectan la fertilidad, pero pueden causar fibrosis del parénquima ovárico.

Los estrógenos juegan un importante papel en la producción *in-vitro* de embriones. La producción de blastocistos fue mayor a partir de oocitos recuperados de yeguas con folículos inmaduros con la presencia de un folículo dominante.

TVA son realizadas usando una aguda 12 G de "double lumen", los folículos se lavan al mismo tiempo que se va escarificando las células de la granulosa. Se utiliza una solución de lavaje de embriones o solución de PBS con la adición de 7.000 IU de heparina y una presión de vacío de 135-150mm de Hg.

Los principales factores que afectan un programa de ICSI-ET son:

- Edad de la donante
- Padrillo
- Estadio de la onda folicular al momento de TVA

Respecto a la edad de la donante, se sabe que los oocitos de yeguas viejas presentan un mayor número de anomalías, principalmente desorganización de microtúbulos. Las fallas en Metafase II predispone a aneuploidía y anormalidades en la función y el desarrollo celular (abortos, enfermedades genéticas y defectos de desarrollo). En yeguas viejas se necesita un mayor número de transferencias para producir una preñez viable a término (4-6 ET= 1 preñez).

El estadio de la onda folicular influencia la morfología de los oocitos recuperados al momento de TVA, cromatina, citoplasma, cumulus y desarrollo. Oocitos recuperados de una nueva onda folicular es menor (12% menos) si lo comparamos con los oocitos recuperados de folículos subordinados (26% más). Ademas, oocitos recuperados de una nueva onda folicular presentan un cumulo más compacto y chromatina fibrilar si se comparan con los oocitos recuperados de folículos subordinados, los cuales son menos compactos y la cromatina es más condensada.

Se calcula que de cada TVA, se recuperan un 60% de oocitos expandidos que alcanzan MII entre 22-24 h, un 30% de oocitos recuperados son compactos y alcanzan MII entre 30-36 h. Un 10% de oocitos son degenerados.

Auto-transferencia embrionaria

En este caso se utiliza la misma donante como receptora, previa aspiración y producción del embrión *in-vitro*. Cuando la donante presenta un folículo dominante de 35-37 mm de diámetro y edema uterino, se induce con Deslorelina, hCG o ambas, y se realiza TVA a las 24-28 horas post inducción. Es importante la presencia de un buen patrón uterino y consistencia uterina durante todo el ciclo. Se realiza la incubación del oocito, se inyecta el espermatozoide y a los 6-7 días post-ICSI se transfiere en forma convencional un blastocisto temprano**.** Esta técnica reportó un porcentaje de preñez de un 65%. Una de las mayores limitantes es que si se hace en yeguas con folículos inmaduros se pierde la relación útero-embrión de la donante por el tiempo extra que necesitan los oocitos inmaduros durante el periodo de maduración.

"Reprogramar" ovarios en yeguas transicionales

Todos los años hay yeguas que están ciclando y que por una razón u otra dejan de producir folículos durante la temporada. Este fenómeno es habitual en yeguas en entrenamiento con tratamientos intraarticulares, tratamientos prolongados con dexametasona, yeguas post-parto, en yeguas transicionales o en yeguas que han tenido fiebre por tiempo prolongado (ex: Adenitis). Muchas de estas yeguas después del TVA y usando una dosis de PGF2α vuelven a formar un folículo dominante 7-10 días post-PGF2α.

Sincronización de receptoras

TVA en yeguas transicionales al comienzo de la temporada puede ser un recurso para considerar, especialmente cuando el número de receptoras ciclando es bajo. Se puede administrar 10mg de estrógenos por 3-4 días antes de TVA o realizar TVA en yeguas transicionales que producen su propio edema uterino. Después de TVA, las yeguas son suplementadas con dosis ascendentes de progesterona por 4-5 días hasta el día de la transferencia embrionaria. Una vez transferido el embrión dichas yeguas deben ser suplementadas con progesterona ya que, desafortunadamente, estas yeguas no forman cuerpos lúteos como para producir suficiente cantidad de progesterona y mantener la preñez. Con este protocolo se obtuvo un porcentaje de preñez de aproximadamente 75-77%. (data personal a ser publicada).

Biopsias de ovarios

TVA también puede ser utilizada como una herramienta para la toma de muestras en yeguas con problemas ováricos, especialmente en lugares donde los laboratorios de endocrinología son limitados o los análisis hormonales son muy caros. Para la toma de muestra se necesita agujas especiales para biopsias (TRU-CUT® Biopsy device). La muestra ovárica es enviada a histopatología para el diagnóstico de tumores de células de la granulosa, cistoadenomas/adenocarcinomas, teratomas y dysgerminomas.

Otras indicaciones

- Para la producción de embriones usando semen sexado- ICSI
- Tratamientos ováricos con platelets-rich plasma-PRP (*premature ovarian aging in humans*)
- No recomendado para tratamientos ováricos con *Stem Cells*. Sin buenos resultados.
- Transferencia intrafolicular de oocitos. Otra opción que todavía necesita más desarrollo para uso clínico.

Bibliografía

Comparison of maturation, cleavage and blastocyst rates in equine oocytes recovered by transvaginal aspiration from estrogen-subordinate follicles versus non-estrogen-subordinate follicles. 449 Clinical Theriogenology • Volume 9 Number 3 • September 2017. E. Metcalf, K. Masterson, D. Battaglia, R. Beck

Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. Theriogenology 73 (2010) 1116–1126. C. Jacobson, Y. Choi, S. Hayden, K. Hinrichs

Effects of repeated transvaginal aspiration of immature follicles on mare health and ovarian status. Equine Veterinary Journal 44, Suppl. 43 (2012) 78–83, 2012. I. Velez, C. Arnorld, C. Jacobson, J. Norris, Y. Choi, J. Edwards, S. Hayden and K. Hinrichs

Ovarian Follicular Dynamics During the Estrous Cycle in the Mare. Israel Journal of Veterinary Medicine, Vol. 67 (1) 2012. T. Raz, and A. Raz

Advanced mare age impairs the ability of in vitro-matured oocytes to correctly align chromosomes on the metaphase plate. Equine Veterinary Journal 51 (2019) 252-257 M. Rizzo, K. D. Ducheyne, C. Deelen, M. Beitsma, S. Cristarella, M. Quartuccio, T. Stout and M. De Ruijter-Villani

Chromatin and cytoplasmic characteristics of equine oocytes recovered by transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration are influenced by the developmental stage of their follicle of origin. Theriogenology 80 (2013) 1-9. A. Vernunft, H. Alm, A. Tuchscherer, W. Kanitz, K. Hinrichs, H. Torner

Cytoskeletal alterations associated with donor age and culture interval for equine oocytes and potential zygotes that failed to cleave after intracytoplasmic sperm injection. Reproduction, Fertility and Development, 2015, 27, 944–956. E. Ruggeri, K. DeLuca, C. Galli, G. Lazzari, J. DeLuca and E. Carnevale

Autogenous transfer of intracytoplasmic sperm injection-produced equine embryos into the uterus of the oocyte donor during the same oestrous cycle. Reproduction, Fertility and Development. J. B. Rossini, J. Rodriguez, Bresnahan, J. E. Stokes and E. M. Carnevale

Ultrasound-guided aspiration of dominant follicles (>25 mm) followed by luteinization and progesterone production during the estrous cycle in mares. Theriogenology 73 (2010) 1116–1126 F.S. Ignacio, D.F. Montechiesi, D.R. Bergfelt, C.M.B. Orlandi, L.R. Carvalho, N.J. Puoli Filho, C. Meira

Evaluation of diagnostic utility, safety considerations, and effect on fertility of transvaginal ultrasound-guided ovarian biopsy in mares. Theriogenology 85 (2016) 1030–1036. M. Diel de Amorim, D. Nairn, S. Manning, I. Dedden, E. Ripley, K. Nielsen, C. Card

APLICACIÓN DE LA BIOPSIA DE EMBRIONES Y LA DETERMINACIÓN DEL SEXO MEDIANTE PCR EN UN PROGRAMA COMERCIAL DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (TE) EN ARGENTINA.

F. L. Riera

Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Prof. Robert M. Kenney, Doña Pilar Embriones, Lincoln (B), Argentina.

Introducción

En algunas disciplinas ecuestres existe una clara preferencia de los criadores de un sexo sobre el otro. El ejemplo más claro es la práctica del polo, en la cual la gran mayoría de los caballos jugando alto hándicap son hembras (>90%). A partir del año 2010 los Centros de Transferencia Embrionaria han sufrido la presión del mercado para producir únicamente hembras. Si bien existieron intentos de trabajar con semen sexado mediante Citometría de Flujo, o mediante Nano-partículas, estos no prosperaron desde el punto de vista comercial o técnico/logístico. El único método utilizado para la producción de hembras es la eliminación de los machos luego del diagnóstico ecográfico del sexo del feto. Esto puede realizarse a partir del día 58-60 de gestación basado en la localización diferencial de la posición del tubérculo genital del feto hembra o macho, o de las características ecográficas diferentes de las gónadas de ambos sexos a partir del día 110 de gestación.

Objetivos

El objetivo de este proyecto fue utilizar un sistema de diagnóstico pre-implantatorio (PGD) del sexo del embrión por métodos moleculares realizado previamente a la transferencia embrionaria, y adaptarlo a nuestras condiciones de trabajo. Para que el sistema fuera viable debía cumplir con los siguientes requisitos: a) no afectar significativamente el porcentaje de preñez, b) el procedimiento de biopsia debía ser ágil y rápido, y c) el diagnóstico debía poder realizarse en el mismo establecimiento y producir resultados confiables e inmediatos.

Materiales y Métodos

Este estudio se realizó durante la temporada 2019 e involucró un total de 616 embriones de los cuales se analizaron retrospectivamente 459 embriones **BIOPSIADOS** divididos en dos grupos: a) embriones producidos localmente en nuestro laboratorio (**LOCALES**) y b) embriones producidos en otro centro y enviados a nuestro laboratorio para su diagnóstico del sexo y transferencia inmediata (**VIAJEROS**)

Las biopsias se realizaron mediante micromanipulación utilizando un microscopio invertido, equipado con micromanipuladores e inyectores marca Narishigue. El diagnóstico se realizó por

medio de un kit comercial de PCR Isotermal (iiPCR) (POCKIT, Gene Research Biotech), utilizado de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El Kit utiliza un gen autosómico de control para la presencia o ausencia de ADN en la muestra (G-ADN) y un gen específico del macho (Y-ADN). Si el análisis resulta que ambos genes son positivos (G-ADN POS y Y-ADN POS) el diagnóstico fue considerado MACHO. Si el análisis resulta que el gen G-ADN es positivo pero el gen Y-ADN es negativo el diagnóstico fue considerado HEMBRA. Los embriones diagnosticados HEMBRA fueron transferidos dentro de las dos horas posteriores a la biopsia, en cambio los diagnosticados MACHO fueron descartados en su mayoría. La confirmación del sexo de la preñez se realizó por ultrasonografía transrectal de la posición del tubérculo genital a partir del día 60 (ECO 60) o por las diferencias ecográficas entre las gónadas fetales en el MACHO y la HEMBRA a partir del día 110.

Resultados

De los 616 embriones enviados 2 no fueron encontrados en el *container*. De los 614 restantes, 111 se transfirieron sin biopsia (NO BIOPSIADOS) por pedido del propietario y 5 no pudieron ser biopsiados por falta de tiempo. Del resto de los embriones, 39 no se biopsiaron porque su tamaño era menor a 200 micras (n=16) o porque presentaban alguna anormalidad morfológica (n=23). Por lo tanto, la biopsia se realizó en 459 embriones. Las biopsias se realizaron en 130 días diferentes y el número de embriones biopsiados por día fue de entre 1 y 14 (media 3 y promedio 3,5).

El porcentaje de preñez total de embriones BIOPSIADOS diagnosticado entre los 14 y 21 días de la ovulación de la donante (ECO 14-21) fue de 72,4%. No hubo diferencias significativas en el porcentaje de preñez entre embriones LOCALES o VIAJEROS (73 vs 72%; p>0.1). Tampoco se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de preñez entre embriones BIOPSIADOS y NO BIOPSIADOS (72 vs 73%). El porcentaje de preñez de BIOPSIADOS no fue diferente del obtenido con cualquier categoría de los embriones NO BIOPSIADOS (P<0.1). El tamaño del embrión no afectó el porcentaje de preñez tanto para los embriones BIOPSIADOS o NO BIOPSIADOS.

En 28 yeguas que habían sido diagnosticadas preñadas (ECO 14-21) con embriones biopsiados no pudimos realizar la confirmación del sexo por ECO 60. Esto se debió a la decisión de sus propietarios de retirarlas a sus establecimientos antes de la fecha de revisación ECO 60 por temas de logística. Del resto de las yeguas receptoras evaluadas el porcentaje de pérdidas de preñez diagnosticado entre ECO 14-21 y ECO 60 no fue diferente en BIOPSIADOS (34/228; 14,9%) comparado con NO BIOPSIADOS morfológicamente normales (14/80; 17,5%) (P<0.1). El porcentaje de pérdidas de preñez no fue significativamente diferente en embriones LOCALES o VIAJEROS tanto para la categoría de BIOPSIADOS o NO BIOPSIADOS.

Efecto de la temperatura del *container*: el porcentaje de preñez logrado con embriones VIAJEROS (no incluyendo aquellos muy pequeños o de mala calidad) varió significativamente de acuerdo a la temperatura del *container*, medida al momento de ser abierto para sacar el/los embriones para la biopsia y/o la transferencia. Aquellos embriones cuyos *containers* al abrirse tenían una temperatura de 21 a 23 ºC, estuvieron asociados a menor porcentaje de preñez que aquellos embriones cuyos *containers* midieron 15-16 ºC o 17-18 ºC ($P<0.05$). La temperatura de *container* de 21-23 ºC y 19-20 ºC ($P=0.05$) estuvo asociada a una mayor de pérdida de preñez que el grupo cuya temperatura de arribo fue de 12 a 14 grados.

Efecto del tiempo entre colección y biopsia: el tiempo transcurrido entre la colección del embrión y la biopsia no afecto el porcentaje de preñez hasta las 20hs, sin embrago el porcentaje de preñez fue menor si el tiempo transcurrido superó las 20-24hs post colección ($P<0.05$). En este mismo grupo, la incidencia de pérdidas de preñez fue mayor que aquellos grupos en los que el intervalo colección-biopsia fue menor.

Eficiencia del diagnóstico: Una muestra se perdió durante su procesamiento por lo tanto la iiPCR se realizó sobre 458 muestras. El tiempo necesario para preparar las muestras para el análisis fue de aproximadamente 20 minutos y el ciclo de la iiPCR dura 32 minutos. La presencia o ausencia de ADN en la muestra depende no solamente de la calidad de la toma de biopsia (presencia o no de material) sino también de la sensibilidad y certeza de la PCR. Evaluamos el porcentaje de muestras en las que se corrió el G-DNA y que resultaron G-DNA POSITIVAS (POS) para evaluar si había un efecto de la experiencia adquirida a lo largo de la temporada tanto en la toma de la muestra como en el procedimiento de la iiPCR. En la primera mitad de la temporada (Octubre a Diciembre) el 80,3% (114/142) dieron G-DNA POS mientras que en la segunda parte de la temporada (Enero a Abril) fue de 85,4% (176/206). Esta diferencia no fue significativa ($P>0.1$). El porcentaje de preñez no fue diferente entre los embriones que resultaron GEN POS o GEN NEG ($P>0.1$)

Con ambos *primers*: en 343/458 (74,9%) muestras el diagnóstico se realizó utilizando los dos *primers* (G-ADN y Y-ADN). En 286/343 (83,4%) de las muestras el resultado del G-DNA fue positivo (G-DNA POS). En este grupo, el 43% (123/286) también resultó Y-DNA positivo (Y-DNA POS), estableciéndose un diagnóstico de MACHO. Las muestras en las que el resultado fue G-DNA POS y Y-DNA NEG fueron diagnosticados como HEMBRA (163/286; 57%). Esta proporción MACHO:HEMBRA de 43:57), es diferente de la esperada (1:1) ($P<0.05$).

En 57/343 (16,6%) de las muestras, el G-DNA fue negativo (G-DNA NEG). En este grupo solamente 8 resultaron Y-DNA positivo (8/57; 14%) y fueron diagnosticadas como MACHOS. El resto de las muestras (49/57; 86%) cuyo resultado fue de ambos primers negativos (G-DNA NEG; Y-DNA NEG) se clasificaron como de sexo no diagnosticado o desconocido.

Por lo tanto, de las 343 muestras corridas con los dos *primers* el sexo se pudo diagnosticar en 294 (85,7% de los casos). Las probabilidades de diagnóstico del G-DNA fueron mayores para aquellos blastocitos de mayor tamaño (67/70; 95,7%) que para blastocitos más pequeños (blastocitos tempranos) (79/103; 76,7%) (P<0.01) o blastocitos de tamaño intermedio (124/147; 84,4%) (P<0.05).

Con el Y-ADN solamente: el *primer* G-DNA no estuvo disponible durante parte de la temporada por lo cual 115 muestras se corrieron únicamente con el Y-DNA (115/458). Por esta razón la interpretación se basó únicamente en la presencia o ausencia del Y-DNA. Si el resultado del Y-DNA fue negativo el diagnóstico fue "POSIBLE HEMBRA". En cambio, si el resultado del Y-DNA fue positivo el diagnóstico fue de "MACHO". En este grupo de muestras el 36,5% (42/115) fue diagnosticado MACHO por la presencia de Y-DNA. Esta proporción también fue menor que la esperada (P<0.01) y no fue significativamente distinta de la proporción cuando el diagnóstico se realizó con ambos *primers* (131/343; 38,2%; P>0.1).

Reconfirmación del Diagnóstico de iiPCR

En total, el diagnóstico por iiPCR pudo re-confirmarse en 209 embriones. Esta confirmación se realizó mediante ecografía transrectal realizada ECO 60 en la totalidad de las HEMBRAS o POSIBLES HEMBRAS. En cambio, los embriones diagnosticados como MACHO fueron descartados en su mayoría. Solo algunos embriones MACHOS (SRY POS) fueron transferidos y utilizados para el diagnóstico confirmatorio.

En 168 de los 209 embriones que pudieron reconfirmarse, la iiPCR se realizó utilizando ambos *primers* y el diagnóstico se pudo realizar en 135 de las muestras. Estas preñeces fueron confirmadas por ecografía transrectal (ECO 60) y el resultado HEMBRA fue correcto en 78 de 97 casos (80,4%). En las biopsias que resultaron MACHO el diagnóstico fue correcto en 36 de 38 casos (94,7%). El diagnostico de MACHO mostró una tendencia a ser más certero que el diagnóstico de HEMBRA (P=0.06)

La proporción de embriones Y-DNA negativos que luego se confirmó por ECO 60 que eran HEMBRAS fue mayor en aquellos embriones diagnosticados solamente con el *primer* Y-ADN (90,3%) que cuando la iiPCR se realizó con los dos *primers* (74,6%; P<0.05).

En total, de los 171 embriones diagnosticados como HEMBRAS, POSIBLES HEMBRAS o con resultado desconocido que fueron evaluados por ECO 60, el 78,4% (134/171) fueron confirmados como HEMBRAS.

De 37 embriones que intencionalmente NO fueron biopsiados y quedaron como control y en los que ECO 60 fue realizado, 16 resultaron MACHOS y 21 HEMBRAS (56,8 % hembras) que no fue estadísticamente diferente de la relación esperada 1:1

Discusión

El resultado de este estudio demostró que la biopsia de embriones y el diagnóstico del sexo por medios moleculares puede ser realizada con éxito en un laboratorio bien equipado para reproducción asistida no solamente para embriones LOCALES producidos en el mismo centro de TE sino también embriones denominados VIAJEROS transportados en un sistema de temperatura controlada.

La micromanipulación y el procesamiento del embrión para realizar la biopsia no afectaron el porcentaje de preñez ni tampoco el porcentaje de reabsorciones o pérdidas fetales. La refrigeración y el transporte de los embriones tampoco afectaron la tasa de preñez siempre y cuando la biopsia se realizara antes de las 20 hs de la colección del embrión. El porcentaje de preñez general de 72,4% es comparable al logrado en Doña Pilar históricamente. Además tampoco difiere del logrado en embriones NO BIOPSIADOS en la misma temporada en la que se realizó este estudio. Una observación interesante fue que la temperatura de envío (registrada con la apertura del *container*) fue uno de los factores detectados que afectó el porcentaje de preñez. Aquellos embriones cuyos *containers* llegaron a una temperatura de 15 a 18 ºC tuvieron una mayor tasa de preñez y menor de reabsorción que aquellos que llegaron a 21 a 23 ºC. Incluso aquellos embriones que llegaron a temperaturas aún menores (12-14 ºC) se asociaron a un menor porcentaje de reabsorción. Esto probablemente se deba a que a menor temperatura el metabolismo del embrión es menor, lo cual mejora su viabilidad. El medio de transporte utilizado en este estudio (Syngro) contiene hyaluron que es un polisacárido que se utiliza en lugar del suero. Está reportado que las proteínas presentes en el suero son importantes para proteger el embrión de la refrigeración. Este es un detalle que deberíamos considerar en el futuro y reemplazar el medio de transporte por alguno que contenga suero fetal en su composición.

Otra conclusión interesante de este estudio es que la calidad de la biopsia (expresada por la presencia o ausencia de G-ADN) fue mayor en los blastocitos grandes y expandidos que en embriones más pequeños. Esto pareciera contradictorio porque es aparentemente más difícil la biopsia de los embriones grandes. Cuanto más grandes son los embriones, más difícil es sostenerlos en posición con la aguja de holding. Además, las células del trofoblasto están más agarradas entre sí lo cual dificulta su desprendimiento. También a medida que el embrión es de mayor tamaño la resistencia de la cápsula es mayor y esto puede dificultar su penetración. Pudimos sortear estas dificultades en base a prueba y error en trabajos preliminares realizados durante los últimos diez años.

Es notable que el porcentaje de preñez logrado tanto para embriones biopsiados como no biopsiados, no fue afectado por el tamaño del embrión. Esta observación también coincide con

trabajos preliminares realizados en nuestro laboratorio. Sin embargo debemos considerar que por tratarse de un programa comercial, los embriones muy pequeños en general no fueron biopsiados. Es preferible que los embriones se encuentren entre 400 y 800 micras de diámetro aproximadamente, lo cual facilita la presencia de ADN en la muestra. Para lograr este objetivo es importante revisar la yegua donante a intervalos no mayores a 24 horas. El embrión equino es de un crecimiento muy rápido y el "salteo" a una revisación cada 48 horas puede resultar en una amplia variabilidad de tamaño del embrión. Varios son los factores conocidos que afectan la velocidad de crecimiento del embrión (época del año, IA con semen fresco vs congelado, tiempo de capacitación espermática, ambiente uterino, sincronía de la receptora, edad de la donante, momento del servicio entre otros) y seguramente son muchos más los factores que aún NO conocemos. Por esta razón el momento del *flushing* para lograr embriones óptimos para la biopsia tiene todavía un poco de arte además de ciencia. Es práctica común sobre todo para aquellos profesionales que trabajan en forma ambulatoria que la revisación de las yeguas se realice cada 48 horas manejando inductores de ovulación. Si la intención es que los embriones sean biopsiados, esta práctica no es aconsejable ya que probablemente resulte en un rango muy amplio de tamaño.

Otro factor que hemos identificado como muy importante es la calidad del embrión. Existen algunos indicadores en la morfología del embrión que nos indican que han sufrido algún grado de stress. Este stress muchas veces lo vemos inmediatamente luego del *flushing* y probablemente es consecuencia de factores relacionados al ambiente uterino. En otras ocasiones, sobre todo cuando los embriones no son transferidos inmediatamente y particularmente si van a ser refrigerados, el procesamiento del embrión es un tema crucial. Temperatura y osmolaridad del medio de lavaje, temperatura de los materiales con que toma contacto el embrión, temperatura ambiente, temperatura y osmolaridad del medio de *holding*, platina térmica y por supuesto temperatura y acondicionamiento para el transporte tienen una importancia aún mayor que en aquellos embriones que no serán biopsiados. Algunos signos de stress que hemos visto en embriones refrigerados transportados son: embriones retraídos dentro de la cápsula (cápsulas arrugadas), capsulas rotas o rasgadas, opacidad, células extruídas. En general estos embriones son pobres candidatos a una biopsia exitosa y son transferidos sin biopsiar. En el análisis retrospectivo de nuestros registros observamos que estos embriones son de menor viabilidad y esta es menor aún si intentamos biopsiarlos. Es importante entonces en el caso de que los embriones sean refrigerados que se extremen las precauciones en el manejo y condiciones de transporte de los mismos.

Durante el procedimiento de biopsia del embrión existe un delicado equilibrio entre "invasión" y "viabilidad" del embrión. Defino como "invasión" el grado de esfuerzo o agresión

que realizamos para obtener células durante la biopsia. Sólo con experiencia podemos saber cual es ese delicado equilibrio. Teóricamente cuanto menos invasiva sea la biopsia menor debería ser el efecto sobre la viabilidad del embrión, pero mayores las probabilidades de que la biopsia no contenga el ADN suficiente para el diagnóstico. Para estudiar este tema comparamos el porcentaje de preñez logrado con embriones en los que obtuvimos una muestra satisfactoria (G-ADN POSITIVO) con los que no detectamos presencia de ADN (G-ADN NEGATIVO) y no observamos diferencia significativa entre estos grupos(73% y 76% respectivamente). Tampoco existió diferencia significativa entre embriones BIOPSIADOS (independientemente del resultado de la biopsia) y embriones NO BIOPSIADOS (72% vs 73%)

En este programa, el 86% de las biopsias en las que se realizó iiPCR con los dos *primers* (G-ADN y Y-ADN) proporcionaron un resultado que permitió el diagnóstico. En el 14% de las muestras no se diagnosticó la presencia de ninguno de los dos marcadores. Esto puede haber ocurrido por una o varias de las siguientes razones: deficiencia en la toma o procesamiento de la muestra, muestra insuficiente para la sensibilidad de la iiPCR, o a la presencia de inhibidores en la reacción de PCR. Si bien estos factores se han mejorado a lo largo de nuestro trabajo creemos que todavía pueden ser optimizados aumentando la sensibilidad de la iiPCR y mejorando la técnica de obtención y procesamiento de la muestra.

Encontramos un desvío en aquellas muestras con resultado Y-ADN NEG ya que el resultado en lugar de ser cercano al esperado de 50:50 (MACHO/HEMBRA) resultó 43:57. Esto sugiere que quizás el *primer* que detecta la presencia de Y-ADN no sea tan sensible como el que detecta el G-ADN, y que quizás esto sea más notable en aquellas muestras que contienen menor cantidad de ADN. Afortunadamente la dirección de este desvío no es grave para nosotros ya que lo que buscamos es producir HEMBRAS. Aquellas muestras que resultaron Y-ADN negativo pero que en realidad son MACHOS fueron detectadas posteriormente en la ECO 60.

Un hallazgo de difícil explicación en nuestro estudio fue que de 38 embriones Y-ADN POS que se transfirieron y luego se ecografiaron a los 60 dias de gestación, hubo 2 que en realidad resultaron ser HEMBRAS. No tenemos una explicación para ésto salvo suponer que se trató de algún tipo de contaminación de la muestra o de algún error humano en el registro. Mucho menos probable pero no por eso descartable podría ser el caso de *XY Sex Reversal* que aunque de muy baja incidencia está bien descripto en varias razas de caballos.

Otro hallazgo interesante fue en el grupo de muestras en las que solo se corrió el Y-ADN (n=115). Si el resultado del Y-ADN resultó negativo los embriones se diagnosticaron como POSIBLES HEMBRAS y los que el Y-ADN dio positivo el diagnóstico fue de MACHO y el embrión fue descartado. En el grupo de POSIBLES HEMBRAS el porcentaje de diagnóstico fue mucho

más alto. En este caso, el 90.2% de las muestras que fueron diagnosticadas como "posibles hembras" debido a la ausencia del Y-ADN fueron realmente hembras confirmadas en ECO60. Una posible explicación de estos resultados es que al correr un solo *primer* (Y-ADN) la totalidad de la muestra fue utilizada para ese *primer*, en cambio al correr los dos *primers* (G-ADN y Y-ADN) la muestra obtenida debía ser dividida en dos pudiendo haber comprometido la sensibilidad de la prueba. Sin embargo, la proporción de fallas en la detección del cromosoma Y fue similar en aquellas biopsias que se corrieron con los dos *primers* o con un solo *primer* (36,5% vs 38,4%). Este aspecto de la iiPCR debe ser revisado en el futuro ya que todo indica que el primer que detecta la presencia del cromosoma Y no es tan sensible como el que detecta la presencia de ADN genómico.

Para evaluar el real valor de esta técnica de BIOPSIA y PCR en nuestro programa comercial nosotros consideramos dos aspectos:

a) Saber si el sistema estaba asociado a la pérdida potencial de hembras mal diagnosticadas a la PCR.

b) Si el sistema permitía disminuir la cantidad de preñeces necesarias para producir una hembra.

Con respecto punto (a) de 458 embriones biopsiados y diagnosticados por PCR, el 62,2% (285/458) resultaron Y-ADN negativos y se clasificaron como HEMBRAS, POSIBLES HEMBRAS o SEXO DESCONOCIDO (dependiendo de la situación del G-ADN). De aquellos embriones que resultaron en preñez y estaban disponibles para su confirmación ecográfica de 60 días, 78,4% fueron realmente HEMBRAS. Esto nos indica que el 48,7% de los embriones biopsiados (62,2% X 78,4%) fueron realmente HEMBRAS. Si la relación MACHO/HEMBRA esperada fuera del 50% podríamos estimar que la pérdida de potenciales HEMBRAS por un diagnóstico erróneo sería de 1,3% de todas las preñeces (o 2,6% de las hembras potenciales).

Con respecto al punto (b), el número de preñeces HEMBRA y MACHO producidas luego de transferir los embriones Y-ADN negativos fue de 134 y 37 respectivamente. En el caso de hubiésemos querido producir 134 preñeces HEMBRA en un programa SIN BIOPSIAS, esto hubiera estado asociado a la producción de 134 MACHOS en una relación 1:1. Por lo tanto, podemos decir que la utilización de un sistema de biopsia y PCR redujo la cantidad de MACHOS de 134 a 37 lo cual significa una reducción de un 72%. Estos resultados indican que nuestro sistema fue efectivo para aumentar la eficiencia en la producción de preñeces HEMBRA en un programa comercial de transferencia de embriones.

Resumen

1) No hubo diferencia entre el % de preñez entre BIOPIADOS y NO-BIOPSIADOS (72% vs 73%)
2) No hubo diferencia entre los % de preñez entre embriones LOCALES o VIAJEROS (73% vs 72%).

3) El % de preñez fue menor cuando el intervalo *flushing* / Biopsia fue mayor a 20 horas.
4) El 86% de las muestras resultaron en un diagnóstico (MACHO, HEMBRA o POSIBLE HEMBRA).
5) Los embriones de mayor tamaño resultaron con mayor % de biopsias positivas (96%) que embriones de tamaño mediano o chico (70-85%).
6) El 38% de las muestras fueron Y-ADN positivas y se diagnosticaron como MACHOS.
7) El 95% de los Y-ADN positivos fueron confirmados como MACHOS por ecografía
8) El 78% de los Y-ADN negativos fueron confirmados como HEMBRAS.
9) La eficiencia de la predicción del sexo HEMBRA (Y-ADN negativo) fue mayor cuando la prueba se realizó con el Y-ADN solamente en lugar de dividir la muestra en dos para realizar los dos primers (G-ADN y Y-ADN).

Estimamos que transfiriendo solamente aquellos embriones Y-ADN NEGATIVOS perdimos un 3% de hembras pero logramos reducir la cantidad de machos en un 72%.

PRIMEROS CUIDADOS NEONATALES A CAMPO Y DERIVACIÓN DEL POTRO CRÍTICO

N. B. Pallarols Molinari

Centro de Rehabilitación y Hospital Equino Kawell

En determinados establecimientos los partos son asistidos y los primeros cuidados neonatales son realizados inmediatamente, pero en otro tipo de producciones los partos son a campo sin asistencia y los potros son controlados luego del nacimiento. Independientemente del lugar del nacimiento del potro, hay determinados cuidados que deberían realizarse para evitar posibles complicaciones.

Desinfección del ombligo

En el caso de asistir el parto, se realiza en el momento en que se secciona el cordón umbilical. Se sumerge el muñón umbilical en solución de iodo doble teniendo el cuidado de evitar el derrame de esta solución sobre otras partes del cuerpo, ya que puede ocasionar quemaduras. Se recomienda realizar curaciones periódicas 3 a 4 veces por día con solución de clorhexidina 0,5% durante las primeras 24 horas de nacido y luego controlar diariamente que no tenga calor, edema, dolor o secreción.

Enema

El meconio son las primeras heces del recién nacido y es el acúmulo de líquido amniótico digerido y detritus celulares acumulado en el intestino. La mayoría de los potrillos pasan el meconio alrededor de las primeras 4 horas de nacido. Si no estamos seguros de un correcto pasaje de meconio el uso profiláctico de enemas es recomendado a fin de estimular su paso y evitar su impactación.

Pesaje del potrillo

Es importante realizarlo si es posible desde el primer día, para poder relacionarlo con el peso de la placenta (en caso de poder evaluarla), también para ir monitoreando un buen crecimiento que debiese ser entre 1 - 1,5 kg (SPC), y además para dosificar la medicación en caso que se requiera. A campo se puede realizar con una cinta métrica, que se coloca alrededor del tórax en la parte más alta de la cruz, por detrás de los codos, y el resultado se eleva al cubo y se multiplica por 90.

TPR Temperatura-Pulso-Respiración

Es importante la toma de estos parámetros en las primeras 24 horas. Primero se debe observar al potro desde lejos a fin de evaluar su comportamiento. Un potro normal se debe poder parar y echar sin problemas, estar siempre atento y cercano a la madre, mamar

intermitentemente cada 1-2 horas y sin mucho esfuerzo con un buen reflejo de succión, ser curioso con el medio externo y activo. La temperatura debe estar entre 37,5 y 38,5 °C. La termorregulación puede estar alterada en los primeros días de vida en los potros, por lo cual tanto la hipotermia como la hipertermia, pueden estar asociadas a la baja o alta temperatura ambiental. Los potros severamente enfermos pueden presentar hipotermia que generalmente se asocia también a un pulso débil y un estado sensorio deprimido. La hipertermia está asociada a cuadros infecciosos, toxemia o dolor agudo. En los potros La FC debe estar entre 80 y 120 LPM y el pulso debe ser fácilmente identificable en las arterias metatarsiana, media y facial. En la primera semana se puede auscultar un soplo holosistólico asociado a la persistencia del conducto arterioso. En esta instancia también podremos evaluar anormalidades congénitas (paladar hendido, atresia anal, hernias, etc.).

Observación de la Placenta

En los partos a campo la mayoría de las veces no tenemos la posibilidad de controlar la placenta. En el caso de encontrarla muchas veces puede resultar difícil estimar el tiempo transcurrido desde el parto para poder saber si los cambios degenerativos de la misma se deben a la autólisis o a una patología placentaria, pero de todas formas se la puede pesar y su peso debe ser aproximadamente entre el 5 y el 10% del peso del potro. Un aumento de peso puede sugerir una placentitis o edema de placenta, un peso menor al 5% nos puede indicar una insuficiencia placentaria. Ambas condiciones pueden resultar en una insuficiencia placentaria que genere hipoxia perinatal.

Evaluación de la calidad de calostro

Los anticuerpos maternos se empiezan a concentrar en el calostro las últimas 2 semanas de gestación. El calostro se forma solo una vez y si este se va perdiendo, que es muy común en los casos de lactación prematura, será perjudicial para la inmunidad del neonato. Aunque el parto no sea controlado, si la yegua esta en fecha probable de parto con la ubre cargada se puede evaluar previo al parto para tener una estimación. Se puede utilizar un refractómetro de azúcares para evaluar más objetivamente la calidad (<20% mala calidad, 20-30% calidad adecuada y >30% muy buena calidad). Si la yegua no tiene calostro al momento del parto o éste es de mala calidad, debemos considerar pasar calostro de buena calidad por sondaje nasogástrico o directamente suministrar plasma endovenoso para evitar una falla de la transferencia pasiva.

Evaluación de la transferencia pasiva

La mayor absorción de calostro en el intestino delgado se lleva a cabo en las primeras 8 horas de vida, luego la absorción irá decreciendo hasta las 18-24 horas. Como objetivo para un potro sano debemos asegurarnos que haya recibido por lo menos 1 litro de calostro. La

protección contra enfermedades en las primeras 4-8 semanas de vida dependerán de esta transferencia pasiva de inmunoglobulinas a través del calostro. Ya a las 6 horas de haber mamado podemos encontrar pequeñas cantidades de IgG en el suero del potrillo, teniendo un pico alrededor de las 18 horas. Los niveles normales de IgG a las 18 horas deberán ser de 800 mg/dl o más, de lo contrario se considerará que hay una falla en la transferencia pasiva, esta puede ser parcial cuando se encuentra en un rango de 200 – 400 mg/dl de IgG y total cuando los valores caen por debajo de 200 mg/dl de IgG. Para la determinación de la concentración de IgG sérica existen varias pruebas y kits comerciales. Hay pruebas disponibles para realizar a campo como es el caso de la coagulación con glutaraldehído y el inmunoensayo entre las más comunes, y otras, como la electroforesis de proteínas, deben ser realizadas en un laboratorio de referencia pero son útiles al momento de necesitar una cuantificación más exacta de la concentración de IgG.

Identificación del Potro de Riesgo

Estos potros son aquellos que por distintos factores de riesgo podemos esperar que desarrollen complicaciones, las cuales muchas veces no pueden ser tratadas a campo por falta de infraestructura. Es importante como veterinarios detectarlos tempranamente para iniciar el tratamiento y, en caso de ser necesario, derivarlo a un centro de mayor complejidad para continuarlo. Los factores de riesgo los podemos dividir en: maternos, neonatales o ambientales (cuadro 1). Se considera un potro de bajo riesgo si no se identifican factores de riesgo maternales, neonatales ni ambientales, la gestación tuvo duración normal (ponis 320 – 345 días /pura sangre 320 - 360 días), el parto fue normal, los eventos post parto fueron normales (el potrillo se paró dentro de las 2 horas de vida, amamantó dentro de las 3 horas de vida y eliminó meconio dentro de las 4 horas), la placenta es normal a la vista y pesa menos del 10% del peso corporal del potro. En los partos a campo muchos de estos eventos no los podemos controlar, por lo cual la observación posterior del potro debe ser aún más minuciosa. Los potrillos de riesgo moderado son aquellos que tienen sólo un factor de riesgo maternal, ambiental o neonatal, pero de no ser tratados correctamente, pueden volverse de alto riesgo, por lo que el abordaje inicial es el mismo. Los potros de alto riesgo serán los que tienen más de un factor de riesgo.

MATERNOS	NEONATALES	AMBIENTALES
- **Distocia** - **Placenta Previa** - **Parto inducido** - **Cesárea** - **Gestación menor a 320 días** - **Placentitis** - Enfermedad o fiebre concurrentes - Intervención quirúrgica reciente - Stress por transporte - Lactación prematura - Agalactia - Claudicación o incoordinación crónicas - Gestación prolongada con potro muy grande - Uso prolongado de AINES - Parto previo distócico, cría séptica o isoeritrólisis	- Gemelos - Prematuridad o dismadurez - Muerte de la madre - Tincion con meconio - No pararse y amamantarse dentro de las primeras 3 horas de vida - Falla de la transferencia pasiva	- Zona de parto contaminada - Parto bajo condiciones de frio o humedad - Enfermedad infecciosa en el establecimiento

Cuadro 1. Factores de riesgo en potrillos.

Las características clínicas de los potros de alto riesgo pueden variar ampliamente, por eso es muy importante hacer una buena observación. Algunos son fácilmente reconocibles al momento del parto por la alteración de sus parámetros fisiológicos que algunas veces hasta requiere una intervención de urgencia debido a la presencia de apnea o bradicardia. Otro tipo de manifestaciones clínicas menos evidentes son los potros que tienen complicaciones al realizar funciones básicas como pararse, echarse, mamar o seguir a la madre. Suele ser común encontrarnos con potros que se duermen parados, que buscan mamar de manera errática o que necesitan asistencia para ponerse de pie. Es importante controlar las características físicas para evaluar si hay signos de inmadurez (pelo corto y sedoso, frente abovedada, orejas y labios blandos, bajo peso y laxitud de miembros).

A cualquier potro de moderado o alto riesgo está indicado realizarle análisis de laboratorio de rutina que al menos incluya hemograma completo, urea, creatinina, glucemia, lactato y hemocultivo. Hay otras mediciones muy útiles como AST, CK, Bilirrubina total e indirecta, Sodio, Cloro, Potasio, Calcio y gases arteriales, que en el caso de tener acceso a realizarlas pueden aportar datos muy importantes para el abordaje terapéutico del potro. Los valores normales para las pruebas de química clínica sanguínea y hematología son diferentes en los potros recién nacidos en comparación con los caballos adultos. Es importante comprender los parámetros normales del potro para la interpretación de los resultados de laboratorio. Por ejemplo, el potro normal de 24 horas debe tener una proporción de linfocitos neutrófilos de 2:1 poco después del nacimiento. Los potros prematuros tienen bajos niveles de neutrófilos y altos recuentos de linfocitos. La primera anormalidad en caso de septicemia son los cambios

tóxicos en los neutrófilos, seguido por el desarrollo de neutropenia y leucopenia. La hipoglucemia está asociada a sepsis severa, aunque potros que no estén mamando también puede tener bajos niveles de glucemia debido a la falta de ingesta de leche. La hiperglucemia en prematuros, por otro lado, generalmente se atribuye a la resistencia a la insulina pero también puede estar generada por stress o dolor. Respecto a la creatinina, valores aumentados en neonatos sugieren una insuficiencia placentaria y nos debe alertar de la posibilidad de desarrollo de encefalopatía hipóxica isquémica y/o sepsis. En base al resultado del hemograma y de la concentración de IgG debemos decidir el inicio de tratamiento antibiótico. La condición de los recién nacidos puede cambiar rápidamente en comparación con los caballos adultos. Los potros recién nacidos de moderado o alto riesgo necesitan observación frecuente para detectar nuevos problemas que puedan ocurrir rápidamente.

Atención del Potro Crítico

Luego de la observación y el control podemos reconocer un potro crítico que requiera de una primera estabilización para decidir de qué manera continuar con su tratamiento. Hay aspectos fundamentales dentro de la terapéutica que debemos contemplar:

Control de la Temperatura

Las fluctuaciones de la temperatura corporal en el recién nacido pueden causar problemas y el neonato es muy propenso a la hipotermia. Los potros pueden perder fácilmente temperatura por evaporación, conducción, radiación y convección, por lo cual es importante que se encuentren secos, sobre superficies aisladas del frío y lejos de ventanas o puertas que los expongan a corrientes de aire frío. Para el control de la hipotermia se pueden colocar botellas con agua caliente cubiertas con toallas sobre el potro, toallas húmedas dentro de guantes de tacto calentadas al microondas por 2 minutos, utilizar fluidos atemperados en caso de requerir fluidoterapia y caloventores para climatizar el ambiente. Pero debido a su déficit en la termorregulación también se puede provocar una hipertermia en caso de no controlar el calor suministrado o estar expuestos a altas temperaturas. Complicaciones en la sujeción en un potro indócil, convulsiones y dolor también pueden producir una hipertermia significativa (>39,5°). La hipertermia a veces es fácilmente controlada con baños de alcohol o de agua fría y colocándolos a la sombra. También se pueden utilizar antipiréticos como la dipirona o el megluminato de flunixin, pero se debe tener la precaución de controlar el estado de hidratación ya que al ser drogas nefrotóxicas podrían agravar una insuficiencia renal preexistente por hipoperfusión renal.

Ventilación

En el caso de disnea es importante proveer oxígeno por medio de una cánula intranasal a 5-10 lt/min. Se debe pasar la cánula por el meato ventral hasta la altura del canto medial del ojo,

para lo cual se puede medir y marcar previamente. Se puede fijar su posición suturándola al ollar o fijándola con un bajalenguas y una venda elástica al hocico. En el caso de estar lejos de un centro de referencia, tener a disposición un tanque de oxígeno portátil para la estabilización de un potro de riesgo es una medida que se debería tener en cuenta. Los potros disneicos o en decúbito deben mantenerse en posición esternal para minimizar la atelectasia pulmonar. Ante la presencia de bradipnea se puede utilizar un estimulante central como la cafeína por vía oral o intramuscular (10 mg/kg). También se puede usar el doxapram en bolo o en infusión continua, aunque su uso esta discutido debido a los efectos sobre el flujo sanguíneo cerebral que provoca un aumento en la demanda de oxígeno que puede ser perjudicial en un potro con mala circulación. En caso de un paro respiratorio es fundamental la colocación de un tubo endotraqueal y la ventilación manual ya que en el caso de no revertirlo rápidamente llevará a un paro cardíaco.

Fluídoterapia

Si el potro se encuentra deshidratado o se necesita mejorar su perfusión se pueden utilizar fluidos poliiónicos endovenosos. Se requiere de la cateterización para poder administrar el fluido de una manera segura. Es importante evaluar el grado de deshidratación para calcular el déficit de fluidos a reestablecer. El fluido de reanimación en potros críticos se puede dar a una dosis de 20 ml/kg (1 litro para un potro de 50 kg). Este bolo se puede repetir hasta 3 veces. La velocidad de infusión va a depender del grado de deshidratación y la urgencia de reposición de un adecuado volumen circulante, pero 1 litro no debería pasar en menos de 20 minutos.

El metabolismo de los carbohidratos se altera con la enfermedad neonatal y la hipoglucemia es un problema clínico. El potro nace con reservas muy bajas de glucógeno en el hígado, los músculos o el cerebro. La glucosa en sangre desciende rápidamente en las primeras 2 horas después del parto y se debe proporcionar una fuente de leche o energía al potro si no se amamanta a las 3 horas. Los valores normales de azúcar en sangre oscilan entre 80 mg/dl y 160 mg/dl después de la alimentación. El uso de dextrosa al 5% sola no es un fluido recomendado en neonatos porque la glucosa se metaboliza rápidamente y todo lo que queda es agua libre, lo que conduce a niveles más bajos de sodio en sangre. Lo recomendable es agregar 20 ml de una solución de dextrosa al 50% a cada litro de solución de Ringer lactato o electrolítica balanceada. Otra opción es realizar una solución de NaCl al 0,45% + dextrosa al 2,5%. Los fluidos con dextrosa no deben ser suministrados en bolo, la velocidad de infusión recomendada es de 2-4 ml/kg/h.

Independientemente de su función inmunológica, el plasma es un coloide muy útil en potros hipotensos por su capacidad de retener los fluidos dentro del lecho intravascular. Los

grandes volúmenes de cristaloides en potros críticos pueden generar edema que agraven el cuadro.

Antibióticoterapia

Las infecciones en el recién nacido a menudo implican infecciones mixtas con bacterias grampositivas y gramnegativas. Éstas últimas liberan endotoxinas que pueden desencadenar una cascada de eventos que conducen al SIRS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica) y shock séptico. La mortalidad es muy alta para la sepsis por gramnegativos en potros. La identificación y el tratamiento temprano son esenciales para un mejor pronóstico. Aquellos potros con síndrome de maladaptación neonatal, hipoxia al nacer, rotura de vejiga, problemas angulares de las extremidades que limitan la lactancia, diarrea y otras afecciones complejas pueden ir acompañados de sepsis. La cobertura con antibióticos es fundamental en estos casos. Los antibióticos y otros fármacos se absorben, metabolizan y excretan a diferentes velocidades en los recién nacidos, por lo que es importante utilizar dosis e intervalos que sean apropiados. Independientemente de haber realizado un hemocultivo, se inicia un tratamiento de amplio espectro hasta tener el resultado del mismo. La combinación de un beta-lactámico como la penicilina G sódica (15.000 UI/kg – 44.000 UI/kg cada 6 hs) y un aminoglucósido como la amikacina (22 mg/kg cada 24 hs) es la antibióticoterapia de primera elección. Si bien los aminoglucósidos generan nefrotoxicidad por acumulación, en el caso de insuficiencia renal severa, se puede iniciar directamente con una cefalosporina de tercera generación como el Ceftiofur (5 – 7,5 mg/kg cada 6 hs), pero lo ideal también es ampliar su espectro combinándola con amikacina cuando la función renal esté compensada. Cuando hay signos de sepsis es recomendable dar megluminato de flunixin (0,5 mg/kg) antes de la primera dosis de antibióticos para contrarrestar los efectos endotóxicos asociados a la muerte bacteriana.

Nutrición

Muchos potros críticamente enfermos dejan de mamar. Si bien la consecuente deshidratación generalmente es tratada con fluídoterapia, si el potro no comienza a mamar debemos evaluar la forma de continuar con su alimentación. En el caso de encontrarse hipotérmico e hipotenso es conveniente instaurar nutrición parenteral debido a que la hipoperfusión intestinal genera íleo que puede agravarse con la nutrición enteral provocando distensión gástrica y un posible desarrollo de una enterocolitis. Si el potro está estable pero no mama se puede colocar una sonda nasogástrica para su alimentación y comenzar a administrar leche. Es recomendable comenzar con el 7% del peso vivo distribuido en 12 tomas diarias (200 ml cada 2 horas para un potro de 50 kg) e ir aumentando progresivamente hasta llegar al 15% del peso del potro (600 ml cada 2 horas para un potro de 50 kg).

Control del Dolor

Es frecuente que potros de riesgo desarrollen dolor abdominal. En este caso como analgésico podemos utilizar diferentes drogas: meglumine de flunixin a 1,1 mg/kg EV, dipirona a 20 mg/kg EV, meloxicam a 0,6 mg/kg EV, butorfanol a 0,01 – 0,04 mg/kg EV o tramadol a 1 mg/kg EV. En el caso de estas últimas tenemos que evitar su uso repetido por la alteración en la motilidad gastrointestinal. El uso de drogas alfa 2 adrenérgicas se deben evitar por su efecto depresor sobre el sistema respiratorio, sobre todo en potros con la función respiratoria comprometida.

Control de Convulsiones

Para poder controlar y tratar eficientemente una convulsión, es importante saber el origen de la misma (hipoxia, trauma, metabólico, sepsis o desórdenes congénitos). Independientemente del origen de la convulsión el abordaje inmediato es el mismo. Se puede utilizar diazepam a 0,1-0,2 mg/kg (5 a 10 mg), midazolam 0,1 mg/kg EV y fenobarbital a 3-5 mg/kg EV. Se debe evitar la administración repetida de anticonvulsivos por lo cual, ante el tercer episodio consecutivo, debemos contemplar una asistencia permanente por medio de un goteo de infusión continua. Se puede utilizar un goteo de midazolam a 2 – 6 mg/hr/50 kg.

Derivación

Muchas veces nos vamos a ver en la situación de tener que decidir entre la derivación del potro o la asistencia en el lugar de origen. Hay situaciones en las que es fácil tomar la decisión ya sea porque no hay recaudos económicos debido al valor del potro o porque independientemente del estado del potro no tenemos opción de derivar. La situación más compleja es decidir cuáles son los casos que podemos controlar en el campo y cuáles van a requerir indefectiblemente un manejo hospitalario. Para tomar esta decisión podemos basarnos en los siguientes criterios: personal y equipamiento disponible en el campo, velocidad de deterioro de la condición clínica, valor del potro y distancia al centro de referencia. En el caso de derivar debemos considerar llevarlo separado de la madre y aislado del frío. El viaje suele ser sumamente estresante, por lo cual lo ideal es compensarlo antes de cargarlo o, si es posible, viajar junto al potro para mejor control. Si el viaje dura más de 2 horas debemos considerar hacer paradas para que el potro se pueda alimentar ya que no tienen reservas para no mamar por tiempos prolongados o que un asistente viaje con el potro para suministrar fluidos o leche por sonda. En el caso de no poder trasladar a la yegua, se puede ordeñar el calostro y enviarlo en una botella refrigerado para que se lo administren al momento del sondaje. La derivación temprana es un aspecto fundamental para el pronóstico de vida de un potro enfermo. Por esta razón debemos realizar evaluaciones periódicas

exhaustivas para no perder tiempo ya que generalmente los potros críticos empeoran muy rápido.

Bibliografia

Medical Management Practices for Critically Ill Foals in the Field, Bentz B.G., AAEP Annual Convention – Seattle, 2005

How to Stabilize a Critical Foal Prior to and During Referral, Wendy Vaala, VMD, DipACVIM, AAEP Annual Convention – 2000

Identification and Treatment of the High-Risk Foal, Robert P. Franklin, DVM Diplomate ACVIM, AAEP Annual convention - Orlando, Florida, 2007

Stabilization of the critically ill foal in the field, Siobhan McAuliffe MVB DACVIM, 12th International Congress of World Equine Veterinary Association (WEVA) 2011 - Hyderabad, India

McAuliffe, Siobhan B. – Slovis Nathan M. “Atlas color de enfermedades y alteraciones del potro”, Buenos Aires, Intermédica, 2010

Madigan J.E. and Toth B., “Manual of Equine Neonatal Medicine by Madigan J.E.”, 2017.

Michelle Henry Barton, DVM, PhD, Kelsey A. Hart, DVM, PhD; “Clinical Pathology in the Foal”, Vet Clin Equine 36 (2020) 73–85

SUPEROVULACIÓN, RECUPERACIÓN EMBRIONARIA Y PREÑEZ DE YEGUAS ANOVULATORIAS TRATADAS CON FSH EQUINA RECOMBINANTE (reFSH)

A. Mutto[4], J. F. Roser[1], M. V. Etcharren[2], M. H. Miragaya[3 4], M. Colgin[5], L. Losinno[2], P. J. Ross

[1] Dep. of Animal Science, University of California, USA. [2] Fac. De Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. [3] Fac. de Cs. Veterinarias, INITRA, Universidad de Buenos Aires, Argentina. [4] IIB, Universidad de San Martín, Argentina. [5] Aspen Bio Pharma Inc., Castle Rock, USA.

Introducción

Una de las mayores limitantes en la eficiencia en programas comerciales de transferencias embrionarias (TE) en equinos es, hasta el momento, la imposibilidad de contar con protocolos de estimulación folicular ("superovulación") eficaces y consistentes. El objetivo final es el de producir múltiples embriones viables por ciclo, incrementando así la eficiencia del proceso. Actualmente la tasa de éxito de la TE en una operación comercial se basa en el porcentaje de tasa de recuperación de embriones por ovulación (50-80%) multiplicado por el porcentaje de tasa de preñez por embrión transferido (50-80%). Por lo tanto, para un ciclo dado, hay un 25-64% de posibilidades de obtener una receptora preñada [1,5]. Existen varios factores que pueden afectar la recuperación del embrión, entre los más comunes podemos mencionar la edad de la yegua donante, la calidad del semen, el número de ovulaciones y el día de recuperación [2,6].Por otro lado, los factores que afectan la tasa de preñez son el manejo de las yeguas donantes y receptoras, la edad y estatus sanitario, calidad del embrión, sincronía de la yegua receptora, transporte y almacenamiento del embrión, técnicas manuales versus fórceps cervicales y experiencia del veterinario [2,4]. Los factores adicionales que han limitado el éxito de la TE son la estrecha ventana de tiempo para la reproducción (en animales en competencia y en temporada de reproducción) y la capacidad de superovular a la yegua.

A raíz de lo antes mencionado, algunos productores de caballos, en invierno utilizan luz artificial para comenzar antes el programa reproductivo, un momento en el que la mayoría de las yeguas no están ciclando. Históricamente, se ha utilizado la iluminación artificial para adelantar la primera ovulación del año o para mantener cíclicas a un grupo de receptoras [7,8]. Sin embargo, es una labor intensiva y costosa, y no siempre eficaz [9,10]. Por lo tanto, en los últimos 20 años se han utilizado fármacos, pero no han tenido un éxito constante [11]. Algunos de los compuestos utilizados han incluido hormona liberadora de gonadotropina nativa (GnRH), agonistas de GnRH (buserelina, deslorelina, goserelina), antagonistas de la dopamina (domperidona, sulpirida), progesterona, progestinas, prolactina y prostaglandinas [11]. Adicionalmente, el uso de estas drogas u hormonas presenta desventajas importantes para su aplicación en sistemas comerciales intensivos como la administración de múltiples inyecciones,

implantes, la necesidad de folículos de más de 20-25 mm de diámetro, escasa o ausencia de respuesta ovulatoria en yeguas en anestro profundo y/o retorno al anestro después del tratamiento [11]. Por otro lado, los extractos de hipófisis equina (EPE) y la FSH equina parcialmente purificada (NO recombinante) (Bioniche Animal Health, Athens, GA) han tenido una eficiencia inconsistente para inducir la superovulación en yeguas en anestro [12,13] y yeguas de transición [14,17], respectivamente. Adicionalmente, tanto el EPE como la FSH equina parcialmente purificada (NO recombinante) no están disponibles comercialmente. Por lo tanto, avanzar en el diseño de protocolos eficientes y consistentes en la inducción a la superovulación en los meses de anestro profundo sin utilización de luz artificial tiene el potencial de aumentar la producción de embriones y disminuir el costo de la transferencia.

En los últimos años, se ha demostrado que reFSH induce eficientemente la superovulación y resulta en altas tasas de preñez tanto en yeguas cíclicas como en anestro profundo [20,22]. La eFSH recombinante se desarrolló en una plataforma de cadena única y carece de otras hormonas y contaminantes [23,24]. Por otro lado, sabemos que la eFSH con tecnología recombinante puede estar disponible comercialmente en el futuro cercano.

Por lo expuesto anteriormente, nos propusimos hacer un estudio de consistencia y eficacia de un protocolo simple de superovulación en yeguas en anestro profundo a partir dela tasa de éxito del tratamiento estacional bajo luz ambiental natural con reFSH para inducir la superovulación seguida de la transferencia de embriones y preñez.

Resultados

Se consideró que todas las yeguas estaban en anestro profundo en función de la presencia de folículos <10 mm de diámetro, ausencia de CL en el examen por ultrasonido y concentraciones plasmáticas de progesterona <1 ng/ml durante tres exámenes semanales consecutivos. Se administró reFSH diariamente según los esquemas: 0,65 mg DD (Grupo 1), 1,3 mg SD (Grupo 2), 0,32 mg DD (Grupo 3) o solución salina (Grupo 4, control), los resultados se resumen en la tabla. Todas las yeguas que recibieron reFSH, respondieron al tratamiento con reclutamiento y desarrollo folicular alcanzando un tamaño ovulatorio (> 35 mm), excepto dos yeguas del grupo 3 que solo alcanzaron folículos de 20 y 25 mm de tamaño durante su período de tratamiento de 10 días. En promedio, se requirieron 6,5 días de tratamiento con reFSH para que las yeguas desarrollaran folículos de tamaño ovulatorio (> 35 mm). No hubo diferencia en el número de folículos de más de 35 mm de diámetro entre los grupos. Se observaron ovulaciones en el 80% de las yeguas de los Grupos 1 y 2, en el 50% de las yeguas del Grupo 3 y ninguna en el Grupo 4 (Control). Entre las yeguas que ovularon, no se observaron diferencias en el número de ovulaciones, el número de embriones recuperados o las tasas de preñez entre los tratamientos con reFSH. En conjunto, para las yeguas que producen al menos un embrión,

el número medio de embriones recuperados fue de 2,5 embriones / yegua, con 6 yeguas produciendo de 4 a 5 embriones en un solo lavado. Para los grupos 1, 2 y 3 las tasas de recuperación de embriones por yegua ovulada fueron 75% (6/8), 88% (7/8) y 100% (5/5), respectivamente. Las tasas de recuperación de embriones por ovulación fueron 37%, 47% y 45%, respectivamente. Considerando todas las yeguas que produjeron al menos un embrión, la tasa de recuperación de embriones por ovulación basada en el número de ovulaciones por yegua fue 59% para hasta 4 ovulaciones (n:7 yeguas), 75% para 5 a 6 ovulaciones (n:6 yeguas), y 27% para más de 6 ovulaciones (n:5 yeguas). Combinadas, las yeguas con 1-6 ovulaciones tuvieron una tasa de recuperación embrionaria del 69% (n:13 yeguas). En general, se logró una tasa de preñez del 59% con los embriones recolectados y transferidos durante la temporada de anestro.

Tabla. Ovulación y recuperación embrionaria de yeguas anovulatorias tratadas con reFSH.

	Grupo 1	**Grupo 2**	**Grupo 3**	**Grupo 4**
Dosis de reFSH	0,65mg DD	1,3mg SD	0,32mg DD	Control (S. Salina)
Días de tratamiento	5,.9 ± 0,6 [a]	7,1 ± 0,8 [a]	7,3 ± 0¿?	10 ± 0 [b]
Yeguas ovuladas	8/10	8/10	5/10	0/10
Folículos >35 mm	5,2 ± 0,9 [a]	6,4 ± 0,8 [a]	4,1 ± 1,0 [a]	0 ± 0 [b]
Ovulaciones por yegua	5,1 ± 1,0	5,5 ± 0,8	4,4 ± 0,9	-
Embrión recuperado por yegua	1,9 ± 0,5	2,6 ± 0,5	2,0 ± 0,4	-
Índice de recuperación embrionaria por yegua	75% (6/8)	88% (7/8)	100%(5/5)	-
Índice de recuperación embrionaria por ovulación	37%	47%	45%	-
Embriones transferidos	14	16	4	-
Índice de preñez por embrión transferido	57%	56%	75%	-

Valores indican media ± SEM. SD: simple dosis; DD: doble dosis
a, b: diferentes letras dentro de la misma fila indican $p < 0.05$.

Discusión

Este es el primer estudio que presenta la producción exitosa de embriones utilizando un protocolo con reFSH de yeguas donantes en anestro profundo. Todas las yeguas del ensayo en un fotoperíodo de invierno mostraron desarrollo folicular dentro de los 5-7 días posteriores al inicio del tratamiento.

La respuesta folicular y las tasas de ovulación para las dosis más altas (0,65 mg y 1,3 mg)

fueron similares a las informadas en estudios previos utilizando EPE [12,18,26] en yeguas en anestro bajo fotoperiodo natural o eFSH parcialmente purificada [14,15,27] en yeguas en transición. La respuesta folicular y las tasas de ovulación fueron numéricamente más bajas en las yeguas que recibieron una dosis menor de reFSH (0,32 mg DD), que es similar a lo que se informó para las yeguas tratadas durante la temporada de reproducción con 0,35 mg de reFSH DD [20]. Tomados en conjunto, estos estudios sugieren que 0,35 mg dos veces al día es insuficiente para inducir una respuesta folicular máxima. Además, el estudio de la temporada reproductiva indicó que 0,85 mg de reFSH DD resultó en una menor recuperación de embriones en comparación con 0,65 mg DD, lo que en combinación con los resultados actuales indica que una dosis diaria total de 1,3 mg de reFSH, administrada como una sola dosis inyectable o en dos dosis de 0,65 mg, es el nivel óptimo de reFSH para inducir el desarrollo folicular en las yeguas. Es importante tener en cuenta que dar 1,3 mg SD indujo el mayor número de ovulaciones (5,5), lo que sugiere que una sola administración de reFSH puede ser mejor que la administración dos veces al día.

Las ovulaciones inducidas en yeguas de anestro profundo dieron como resultado embriones viables, aunque el número de embriones recuperados fue considerablemente menor que el número de ovulaciones. En los estudios realizados durante la temporada de reproducción también se observó un número similar de folículos, ovulaciones y embriones recuperados después del tratamiento con reFSH [17,20,28,29].

Las tasas de recuperación de embriones / yegua ovulada en este estudio variaron de 75 a 100% dependiendo de la dosis de reFSH, que es más alta que lo que generalmente se informa para ciclos no estimulados, que van desde 50% a 70% de recuperación de embriones por ciclo [30]. En este estudio, varias yeguas produjeron 4-5 embriones en una sola oleada (n=6), lo que indica que las yeguas son capaces de ovular al menos dos ovocitos fértiles por ovario. Las tasas de recuperación de embriones fueron altas (75%) para las yeguas que ovulaban 5-6 folículos, lo que requiere que al menos un ovario se someta a un mínimo de 3 ovulaciones. Por otro lado, las yeguas con más de 6 ovulaciones presentaron tasas de recuperación de embriones muy disminuidas, lo que sugiere que más de 3 ovulaciones por ovario pueden ser perjudiciales para la deposición de ovocitos en el oviducto [30, 31, 32, 33]. Carmo *et al.* [34] describen que la fosa de ovulación en las yeguas superovuladas tenía grandes cantidades de sangre coagulada que no se observó en las yeguas de control, y concluyeron que una hemorragia excesiva en los ovarios de ovulación múltiple podría estar involucrada en la falla de los ovocitos para ingresar al oviducto. Por otro lado, es interesante notar que cuando se agregó LH al tratamiento, hubo un aumento en la recuperación del embrión por ovulación. Meyers-Brown informó que la recuperación después del tratamiento con reFSH / reLH fue del 83% en comparación con el

66% en las yeguas cíclicas tratadas con reFSH solo [29]. Se desconoce el efecto de la LH sobre la fosa de ovulación, pero puede mejorar el desarrollo y la maduración de los ovocitos [29]. Algunas de las variaciones en las tasas de recuperación pueden depender de si las ovulaciones fueron de un ovario o de ambos. Las ovulaciones bilaterales pueden resultar una mejor condición para el escape de los ovocitos a través de ambas fosas de ovulación, lo que resulta en una mayor recuperación de embriones por ovulación. No se ha abordado el efecto del desarrollo folicular múltiple y ovulaciones múltiples sobre la tasa de fertilización, la calidad de los ovocitos y el desarrollo embrionario temprano, pero dado el entorno hormonal alterado resultante de múltiples folículos / cuerpo lúteo, es posible que estos eventos se vean afectados.

Las tasas de preñez en las yeguas receptoras también son bastante variables según el estudio realizado por Jacob *et al.* (2012), en el que las yeguas donantes no recibieron ningún agente estimulante y las tasas de preñez promedio para las yeguas receptoras (transferencia no quirúrgica) entre los días 1 y 3 fue del 69% [35]. La tasa media de preñez de las yeguas receptoras que utilizaron la técnica de Wilsher (espéculo vaginal y pinzas de agarre cervical) fue del 92,3% frente al 70,9% de la técnica convencional [4,36]. Las tasas de preñez en el presente estudio fueron del 56 al 75% dependiendo de la dosis de reFSH recibida. Tanto las tasas de recuperación como las tasas de preñez fueron bastante aceptables considerando la época del año en que se llevó a cabo este estudio. Los ovarios de yeguas en anestro profundo estaban inactivos con folículos de 10 mm de diámetro antes del inicio del tratamiento. Poder estimular el ovario en 6-7 días es notable. Además, se transfirieron 14-16 embriones de yeguas superovuladas en comparación con 0 en los controles, esto demuestra un avance muy importante donde se logra producir potrillos en los meses de inactividad reproductiva.

Conclusión

Estos resultados indican que el tratamiento con reFSH durante el anestro profundo da como resultado el desarrollo folicular, la ovulación de ovocitos fértiles y la producción de embriones que establecieron preñeces viables después de la transferencia. Además, una sola administración diaria de reFSH fue tan eficaz como dos administraciones diarias, lo que permite un régimen de administración simplificado.

Agradecimientos

A La Irenita Embriones, especialmente al Dr Jorge McDonough y Dr Sebastian Bereterbide.

AspenBio Pharma por proveer reFSH utilizada en este estudio.

Bibliografía

[1] Squires EL, Carnevale EM, McCue PM, Bruemmer JE. Embryo technologies in the horse. Theriogenology 2003;59:151e70. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01268-2.

[2] Squires EL, McCue PM, Vanderwall D. The current status of equine embryo transfer. Theriogenology 1999;51:91e104.

[3] Stout TAE. Equine embryo transfer: review of developing potential. Equine Vet J 2006;38:467e78. https://doi.org/10.2746/042516406778400529.

[4] Cuervo-Arango J, Claes AN, Stout TA. Effect of embryo transfer technique on the likelihood of pregnancy in the mare: a comparison of conventional andWilsher's forceps-assisted transfer. Vet Rec 2018;183. https://doi.org/10.1136/vr.104808. 323e323.

[5] Panarace M, Pellegrini RO, Basualdo MO, Bel_e M, Ursino DA, Cisterna R, et al. First field results on the use of stallion sex-sorted semen in a large-scale embryo transfer program. Theriogenology 2014;81:520e5. https://doi.org/ 10.1016/j.theriogenology.2013.10.021.

[6] Panzani D, Rota A, Marmorini P, Vannozzi I, Camillo F. Retrospective study of factors affecting multiple ovulations, embryo recovery, quality, and diameter in a commercial equine embryo transfer program. Theriogenology 2014;82: 807e14. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.06.020.

[7] Burkhardt J. Transition from anoestrus in the mare and the effects of artificial lighting. J Agric Sci 1947;37:64e8. https://doi.org/10.1017/S0021859600013083.

[8] Palmer E, Driancourt MA, Ortavant R. Photoperiodic stimulation of the mare during winter anoestrus. J Reprod Fertil Suppl 1982;32:275e82.

[9] Scraba ST, Ginther OJ. Effects of lighting programs on onset of the ovulatory season in mares. Theriogenology 1985;24:667e79.

[10] Ginther OJ. Anovulatory season. In: Ginther OJ, editor. Reprod. Biol. Mare. second ed. Cross Plains, WI: Equiservices; 1992. p. 136e72.

[11] McCue PM, Logan NL, Magee C. Management of the transition period: hormone therapy. Equine Vet Educ 2007;19:215e21. https://doi.org/10.2746/ 095777307X187793.

[12] Lapin DR, Ginther OJ. Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with an equine pituitary extract. J Anim Sci 1977;44:834e42. https://doi.org/10.2527/jas1977.445834x.

[13] Coy RE, McCue PM, Bruemmer JE, Squires EL. Follicular response in mares in deep or transitional anestrus to equine pituitary extract. Proc Equine NutrPhysiol Symp 1999;16:65e8.

[14] Niswender KD, Mccue PM, Squires EL. Effect of purified equine folliclestimulating hormone on follicular development. J Equine Vet Sci 2004;24: 37e9. https://doi.org/10.1016/jevs.2003.12.011.

[15] Peres KR, Fernandes CB, Alvarenga MA, Landim-Alvarenga FC. Effect of eFSH on ovarian cyclicity and embryo production of mares in spring transitional phase. J Equine Vet Sci 2007;27:176e80. https://doi.org/10.1016/ j.jevs.2007.02.009.

[16] Raz T, Hunter B, Carley S, Card C. Reproductive performance of donor mare subsequent to eFSH treatment in early vernal transition: comparison between the first, second, and mid-season estrous cycles of the breeding season. Anim Reprod Sci 2009;116:107e18. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.12.008.

[17] Raz T, Amorim MD, Stover BC, Card CE. Ovulation, pregnancy rate and early embryonic development in vernal transitional mares treated with equine- or porcine-FSH. Reprod Domest Anim 2010;45:287e94. https://doi.org/10.1111/ j.1439-0531.2008.01296.x.

[18] Woods GL, Ginther OJ. Ovarian response, pregnancy rate, and incidence of multiple fetuses in mares treated with an equine pituitary extract. J ReprodFertil Suppl 1982;32:415e21.

[19] Woods GL, Ginther OJ. Intrauterine embryo reduction in the mare. Theriogenology 1983;20:699e706.

[20] Meyers-Brown GA, McCue PM, Niswender KD, Squires EL, DeLuca CA, Bidstrup LA, et al. Superovulation in mares using recombinant equine follicle stimulating hormone: ovulation rates, embryo retrieval, and hormone profiles. J Equine Vet Sci 2010;30:560e8. https://doi.org/10.1016/ j.jevs.2010.09.007.

[21] Meyers-Brown GA, McCue PM, Troedsson MHT, Klein C, Zent W, Ferris RA, et al. Induction of ovulation in seasonally anestrous mares under ambient lights using recombinant equine FSH (reFSH). Theriogenology 2013;80: 456e62. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.029.

[22] Meyers-Brown GA, Loud MC, Hyland JC, Roser JF. Deep anestrous mares under natural photoperiod treated with recombinant equine FSH (reFSH) and LH (reLH) have fertile ovulations and become pregnant. Theriogenology 2017;98: 108e15. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.05.001.

[23] Jennings MW, Boime I, Daphna-Iken D, Jablonka-Shariff A, Conley AJ, Colgin M, et al. The efficacy of recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH) to promote follicular growth in mares using a follicular suppression model. Anim Reprod Sci 2009;116:291e307. https://doi.org/ 10.1016/j.anireprosci.2009.01.013.

[24] Jablonka-Shariff A, Roser JF, Bousfield GR, Wolfe MW, Sibley LE, Colgin M,et al. Expression and bioactivity of a single chain recombinant equine luteinizing hormone (reLH). Theriogenology 2007;67:311e20. https://doi.org/ 10.1016/j.theriogenology.2006.06.013.

[25] McKinnon AO, Squires EL. Morphological assessment of the equine embryo. J Am Vet Med Assoc 1988;192:401e6.

[26] Douglas RH, Nuti L, Ginther OJ. Induction of ovulation and multiple ovulation in seasonally-anovulatory mares with equine pituitary fractions. Theriogenology 1974;2:133e42. https://doi.org/10.1016/0093-691X(74)90063-6.

[27] Raz T, Gray A, Hunter B, Card C. Early effects of equine FSH (eFSH) treatment on hormonal and reproductive parameters in mares intended to carry their own pregnancy. Anim Reprod Sci 2009;115:76e87. https://doi.org/10.1016/ j.anireprosci.2008.11.001.

[28] Raz T, Carley S, Card C. Comparison of the effects of eFSH and deslorelin treatment regimes on ovarian stimulation and embryo production of donor mares in early vernal transition. Theriogenology 2009;71:1358e66. https:// doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.048.

[29] Meyers-Brown G, Bidstrup LA, Famula TR, Colgin M, Roser JF. Treatment with recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH) followed by recombinantequine luteinizing hormone (reLH) increases embryo recovery in superovulated mares. Anim Reprod Sci 2011;128:52e9. https://doi.org/ 10.1016/j.anireprosci.2011.09.002.

[30] Squires EL. Breakthroughs in equine embryo cryopreservation. Vet Clin N Am Equine Pract 2016;32:415e24. https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.07.009.

[31] Niswender KD, Alvarenga MA, McCue PM, Hardy QP, Squires EL. Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). J Equine Vet Sci 2003;23:497e500. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2003.10.002.

[32] Logan NL, McCue PM, Alonso MA, Squires EL. Evaluation of three equine FSH superovulation protocols in mares. Anim Reprod Sci 2007;102:48e55. https:// doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.09.027.

[33] Allen W. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. Reprod Domest Anim 2005;40:310e29. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2005.00602.x.

[34] Carmo MT, Losinno L, Aquilar JJ, Araujo GHM. Oocyte transport to the oviduct of superovulated mares. Anim Reprod Sci 2006;94:337e9. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.080.

[35] Jacob JCF, Haag KT, Santos GO, Oliveira JP, Gastal MO, Gastal EL. Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. Theriogenology 2012;77:1159e66. https:// doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.022.

[36] Raz T, Green G, Carley S, Card C. Folliculogenesis, embryo parameters and post-transfer recipient pregnancy rate following equine follicle-stimulatinghormone (eFSH) treatment in cycling donor mares. Aust Vet J 2011;89: 138e42. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2011.00691.x.

.

AVANCES EN CLONACIÓN, EDICIÓN GÉNICA Y REVERSIÓN DE SEXO EN EQUINOS

M. Suvá[1], V. Arnold[1], E. Wiedenman[1], J. I. Bastón[1], M. Martínez[2], B. Ortiz[1], L. Moro[3], G. Vichera[1]

[1] KHEIRON Biotech S.A, Pilar, Bs As, Argentina [2] Laboratorio de Genética Aplicada, Sociedad Rural, Argentina
[3] Lian, FLENI, Escobar, Bs As, Argentina

Clonación y células madre

La clonación por transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) es una biotecnología de reproducción asexual, disponible comercialmente para programas de reproducción en equinos. El objetivo principal es multiplicar genética de *elite*, obteniendo varios individuos idénticos. También es utilizado para reintroducir en programas reproductivos la genética de animales muertos o infértiles. Sin embargo, a pesar de la cantidad de caballos nacidos, en muchos casos la técnica continúa siendo poco eficiente. La eficiencia del procedimiento está fuertemente relacionada con la capacidad de reprogramación de las células donantes de núcleo a un estado totipotencial, regulado por el ovocito receptor. Por esta razón, la plasticidad celular es crucial para garantizar la progresión del desarrollo embrionario y permitir el nacimiento de descendencia viable por esta técnica. En el equino, una reprogramación nuclear ineficiente con frecuencia lleva a anomalías asociadas a flexuras en extremidades, cordón umbilical agrandado y anomalías en la placenta. Las células madre mesenquimales (Msc) son células que han demostrado su multipotencia tanto *in vitro* como *in vivo*. En el presente estudio, se evaluó la eficacia de Msc derivadas de médula ósea (MO-Msc) como donantes de núcleo en el procedimiento de clonación equina y se comparó el desarrollo *in vivo* y presencia de anomalías anatómicas de los nacidos respecto a clones generados con fibroblastos adultos (FA). Como grupo control, se utilizaron preñeces generadas por inseminación artificial (IA) y posterior transferencia embrionaria. Todas las variables se analizaron mediante la prueba de Fisher ($p < 0,05$). En el grupo Mo-Msc se obtuvieron 37 preñeces de las cuales 21 llegaron a término (56,8%), en el grupo FA se obtuvieron 41 preñeces y 17 nacimientos a término (41,5%), mientras que el grupo control de IA resultó en 71 preñeces y 64 a término (90,1%). Estos resultados muestran que ambos grupos de clonación alcanzaron tasas similares de partos, aunque con mayores tasas de crías viables en el grupo Mo-Msc (20/21, 95,2 %) y en el grupo IA (63/64, 98,4 %) que en el grupo FA (9/17, 52,9 %). Los clones generados con FA mostraron más complicaciones clínicas y defectos anatómicos y sólo 4/9 (44,4%) se consideraron normales. Los defectos presentes en los otros 5 nacidos viables de FA se relacionaron con defectos de flexión, miembro angular y malformaciones del cordón umbilical, mientras que ninguno de los potros nacidos vivos del grupo Mo-MSC tenía este tipo de defecto. Este estudio muestra que

las Mo-Msc pueden ser utilizadas de forma eficaz como donantes de núcleo en procedimientos de clonación en equinos y que los animales obtenidos son tan sanos como los producidos por IA, ya que se minimizan las anormalidades relacionadas con deficiencias en la reprogramación nuclear.

Clonación y edición génica

La tecnología de clonación puede tener ventajas muy importantes si se utiliza en combinación con la tecnología de edición génica, ya que permitiría obtener caballos con el trasfondo genético del individuo original, pero incorporando nuevas características deseadas en una única generación y de forma no aleatoria. El principal interés en los caballos editados genéticamente se centra en la resistencia a enfermedades, la reversión de enfermedades genéticas y la mejora del rendimiento deportivo. Un gen de gran interés es la miostatina (MSTN), un regulador negativo del desarrollo de la masa muscular. Aquí, nuestro objetivo fue eliminar la expresión del gen *mstn*, utilizando el sistema CRISPR/Cas9 y generar por primera vez embriones equinos editados genéticamente. Para ello se nucleofectaron fibroblastos fetales (FF) de caballo con 1, 2 o 5 µg de plásmidos con la secuencia de alguno de dos gRNA diferentes (sgRNA1 y sgRNA2) dirigidos al primer exón del gen *mstn*. Una vez que los gRNA y Cas9 se incorporaron a las células, fue necesario identificar aquellas en las que se haya inducido la edición en el sitio blanco. Para ello, se aislaron células individuales, se expandieron y se lisaron para obtener el ADN genómico a partir del cual se genotipificó el exon 1 del gen de la *mstn* mediante su amplificación por PCR y posterior secuenciación por el método de Sanger. Se observó que el aumento de las concentraciones de plásmido mejora la eficiencia de la edición, siendo de 63,6% para el gRNA1 (14/22 líneas celulares clonales editadas) y de 96,2% para el gRNA2 (25/26 líneas celulares clonales editadas). A partir de estos resultados, se seleccionaron tres líneas celulares clonales para generación de embriones por SCNT, que resultaron en las siguientes tasas de desarrollo embrionario: 3/153 (2%; edición monoalélica), 3/155 (2%; edición bialélica heterocigota) y 3/159 (2%; edición homocigota bialélica) que generaron blastocistos editados en todos los casos. Además, se utilizaron como controles líneas sin editar de FF (8/140; 6%) y células Msc (9/73; 12%). Las tasas de desarrollo más bajas que mostraron las células editadas como donantes nucleares probablemente se deban al mayor número de pasajes celulares necesarios para el aislamiento y la expansión de la línea celular. En resumen, nuestro trabajo demuestra que es posible editar fibroblastos equinos por CRISPR/Cas9 con alta eficiencia y especificidad, generando por primera vez embriones equinos editados genéticamente en estadío de blastocisto por SCNT. Nuestro objetivo a largo plazo es identificar secuencias de alelos naturales beneficiosas que se encuentren presentes en el

genoma de algunos individuos e incorporarlas en otros para dotarlos de esas características equinas deseadas.

Clonación y reversión de sexo

A pesar de que los animales obtenidos por SCNT contienen el mismo material genético que el donante original, en algunas especies se ha reportado el nacimiento de hembras a partir de donantes nucleares macho. Esto puede deberse a una pérdida espontánea del cromosoma Y, o una reprogramación nuclear incorrecta que resulta en una hipermetilación y el consecuente silenciamiento en regiones clave del cromosoma Y. En este trabajo, reportamos por primera vez en equinos un caso de nacimiento de una hembra clonada a partir de un donante nuclear macho. Se transfirieron 16 blastocistos obtenidos de un único procedimiento de SCNT a 8 receptoras, lo que resultó en 3 preñeces (37,5%) y el nacimiento de dos clones (25%): un macho y una hembra. En primer lugar, se realizó una genotipificación de ambos animales con un panel de 15 marcadores específicos de equinos para determinar que efectivamente tuvieran el mismo *background* genético. Para el caso de la hembra, se analizó una muestra de pelo y otra de sangre para descartar un posible mosaicismo. Los perfiles idénticos obtenidos para cada muestra de cada animal confirmaron que son clones derivados del mismo donante. A continuación, se realizó un análisis citogenético (Giemsa convencional, Bandas C y Bandas G) de muestras de fibroblasto (n=30) y sangre (n=50) de las crías y de la muestra de células Msc donantes (n=30). Las Msc y la cría macho mostraron el complemento cromosómico esperado: 64, XY. Por otro lado, la hembra mostró 63 cromosomas totales, con presencia de un único cromosoma sexual X. Para corroborar estos resultados, se realizó un análisis genético de las crías con un panel de marcadores específicos de cromosomas sexuales. El macho mostró presencia de marcadores tanto del X como del Y, mientras que la hembra mostró únicamente presencia de marcadores asociados al cromosoma X. Estos resultados muestran, por primera vez en equinos clonados, que el cambio en el sexo de la cría obtenida por SCNT es consecuencia de una pérdida espontánea del cromosoma Y, que resultó en una hembra 63, X0. Aunque la modificación del sexo en este reporte haya ocurrido de manera espontánea, en otras especies ha sido inducida con éxito mediante diferentes estrategias de biología molecular. Alternativamente, podría inducirse la inestabilidad y posterior pérdida cromosómica en el cultivo de células donantes, y mediante multiplicación clonal identificar y replicar aquellas colonias X0. A pesar de que aún no se conoce la causa de la pérdida del cromosoma Y presentado en este trabajo, el caso merece especial atención ya que la posibilidad de modificar el sexo por SCNT en equinos tiene un gran potencial para la preservación de especies en peligro de extinción, para programas reproductivos y para aplicación en el deporte.

IMPACTO DE LA BIOTECNOLOGIA EN LA CRIA DE CABALLOS DE POLO

S. Ballester

Presidente de la Asociación Argentina de Criadores de Caballos de Polo (AACCP)

CRÍA POLO ARGENTINO

1-BREVE HISTORIA DE LA CRÍA EN ARGENTINA.

Comienzos - un poco de historia

En la Argentina se comenzó a jugar al Polo alrededor de 1870. Los primeros caballos que utilizaron eran criollos, originalmente ingresados por la conquista española, adaptados a nuestras tierras. Estos caballos criollos eran animales muy rústicos, rápidamente comenzaron a mestizarlos con padrillos de origen Pura Sangre Inglés, dando origen a los que se llamó "Polo Pony", una cruza que conservó las características del criollo, pero dándoles una mayor calidad, velocidad y sensibilidad.

Con esa cruza, ya en los primeros años del siglo XX se comenzaron a exportar caballos jugadores a Inglaterra y a EE.UU. La Argentina se consolidó como potencia a nivel deportivo del Polo, y también de la cría de caballos para ese deporte. Liderazgo que mantiene hasta el día de hoy.

La cría del caballo de polo tiene ya en Argentina más de 150 años, pero durante los primeros 100 años no hubo registros oficiales de cría. O sea que el éxito de nuestra Raza Polo Argentino se viene gestando hace 150 años, con el mejor Polo, los mejores jugadores y la formación de la Raza de los mejores caballos para polo.

2-FUNDACION DE LA AACCP 1984. ESTATUTOS Y PRINCIPIOS.

Recién en 1984 y por iniciativa de Alberto Pedro y Horacio Heguy, se convoca a criadores y jugadores para fundar la Asociación Argentina de Criadores de Caballos de Polo. Con esta entidad se quería promover la cría, instruir y asesorar a los criadores e incorporar una masa crítica de madres y padrillos para formar un registro de pedigree, lo que hoy llamamos ***Raza Polo Argentino***, llevando los Registros Genealógicos en la Sociedad Rural Argentina.

La Raza incipiente contó con dos conceptos que al día de hoy fueron causa y motivo para el éxito. Primero la selección por **APTITUD**, buscar **el mejor caballo de Polo**, sin ataduras rígidas a tipo o medidas estrictas. Como segundo principio fue el artículo 2, inciso H de nuestro estatuto.

ARTÍCULO 2, INCISO H: una puerta abierta al mejoramiento.

h) Promover la investigación y la práctica de la inseminación artificial, el trasplante embrionario y toda otra técnica de mejoramiento.

Sin duda hoy, esos dos conceptos **transgresores** encaminaron la raza al éxito.

Finalmente esto desembocó en la Raza Argentina con mayor visibilidad en el mundo, por cantidad y calidad de los caballos, por otra parte hoy sabemos que es la única raza equina seleccionada específicamente para el Polo.

El Dr. Heguy destacó que la principal característica de raza del caballo de Polo es su **APTITUD**, y en un segundo plano su **TIPO**, y a su vez esté subordinado a la aptitud.

Entre las características de **APTITUD** propias al caballo de Polo se destacan:

-SENSIBILIDAD Y FORTALEZA.

-VIVEZA Y SERENIDAD.

-VELOCIDAD Y RESISTENCIA

Como podrán observar, todas estas "virtudes" solicitadas a un caballo son CONTRAPUESTAS y de allí el desafío que presentan para el criador. Afortunadamente esas características contrapuestas son heredables y de allí la utilidad de la tarea que desarrolla la AACCP y los logros de la raza POLO ARGENTINO. Estos logros se han visto además potenciados por la transferencia embrionaria que permitió multiplicar la genética virtuosa, como veremos a continuación.

En cuanto a las caracteres físicos del Polo Argentino, al **TIPO** podemos decir que es un caballo mediano, con muy buena musculatura en su estructura aunque equilibrado; miembros con buen hueso; buen tórax, dándole capacidad respiratoria, con una acción pegada al piso. Aplomos correctos dándole una buena base de sustentación. No se habla de límites de alzada, máxima y mínima. Si, en cambio, de un animal equilibrado, armonioso y deportivo.

Otra importante característica de nuestro Polo Argentino es que es una **RAZA ABIERTA**, ya que seguimos y seguiremos seleccionando por aptitud. De esa manera siempre se incorporan yeguas jugadoras que mejoren nuestra raza, independientemente del origen, aunque es cierto que la mayoría provienen del SPC.

3-LA PRIMERA REVOLUCION: TRANSFERENCIA EMBRIONARIA.

Durante 1989, se comenzaron a utilizar las técnicas de Inseminación Artificial y de Transferencia Embrionaria en la cría de caballos de Polo. Estas técnicas fueron perfeccionándose, sobre todo en los primeros años, y hoy también siguen progresando.

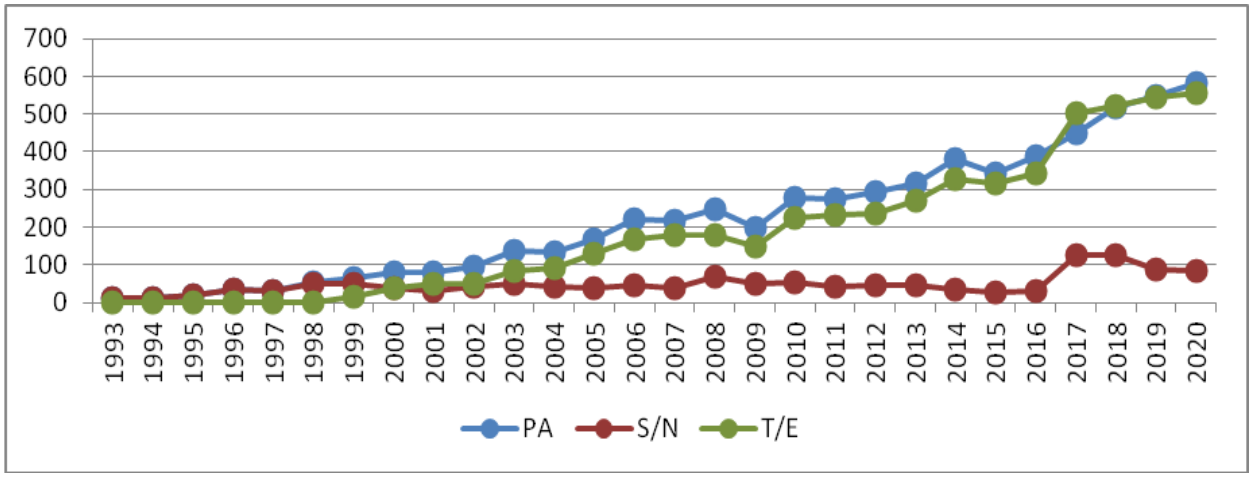
Se comenzó a observar rápidamente las ventajas del sistema. Se logran mayor cantidad de crías por yegua, por año; se abre la posibilidad de obtener potrillos de yeguas todavía en actividad deportiva y se evita la pérdida de genética por la exportación de jugadoras. Con el

trasplante embrionario se genera una ***presión de selección muy intensa***, y se obtiene una ***mayor cantidad de crías de las mejores yeguas y padrillos*.**

Es así que rápidamente se comenzaron a ver resultados positivos, apareciendo en forma creciente y exponencial mayor cantidad de crías por transferencia embrionaria en nuestras principales competencias deportivas: los Abiertos de Tortugas, Hurlingham, y Palermo (torneo más importante del mundo) y los torneos más importantes en el exterior: en EE.UU. Gold Cup, US Open, y en UK Queen´s Cup y Gold Cup, como en los principales torneos de España, Francia, Dubai, donde usualmente son premiados los Polo Argentino que allí juegan.

Evolución de los productos nacidos por Transferencia Embrionaria en el Campeonato Argentino Abierto

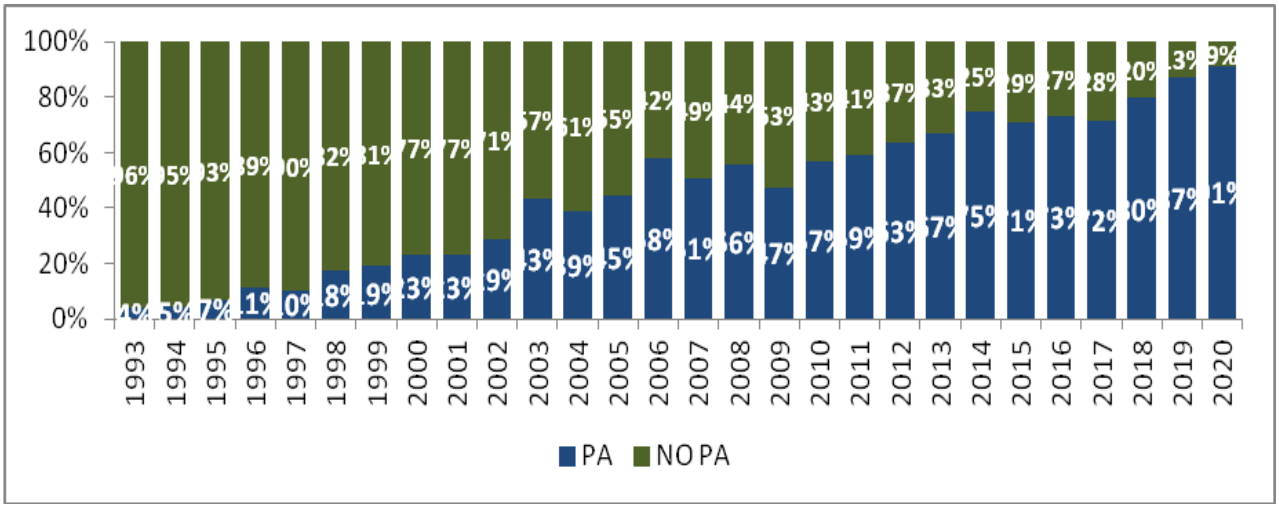
Hoy en día midiendo las cantidades y porcentajes de caballos que aparecen en las listas de Tortugas, Hurlingham y Palermo, en los cinco equipos principales los productos que juegan, producidos por transferencia embrionaria, superan el 90% del total.



En este primer cuadro observamos la evolución de los productos Polo Argentino en el Campeonato Argentino Abierto desde 1993 hasta 2020, notando un crecimiento constante en productos de la Raza. Como segunda observación y pegado a nuestro crecimiento, notamos la evolución de lo producido por transferencia embrionaria, respecto al servicio natural. Consolidando el uso de las herramientas biotecnológicas, con el éxito obtenido, en el 2020 el 91 % eran productos de Transferencia Embrionaria.

AÑO	PA	S/N	T/E	TOTAL	% PA/TOT
1993	12	12	0	288	4%
1994	13	13	0	288	5%
1995	20	20	0	296	7%
1996	33	33	0	288	11%
1997	30	29	1	293	10%
1998	53	51	2	301	18%
1999	64	49	15	336	19%
2000	79	40	39	340	23%
2001	79	29	51	338	23%
2002	94	43	49	324	29%
2003	137	50	85	315	43%
2004	134	44	90	346	39%
2005	167	38	128	374	45%
2006	222	45	168	384	58%
2007	217	37	180	429	51%
2008	247	67	181	443	56%
2009	198	48	150	419	47%
2010	278	52	226	491	57%
2011	276	42	234	465	59%
2012	292	47	236	461	63%
2013	316	45	271	471	67%
2014	381	35	326	511	75%
2015	343	27	316	484	71%
2016	388	32	344	531	73%
2017	451	127	502	629	72%
2018	518	127	523	650	80%
2019	548	87	544	631	87%
2020	581	83	554	637	91%

En esta placa similar a la anterior mostramos el crecimiento constante de los Productos Polo Argentino en el Abierto, para el que no lo sepa, Torneo más importante del mundo de Polo, donde confluyen los mejores jugadores y los mejores caballos.



En **el exterior** nuestro Polo Argentino premiados compiten en igualdad de condiciones con caballos de otros orígenes, obteniendo en la mayoría de los casos los premios a los mejores caballos.

Este año 2021 la AACCP entregó mantas en los principales Torneos del mundo en EE.UU., Inglaterra, España, Francia, Italia, Dubai, estamos dando premios en 20 finales en el exterior, hicimos listas de caballos en todos esos torneos, y es ahí donde nos sorprendimos gratamente por la cantidad de Productos de nuestra Raza Polo Argentino que participaban, y que fueron generados por transferencia embrionaria. Como ejemplo, en Inglaterra, en la Copa de la Reina y Copa de Oro 2021, de los 608 caballos participantes en 15 equipos, 422 caballos eran Polo Argentino, y casi en su totalidad Criados por Transferencia Embrionaria.Como dato de actualidad, el pasado Domingo se disputó la Final del Open de France con más de 45 caballos Raza Polo Argentino participando, también producidos por Transferencia Embrionaria.

Actualmente hay en Argentina más de 20 centros de transferencia embrionaria, que producen caballos para polo, y la Transferencia Embrionaria es un recurso habitual para la mayoría de los criadores que optimizan así sus sistemas de cría, multiplicando las mejores líneas de *pedigrees*.

4- LA SEGUNDA REVOLUCIÓN: CLONACIÓN.

En el año 2009 se comenzó a hablar de clones y de clonación dentro de la AACCP. Mariano Aguerre había clonado a Open Califa (4-10), un hijo de La Luna, exitoso en EE.UU., integrante del *Hall Of Fame*, y Adolfo Cambiaso había clonado a su mejor yegua Dolfina Cuartetera, y también a Dolfina Lapa y a otras más, como así también al padrillo jugador Aiken Cura, multipremiado. También ese año se logró el primer clon equino viable en Argentina, con un

caballo criollo. Posteriormente, se instalaron empresas de clonación en Argentina, y hace varios años comenzaron a nacer clones hechos en Argentina. Las técnicas de clonación avanzan a diario, mejorando la eficiencia.

Después de tres años de debates, discusiones y polémicas, la AACCP resolvió registrar los clones dentro de la Raza, decisión que no estuvo libre de posturas contrapuestas. Pero siempre en la línea de buscar el mejor caballo de polo, por **APTITUD**, como guía principal.

En polo solo se conocía jugando a **SHOW ME**, en los abiertos en Argentina, un clon de **SAGE**, la famosa yegua americana. Fue la presentación de un clon en el Campeonato Argentino Abierto, jugada por Adolfo Cambiaso. Pero en el año 2016, Adolfo Cambiaso presentó exitosamente en cancha primero los clones de Dolfina Lapa, en el Abierto del Jockey Club, y luego los de Dolfina Cuartetera en el Abierto de Tortugas, confirmando el nacimiento de LA SEGUNDA REVOLUCION.

Desfile de Cuarteteras

A partir de su presentación en el 2016 fue un sinfín de premios de los Clones de Dolfina Cuartetera, y Dolfina Lapa, Dolfina Cuartetera Clon 6 premiada en Tortugas, nominaciones en los Tres Torneos, de los clones Cuartetera 1, 2, 5 y 6.

En **2017** Dolfina Cuartetera B09 Clon 9, venia de sacar con cuatro años los mejores premios en EE.UU., es nuevamente premiada en el Abierto como mejor MPA y Lady Susan Townley. La Cuartetera B05 premiada en Tortugas, y desfile de nominaciones de la 1, 2, 4, 5, 6 y 9. La Dolfina Lapa c03 clon 3 MPA en la final del abierto Femenino. En **2018** la Dolfina Cuartetera clon 9 gana el Premio MPA Y Lady Susan Townley en el Abierto de Palermo, repitiendo su premio. En **2019** en Hurlingham gana el MPA Dolfina Cuartetera B04 clon 4, ganando ese mismo año en el Abierto de Palermo el Lady Susan Townley, con juan Martin Nero. En el Abierto **2020** MPA nuevamente Dolfina B06 Cuartetera Clon 6, y el Clon Cuartetera 09, nuevamente Lady Susan Townley.

Esta Segunda Revolución, se confirma por los resultados obtenidos en la cancha, y también confirma la clonación el éxito de nuestra Raza Polo Argentino, nadie se aventura a clonar fracasos, todo lo contrario, la clonación ingresa a la Raza por sus éxitos obtenidos previamente.

Todos clonan

Varios criadores comienzan a clonar sus ejemplares destacados, ya sea por motivo de recuperación genética, reproductivos, como también deportivos. Hay ejemplos de genéticas destacadas que tendrán una nueva oportunidad de expresarse, consolidando las bases de la raza. Podemos decir hoy sin equivocarnos que todas las organizaciones grandes de criadores, como también criadores de manera particular, clonan sus ejemplares más destacados, por el

motivo que cada uno quiere, y que esta Raza apoya con la Libertad que la caracteriza, volviendo de esta forma a los fundamentos de su fundación.

La clonación hoy

Se producen aproximadamente unos 80 a 100 clones por temporada entre las distintas empresas. Es una tendencia creciente, desde hace unos años. Hoy ya es una realidad que muchos de los criadores han incorporado esta biotecnología como un método de cría. No significa que al tomar la decisión de clonar, dejen de criar. Es una herramienta junto con otras en plan de cría. Permite un progreso genético utilizándolo como acelerador: genera precocidad, velocidad en proceso genético y variabilidad. Criar con genética consagrada, además permite distintos cruzamientos en forma temporal y atemporal. La realidad es que hoy día muchos criadores han ingresado en la clonación, ya sea para recuperar genética en caballos muy destacados o para jugar, transformándose en una herramienta más de la cría

5-EL CAMINO HACIA EL PRESENTE: GENÓMICA

Estamos trabajando en conjunto con el CONICET y el IGVET (Instituto de Genética de la Universidad de La Plata), grupo comandado por la Dra. Pilar García Peral, y los Dres. Sebastián Demyda y Pablo Trigo y equipo, desarrollando análisis genéticos que permiten predecir, con un cierto grado de confianza, ciertas características de los caballos asociadas a la *performance*, a diferentes enfermedades y al pelaje. Con una pequeña muestra de sangre, e incluso con muestra de las crines, se logra una muestra del ADN, que nos da una imagen de su genoma.

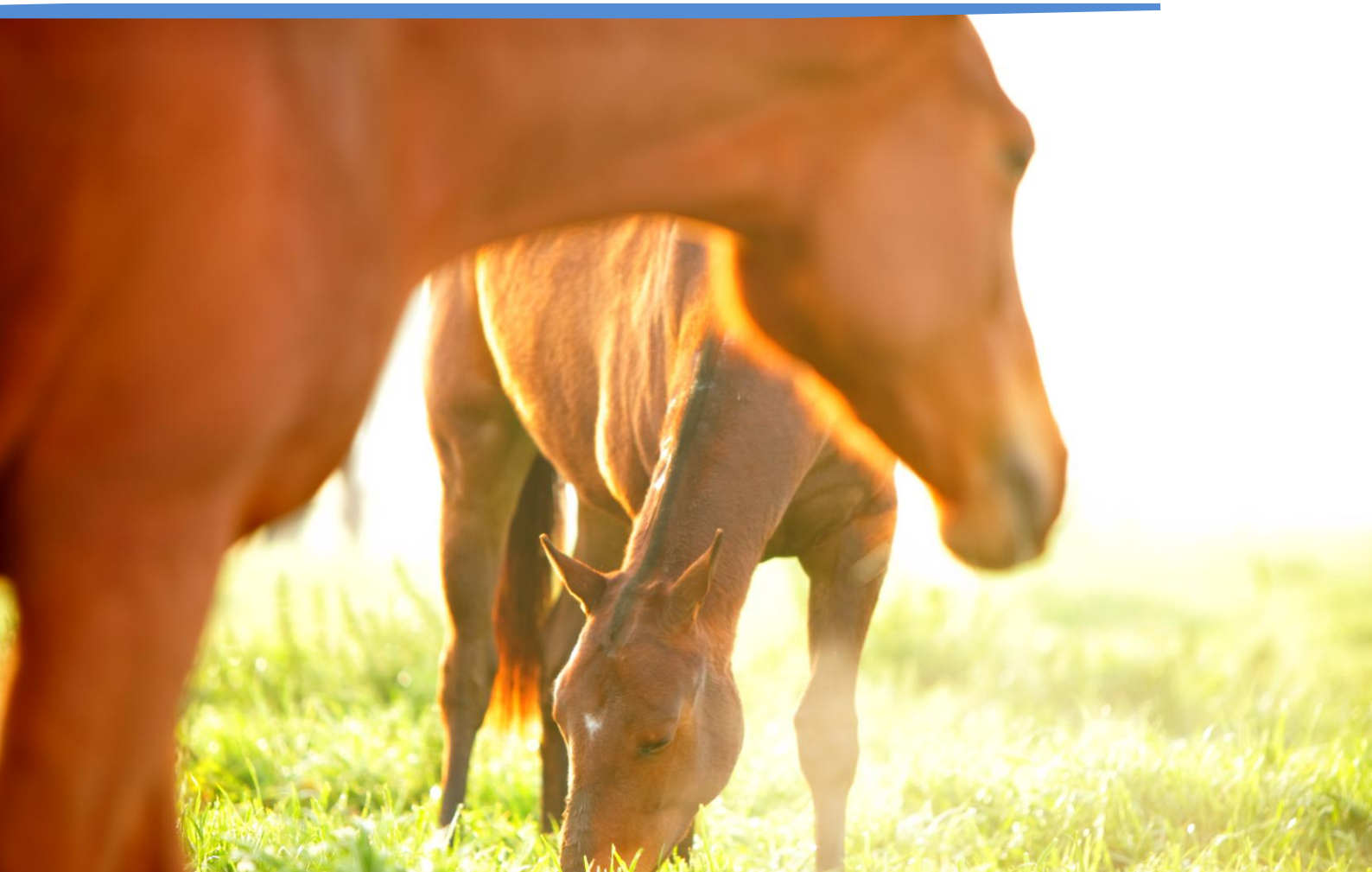
Es así que ya se analizaron 50 muestras de diferentes orígenes de la raza, aportadas por un criador, como también se realizaron otros tantos análisis en caballos que este 2021 jugaron la Triple Corona en Sotogrande, España.

La idea es continuar muestreando un mayor número de caballos, y que nos permita caracterizar de manera más específica nuestra Raza, y predecir ciertas características de suma importancia zootécnica en el caballo de polo. Asimismo queremos avanzar en pruebas de los diferentes caracteres fisiológicos y deportivos de los caballos, en el aspecto funcional, y asociarlos al genoma, pudiendo predecir su heredabilidad en los diferentes individuos. Estos trabajos están en su fase inicial y contamos con mucha expectativa en lograr buenos resultados e información en el mediano plazo, que se derrame en todos los criadores.

COMENTARIO FINAL

Hemos expresado en esta charla el exitoso impacto que tuvo la Biotecnologia, en el desarrollo de nuestra raza, estos últimos 32 años, que continuará evolucionando en el futuro inmediato.

RESÚMENES DE TRABAJOS SELECCIONADOS



MANEJO Y SELECCIÓN *IN VITRO* DE ESPERMATOZOIDES EQUINOS CRIOPRESERVADOS CON POTENCIAL CAPACIDAD FECUNDANTE PARA SU USO EN BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS EN ESTA ESPECIE

L. Laiz-Quiroga [1*], B. F. Gimeno [1*], M. V. Bariani [1], E. Martínez-León [2], M. Navarro [1], O. Rey [2], M. G. Buffone [3], A. Mutto [1], C. Osycka-Salut [1]

*[1] IIBIO- UNSAM, Buenos Aires, Argentina. [2] INIGEM, CABA, Argentina. [3]IBYME, CABA, Argentina. *Participaron por igual en este trabajo*

La criopreservación puede afectar la calidad de los espermatozoides (ESP), disminuyendo la eficiencia de las técnicas de reproducción asistida (TRA). A su vez, aún no han sido definidas las condiciones para inducir todos los eventos asociados a la capacitación e hiperactivación espermáticas *in vitro* que permitan el desarrollo de la FIV en equinos. En consecuencia, es necesario profundizar el estudio de las condiciones *in vitro* que induzcan correctamente estos eventos fundamentales para la fecundación y la optimización en la selección de los ESP con capacidad fecundante en esta especie.

Previamente hemos observado un incremento en la producción de embriones bovinos al exponer brevemente a los ESP al ionóforo A23187 el cual indujo la hiperactivación y la capacitación espermática. Por otro lado, fisiológicamente el oviducto es crucial en la selección de una población de ESP aptos para la fecundación del ovocito, la cual se libera del mismo debido al proceso de capacitación. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de una breve incubación con A23187 en ESP equinos criopreservados sobre la hiperactivación e inducción de la capacitación y además establecer un cultivo oviductal (CEOs) *in vitro* con el fin de seleccionar una población espermática con potencial capacidad fecundante apta para su utilización en TRAs.

En cuanto al manejo de las gametas, luego de 10 min de exposición a A23187 los ESP mantuvieron su viabilidad (test HOS) y su acrosoma intacto (PSA-FITC, IF) ($p<0,05$ vs no tratados). Posterior a la remoción del fármaco (20 min), los ESP iniciaron un patrón de motilidad hiperactivado (CASA, $p<0,05$ vs no tratados). Además, se ha observado un incremento en la inducción de la reacción acrosomal por progesterona (PSA-FITC, IF, $p<0,05$ vs no tratados) y de la unión de los ESP a la zona pelúcida de ovocitos bovinos sugiriendo que este tratamiento ($p<0,05$ vs no tratados) podría incrementar la adquisición de la capacidad fecundante de los ESP criopreservados en equinos para su uso en TRA. Para optimizar la selección de ESP, establecimos un modelo de cultivo primario en monocapa de CEOs en medio

DMEM-HG (con 10% SFB y antibióticos) en el cual demostramos la expresión de marcadores epiteliales (e-cadherina y citoqueratina, RT-PCR e IF). Se realizaron co-cultivos ESP-CEOs durante 1 h y se observó que la mayoría de los ESP que se mantuvieron unidos al oviducto *in vitro* eran mótiles (campo claro) y con acrosoma intacto (PSA-FITC, IF), sugiriendo la selección de una población específica de ESP por el modelo oviductal establecido (la motilidad de ESP no adheridos fue cercana al 0%). Luego, estos co-cultivos fueron incubados en condiciones capacitantes (medio Whittens con BSA y bicarbonato, capacitante) y la población de ESP liberada fue recuperada y estudiada, donde observamos un mayor porcentaje de ESP vivos (IF), capacitados (activación de PKA y fosforilación en residuos tirosina, IF), con motilidad progresiva (CASA) y con el acrosoma intacto (PSA-FITC, IF) respecto al control ($p<0,05$; liberados con Whittens sin BSA ni bicarbonato, no capacitante). Nuestros resultados indican por primera vez que la población de ESP criopreservados liberada del oviducto presentaría potencial fecundante, por lo que podría ser utilizada para su aplicación en TRA.

El estudio de condiciones y vías involucradas que induzcan correctamente la capacitación e hiperactivación *in vitro* de los ESP criopreservados generaría herramientas para solucionar el problema que presenta la FIV en equinos y también podría mejorar la eficiencia en otras TRA tales como ICSI, ya que permitiría la selección de una población de gametas masculinas de mayor calidad, lo cual impactaría positivamente en la calidad de los embriones obtenidos.

PROGRAMA COMERCIAL DE FOTOESTIMULACION ARTIFICIAL EN YEGUAS RECEPTORAS PARA TRANSFERENCIAS DE CLONES EQUINOS

E. Galvagno, R. Jordan

Kheiron Biotech S.A

La yegua es poliéstrica estacional de periodos largos de luz durante primavera/verano; su patrón reproductivo se ve influenciado por factores ambientales externos como el fotoperiodo, la temperatura y la nutrición. El fotoperiodo, es el factor externo más importante y puede ser manipulado mediante foto-estimulación y así adelantar el comienzo de la temporada reproductiva de forma artificial. De esta manera es posible lograr nacimientos más temprano. Desde el aspecto hormonal, lo que se busca es disminuir la liberación de melatonina, estimulando la liberación de GnRH y gonadotrofinas (FSH y LH). La producción de embriones clones *in vitro* es anual ya que no es dependiente de la ciclicidad de las yeguas donantes, pero es necesario contar con receptoras aptas para lograr resultados eficientes de preñez. Es así como la foto-estimulación a gran escala surge como una herramienta para el programa de transferencias embrionarias (TE) de clones con el objetivo de obtener yeguas cíclicas de forma temprana. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue comprar dos estrategias para adelantar la temporada de TE: 1) mediante foto-estimulación, 2) mediante tratamiento hormonal. Para ello se realizó el siguiente diseño experimental: Grupo foto-estimulado: 150 yeguas en 5 corrales (25 m^2) distribuidas en grupos de 30 en cada uno, con una intensidad de luz de 1000 Watts y con una ración a base de 2,5 kg de avena por yegua y 5 rollos de pastura por mes por corral. Las yeguas se mantuvieron en verdeos de avena y pasturas; con un inicio del programa de luz entre el 10 al 20 de junio, se suplementó al atardecer hasta llegar a un total de 16 horas de luz; el encendido y apagado fue por medio de timer. Grupo hormonal: yeguas anovulatorias sobre las que se realizó un protocolo de 2 días de Estrógenos: 2,5 ml intramuscular (2,5 mg/ml de Benzoato de Estradiol) y luego 5 ml intramuscular de Progesterona LA (300 mg/ml de Progesterona). Luego de 5 días de la aplicación de progesterona se transfirieron los embriones de clones equinos durante los meses de Julio y Agosto. La tasa de preñez en el grupo foto-estimulado fue mayor que en el grupo con tratamiento hormonal: 21,3% (71/334) y 7,7% (5/65), respectivamente. La tasa de pérdida de gestaciones fue del 100% (5/5) para el grupo con tratamiento hormonal y del 39,4% (28/71) para las yeguas foto-estimuladas. Las 43 preñeces restantes de este último grupo resultaron en clones viables. Según los resultados obtenidos podemos concluir que la manipulación del

fotoperiodo por foto-estimulación permite adelantar la temporada de TE y resulta en mejores tasas de preñez y nacimientos viables de clones equinos que mediante la utilización del tratamiento hormonal descripto.

COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE ICSI CONVENCIONAL Y PIEZO-ICSI EN YEGUAS

G. Alvarez [1], P. Cetica [1, 2]

[1] Universidad de Buenos Aires - CONICET, Instituto de Investigaciones en Producción Animal (INPA), Buenos Aires, Argentina. [2] Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Buenos Aires, Argentina.

El objetivo del trabajo fue comparar la eficiencia de la producción de embriones equinos *in vitro* mediante las técnicas de fecundación *in vitro* con ICSI convencional y Piezo-ICSI. Se recuperaron los ovocitos inmaduros por aspiración transvaginal (TVA) a partir de yeguas donantes y se transportaron durante la noche en medio de mantenimiento para embriones (Vigro, Vetoqinol) a temperatura ambiente (aprox. 22°C). Se maduraron en medio TCM199 con sales Earles (Invitrogen), 10% de suero fetal bovino (FBS, Invitrogen), 5 mIU/ml FSH (Sioux Biochemicals) bajo aceite mineral a 38,2°C, 5% CO_2 en aire y 100% de humedad durante 24-28 horas. La fecundación *in vitro* se realizó con semen congelado-descongelado de padrillo de probada fertilidad resuspendido en GMOPS 10% FBS. El ICSI y Piezo-ICSI se realizaron en GMOPS 10% FBS. El desarrollo embrionario fue en medio Global Total (Life Global) con 10% FBS bajo aceite mineral a 90% N_2: 5% CO_2: 5% O_2 y 100% de humedad, renovando el medio cada 48 horas. Al día 5 de cultivo los embriones clivados fueron transferidos a medio DMEM/F-12 (Sigma-Aldrich, #D-6421) suplementado con 6 ml/L 1 N NaOH, 2,5 mM glicilglutamina (Sigma-Aldrich), 10% FBS bajo aceite mineral a 90% N_2: 5% CO_2: 5% O_2 y 100% de humedad, renovando el medio cada 48 hs. Los porcentajes de formación de pronúcleos (evaluado por la tinción Hoechst 33342) a las 18 horas post fecundación, de clivaje a las 48 horas y de formación de blastocistos a los 7-10 días fueron comparados por la prueba de Chi-cuadrado para datos no paramétricos. El porcentaje de maduración *in vitro* fue 73,4% (301 ovocitos MII / 410 ovocitos recolectados). Los resultados de fecundación *in vitro* y desarrollo embrionario se presentan en el siguiente cuadro:

	ICSI	Piezo-ICSI
N° ovocitos inyectados	50	50
N° ovocitos con 2 PN (%)	34 (68) [A]	43 (86) [B]

[A, B] diferencias significativas en la misma línea (p<0,05). 4 repeticiones.

	ICSI	Piezo-ICSI
N° ovocitos inyectados	101	100
N° embriones clivados (%)	63 (62,4) [A]	82 (82) [B]
N° blastocistos (%)	8 (7,9) [A]	7 (7) [A]

[A, B] diferencias significativas en la misma línea (p<0,05). 8 repeticiones.

Nuestras conclusiones son que la interacción del pulso de Piezo con las membranas, del espermatozoide durante la inmovilización y del ovocito durante la inyección, mejoraría la activación del ovocito equino favoreciendo la formación normal de pronúcleos y el clivaje de los embriones. Sin embargo, no se observaron diferencias en el desarrollo hasta el estadio de blastocisto, registrándose una alta tasa de fragmentación embrionaria y la detención del desarrollo en estadios de 16 o más células en ambos grupos.