

**Actualizaciones en las diferentes técnicas de transferencia de embriones existentes en la
producción equina.**

Trabajo de grado como requisito parcial para la obtención del título de zootecnista.

DIRECTOR

John Carlos Ruiz Caicedo

Tutor ECAPMA - JAG - UNAD

Docente ocasional Tiempo Completo

*Zootecnista - Ing Forestal - Msc. Desarrollo Sustentable y Gestión
Ambiental*

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA

ESCUELA DE CIENCIAS AGRICOLAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE

PROGRAMA DE ZOOTECNIA

FUSAGASUGÁ (COLOMBIA), 2019

**Actualizaciones en las diferentes técnicas de transferencia de
embriones existentes en la producción equina.**

Javier Acosta

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA

ESCUELA DE CIENCIAS AGRICOLAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE

PROGRAMA DE ZOOTECNIA

FUSAGASUGÁ (COLOMBIA), 2019

NOTA DE ACEPTACION

PRESIDENTE DEL JURADO

JURADO

JURADO

CIUDAD Y FECHA (DÍA, MES Y AÑO) (FECHA DE ENTREGA)

Quiero agradecer primero a Dios por permitirnos culminar con este gran sueño, a mis padres por todo su esfuerzo y dedicación y a mis profesores por guiarme por esta grandiosa carrera.

JAVIER ACOSTA

Introducción	8
CAPITULO 1	10
COMPILACIÓN DE LAS ACTUALIZACIONES Y TÉCNICAS MÁS REPRESENTATIVAS PARA LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN EQUINOS	10
1.1 Anatomía del tracto reproductor de la yegua.....	11
1.1.1 Ovarios	13
1.1.2 Cervix	14
1.1.3 Vagina.....	15
1.1.4 Vulva.....	16
1.1.5 Periné.....	17
1.2 Fisiología reproductiva de la yegua	18
1.3 Transferencia de Embriones	19
1.3.1 Embrión Congelado	20
1.3.2 Embrión Refrigerado.....	23
1.3.3 Embrión Vitricado.....	23
1.3.4 Transferencia Intraoviductal de gametos	26
1.3.5 Inyección Intracitoplasmatica de espermatozoides.....	26
CAPITULO 2	29
RESULTADOS DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS USADAS EN LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN EQUINOS	29

CAPITULO 3	42
 IMPACTO DE LAS TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN LOS SISTEMAS EQUINOS	42
CONCLUSION.....	50
BIBLIOGRAFIA	53

TABLA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 ANATOMIA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA.....	12
Ilustración 2 OVARIO	13
Ilustración 3 CERVIX.	14
Ilustración 4 VAGINA	15
Ilustración 5 VULVA	16
Ilustración 6 PERINÉ	17
Ilustración 7 CICLO ESTRAL DE LA YEGUAL	18
Ilustración 8 CAMBIO DE LA ESTRUCTURA DEL EMBRIÓN.	24

Introducción

La transferencia embrionaria es un conjunto de técnicas que permiten producir, recuperar y transferir embriones, esta técnica consiste en extraer un embrión del útero de una yegua (donante) para posteriormente transferirlo en el útero de otra yegua (receptora) cumpliendo con una serie de parámetros sanitarios, el éxito de estas técnicas depende de la perfección con que cada una de ellas se realice. La primera transferencia de embriones (T.E) equina exitosa fue comunicada por Allen y Rowson en 1972, sin embargo, la técnica no fue utilizada como procedimiento clínico hasta comienzos de la década de los 80's. (Ángel D., A Bran J., 2010). A pesar de los esfuerzos de profesionales y técnicos que trabajan en el campo equino, el progreso ha sido lento en comparación con lo que se ha logrado en las especies bovina, ovina y porcina, una de las razones principales de que la transferencia de embriones en equinos haya progresado tan lento es la falta de interés mostrada por la mayoría de las asociaciones de registro caballar durante los años 70-90. Por otro lado, razones técnicas como la mala respuesta del ovario a los tratamientos de superovulación debido a su estructura y baja sensibilidad a las gonadotropinas exógenas han complicado la utilización y difusión de la citada técnica de reproducción asistida (Ávila C., 2016).

En cuanto a la reproducción asistida según lo reportado por Marimonte A. en 2016, la eficiencia productiva global en los sistemas comerciales de TE es aproximadamente del 35%, lo cual es muy bajo para un subsector que en Colombia aporta el 4.35% del PIB agropecuario

y al PIB total con el 0,1%; reflejado en el consumo que el subsector hace a la industria de alimentos e insumos, industria marroquinera, industria farmacéutica veterinaria, industria talabartera y al sector del transporte entre otros; además de ser fuente importante de empleo al generar 159.752 empleos directos en los 39.938 criaderos registrados en el país y 199.690 empleos indirectos; es decir un total de 359.442 empleos en todo el país.(Ministerio de Agricultura, 2014), Colombia no ha adoptado y/o desarrollado tecnologías suficientes que le permitan ser más eficientes en la consecución de ejemplares de calidad. esto puede estar influenciado por limitaciones técnicas, procedimentales, económicas y de accesibilidad para un alto porcentaje de la población dedicada a la producción equina, causando rezago en los avances y modificaciones de protocolos propios que brinden eficiencia para las condiciones ambientales, de disponibilidad de alimento, tendencias productivas, instalaciones, equipos y potencial genético, según reportado recientemente por Cristian Stapper presidente de FEDEEQUINA Una política integral para el sector equino debe estar sustentada en tres pilares: el fortalecimiento del sistema de registro de equinos, entendido como prueba eficiente y suficiente del derecho de propiedad sobre los ejemplares; la eliminación del IVA para las transacciones sobre equinos y el material reproductivo y; una agresiva política de promoción de nuestros equinos a nivel internacional (Stapper C. 2018).

La siguiente monografía pretende realizar una revisión y análisis de las actualizaciones en las diferentes técnicas para obtención de embriones, utilizadas en producción equina a través del tiempo, para lo cual se va a Compilar y sistematizar las actualizaciones y técnicas más representativas para la transferencia de embriones en equinos, comparar metodologías y resultados de las diferentes técnicas usadas en la transferencia de embriones de equinos, y analizar el impacto de las técnicas de transferencias de embriones en la productividad de los sistemas equinos del país y su oportunidad de aplicación a nivel regional.

CAPITULO 1

COMPILACIÓN DE LAS ACTUALIZACIONES Y TÉCNICAS MÁS REPRESENTATIVAS PARA LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN EQUINOS

Se realizó una revisión de artículos científicos, documentos, trabajos de grado y revistas para luego realizar una recopilación de la información disponibles que hayan investigado sobre las transferencias de embriones en la producción equinas existentes en este momento para así identificar que técnicas o metodologías son las más indicada para utilizar en la reproducción equina en Colombia y así poder obtener mejores resultados.

La primera transferencia exitosa de embriones se realizó en 1890 utilizando embriones de conejo. El primer embrión bovino fue extraído por Hartman, Lewis, Miller y Swett en 1930 en el Carnegie Laboratory of Embryology de Baltimore. En la década de 1950, la técnica de la transferencia de embriones bovinos dio un gran paso al efectuarse la primera por Umbaugh, la cual fue seguida por el primer nacimiento de un ternero mediante un esfuerzo combinado del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y la Universidad de Wisconsin. Hasta la década de 1970 el avance fue lento, con muchas ideas que terminaron en el fracaso. Con el surgimiento de métodos no quirúrgicos mediante los esfuerzos de Elsdén, Hasler, Seidel y otros, el uso comercial de la transferencia de embriones tuvo auge. En el año 2002, se registraron más de 25.000 terneros nacidos tras transferencias de embriones en los Estados Unidos (Colazo M.G y R.J. Mapletoft, 2007).

La primera transferencia de embriones en (T.E) equina exitosa fue comunicada por Allen y Rowson en 1972, sin embargo, la técnica no fue utilizada como procedimiento clínico hasta comienzos de la década de los 80's. (Ángel D., A Bran J., 2010), los primeros reportes y registros de centros comerciales, comenzaron durante la temporada de 1989, básicamente sobre yeguas de Polo. En la actualidad se encuentran operando al menos seis centros de TE y el número de donantes ha crecido sostenidamente hasta un total aproximado de 300 yeguas, con 40 padrillos en programa y más de 600 receptoras preñadas por temporada (Losinno L. y Aguilar J., 2002). Al igual que la transferencia de embriones en otras especies en su inicio se vio enfrentada a desafíos técnicos, procedimentales y operativos que limitaban su desarrollo y expansión.

Ángel y A Bran J. en el 2010 manifestaron que la transferencia de oocitos (TO) y la transferencia intraoviductal de gametos (TIG), fueron utilizadas en algunos países en yeguas con disfunción reproductiva; Estas técnicas tienen menor aplicabilidad en nuestro medio. La producción de embriones in vitro, junto a la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), o la clonación por transferencia nuclear, han sido realizadas en la especie, a nivel de investigación básica, o comercialmente en algunos países con altos costos, y no representan hoy una herramienta para el área clínica de campo en el país.

1.1 Anatomía del tracto reproductor de la yegua

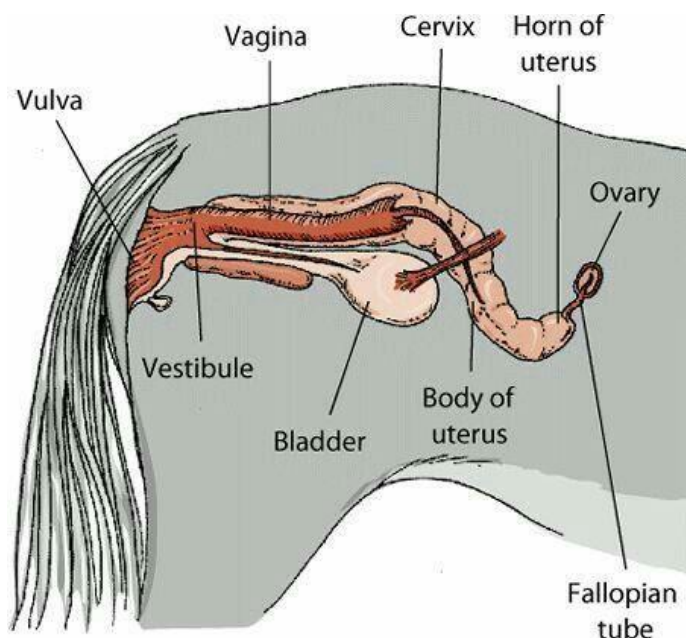


Ilustración 1 Ovario Gelbes L. 2012 mundo pecuario tomado de https://mundo-pecuario.com/tema238/ovarios_animales/ovarios_yegua-1370.html

El tracto reproductor de la yegua puede considerarse como un órgano tubular con forma de Y griega (Davies Morel, 2005), los componentes tubulares son los oviductos, el útero, el cérvix, y la vagina (Senger, 2003). Cada componente tubular está caracterizado por tener cuatro capas concéntricas distintas, las cuales son la serosa, la muscular, la submucosa y la mucosa.

La serosa, la capa externa, es una capa simple de células escamosas, que cubren la superficie del tracto reproductivo y se continúa con el peritoneo. La capa muscular es una capa doble de músculo liso, que consiste en una capa externa longitudinal y una capa interna 8 circular (M. Luciana 2017).

El propósito de la capa muscular es proveer al tracto reproductivo la habilidad de la contracción, lo cual es importante para el transporte de los productos de la secreción, los gametos y del embrión a su apropiada localización dentro del tracto. También es importante para la expulsión del feto y sus membranas fetales durante el parto. La submucosa es una capa de espesor variable, que alberga a los vasos sanguíneos, los nervios y los vasos linfáticos, y actúa de soporte para la mucosa. El lumen está revestido de una capa de epitelio secretor, la mucosa, variando el tipo en cada parte del tracto reproductivo y realizando cada uno una función diferente dependiendo de la región (Senger, 2003).

1.1.1 Ovarios

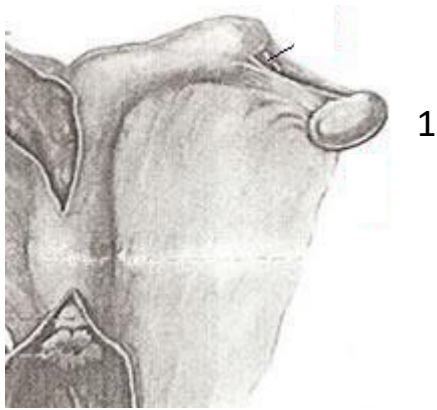


Ilustración 2 ovario Gelbes l. mundo pecuario tomado de https://mundo-pecuario.com/tema238/ovarios_animales/ovarios_yegua-1370.html

Los ovarios de la yegua (1) se encuentran como dos estructuras con forma de frijol (Sisson, 2001; Davies Morel, 2005; Budras et al., 2009). La longitud total del tracto reproductor de la yegua es de 50-60 cm, incluyendo los ovarios. En el estadio sexual inactivo, es decir, fuera de la estación reproductiva, los ovarios de la yegua miden 2-4 cm de largo por 2-3 cm de ancho y se perciben duros al tacto, debido a que no hay desarrollo folicular. Durante el estadio sexual activo, los ovarios incrementan su tamaño hasta alcanzar los 6-8 cm de largo y 3-4 cm de ancho; al tacto son más blandos, debido a la presencia de líquido en los folículos, que se están desarrollando (Davies Morel, 2005). La superficie externa, convexa del ovario está unida al mesovario, que le permite modificar considerablemente su posición (Dyce, 2010), y presenta la zona de entrada de la vascularización e inervación; la parte interna y cóncava del ovario no está unida al mesovario y es donde se localiza la fosa de ovulación (Sisson, 2001; Davies Morel, 2005). La ovulación en la yegua ocurre únicamente en la fosa de ovulación (Sisson, 2001; Senger, 2003; Davies Morel, 2005; Budras et al., 2009; Dyce et al., 2010). El ovario está rodeado externamente de un tejido conectivo denominado túnica

albugínea (Senger, 2003). En profundidad de la túnica albugínea, se encuentra la médula, que alberga los vasos sanguíneos, los nervios y los vasos linfáticos y está compuesta por tejido conectivo denso (Senger, 2003; Dyce et al., 2010). La corteza en la yegua es interna (Senger, 2003; Davies Morel, 2005) y alberga los distintos tipos de folículos ováricos en diferentes etapas del desarrollo folicular y de madurez (Senger, 2003). La corteza también contiene los cuerpos lúteos, y los cuerpos albicans, que son los cuerpos lúteos que degeneraron (Senger, 2003).

1.1.2 Cérvix

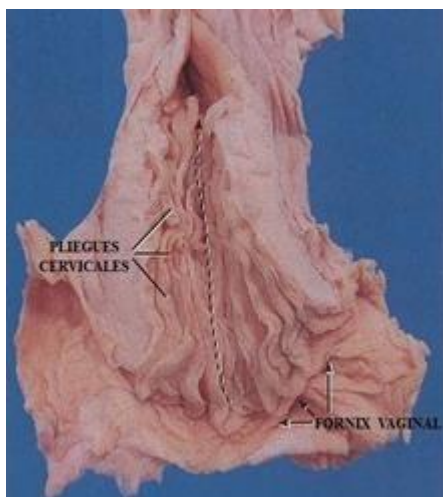


Ilustración 3 cérvix. Rivera m. 2012, manual de reproducción equina, anatomía reproductiva recuperado de <http://manualdereproduccionequina.blogspot.com/p/anatomia.html>

El cérvix es un esfínter formado por los pliegues uterinos, que actúa como barrera de protección final contra patógenos externos. En diestro, se encuentra firmemente contraído. Está cubierto por epitelio que secreta mucus en el momento en que se relaja durante el estro. Así sirve de lubricante en el momento del servicio y otro mucus denso que ocluye el lumen

cervical durante el diestro y la preñez, momento en que se encuentra contraído (Morel, 2005; Brinsko et al, 2011).

1.1.3 Vagina

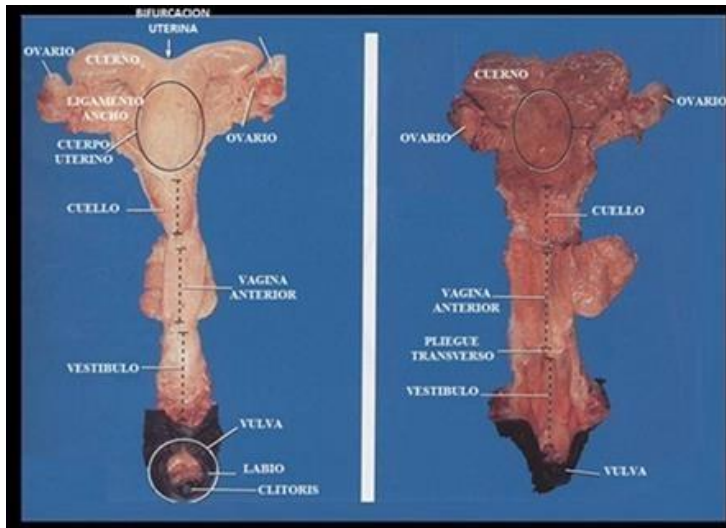


Ilustración 4 vagina. Rivera m. 2012, manual de reproducción equina, anatomía reproductiva recuperado de <http://manualdereproduccionequina.blogspot.com/p/anatomia.html>

La vagina, que es un órgano tubular de hasta 50 cm de largo. En la entrada a la vagina, en su límite con el vestíbulo, llega a tener una longitud de 10-12 cm, allí se encuentra el pliegue transversal (anillo himenal) que rodea el orificio uretral externo. Este, en yeguas vírgenes se continúa del otro lado de la vagina formando el himen; estructura que suele cubrir toda la unión vestibulovaginal y se mantiene aún después de iniciada la actividad sexual, por eso es considerado como la segunda barrera de entrada de microorganismos. Ambos órganos tubulares contienen glándulas ventrales que en el estro secretan mucus como lubricante (Morel, 2005; Brinsko et al, 2011).

1.1.4 Vulva

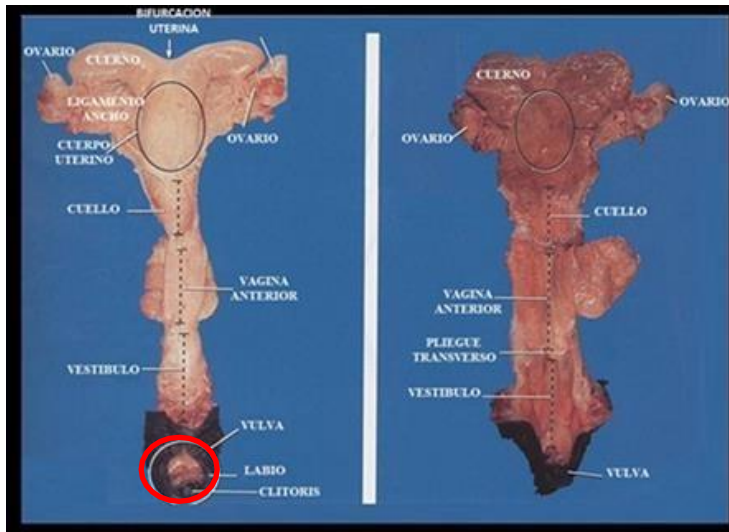


Ilustración 5 vulva. Rivera m. 2012, manual de reproducción equina, anatomía reproductiva recuperado de <http://manualdereproduccionequina.blogspot.com/p/anatomia.html>

Su tejido es elástico y se extiende verticalmente entre 5 a 7 cm del ano (periné) y tiene 12 a 15 cm de largo, su comisura dorsal se encuentra aproximadamente a 5 cm por encima del isquion (llamado piso de la pelvis). Si esta comisura se encuentra por encima de los 5 cm, la hembra es propensa a aspirar aire por la vagina (neumovagina), sobre todo cuando el ano está retraído y los labios vulvares se inclinan en forma horizontal. En la comisura ventral de la apertura vulvar, se encuentra la fosa del clítoris y el clítoris, (vestigio del pene). Tiene tres senos, dos de ellos localizados en dorsal del clítoris, y uno, llamado fosa del clítoris, en ventral del glande del clítoris. Estos senos deberían ser muestreados para bacteriología (cultivo) para documentar infecciones con *Taylorella equigenitalis* (antiguamente denominada *haemophilus equigenitalis*) agente causante de la metritis contagiosa equina y de *Pseudomonas aeruginosa*, causante de enfermedad venérea y endometritis. El clítoris se expone durante el celo, gracias a la capa muscular de las paredes de la vulva (Morel, 2005; Brinsko et al, 2011).

1.1.5 Periné



Ilustración 6 periné. Rivera m. 2012, manual de reproducción equina, anatomía reproductiva recuperado de <http://manualdereproduccionequina.blogspot.com/p/anatomia.html>

Su conformación es de gran importancia reproductiva, ya que una mala conformación del periné, puede llevar a que la vulva se incline cambiando su ángulo y dificulte su cierre, permitiendo la entrada ya sea de aire, materia fecal y bacterias. La mala conformación suele estar relacionada mayormente con la poca contractibilidad, causada por la edad o lesiones a nivel del ano como puede ser una fístula provocada por una distocia. Esta barrera deficiente lleva a que, durante el celo, donde hay una disminución en el tono del cérvix, se permita la entrada de patógenos externos y se generen infecciones endometriales, una de las principales causas de infertilidad, que conducen a la endometritis (Morel, 2005).

1.2 ciclo estral de la yegua

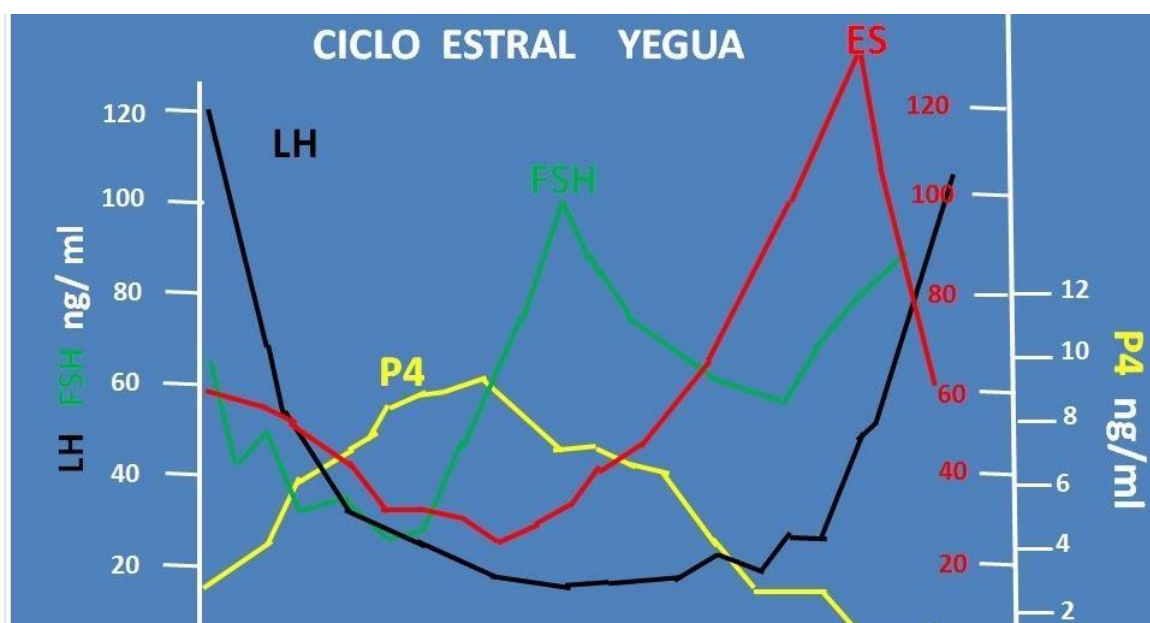


Ilustración 7 ciclo estral de la yegua Rivera m. 2012, manual de reproducción equina, ciclo estral de la yegua, recuperado de <http://manualdereproduccionequina.blogspot.com/p/ciclo-estral.html>

El ciclo estral se ha definido como “el número de días que media entre una ovulación y otra, acompañado por un periodo de estro y de un nivel plasmático de progesterona menor a 1 ng/ml”. La concentración de progesterona está incluida en la definición, ya que puede ocurrir que la yegua ovule en diestro con niveles altos de progesterona. Sin embargo, esa ovulación no representa el final del ciclo (Le Blanc, 1998). El ciclo estral se ha dividido por conveniencia en una fase folicular o estro, y una fase luteal o diestro. Cada fase está caracterizada por un comportamiento específico, por cambios endocrinos y genitales que serán analizados a continuación (Acevedo F., 2013).

Estro o fase folicular: El estro es el período durante el cual la yegua es sexualmente receptiva al macho y el tracto genital es preparado para aceptar y transportar espermatozoides también ocurre la ovulación. Durante el estro, el folículo dominante se desarrolla y secreta estrógenos los que inducen la receptividad sexual; la ovulación ocurre aproximadamente 24-48 hs. antes de finalizar la receptividad sexual.

Diestro o fase luteal: El diestro es el período durante el cual la yegua no es receptiva al macho y el tracto genital es preparado para aceptar y nutrir la concepción. Después de la ovulación la estructura folicular desarrolla en un cuerpo lúteo (CL) el cual secreta progesterona; causando que la yegua repela los avances sexuales del macho.

El período durante el cual el CL secreta progesterona es llamado período luteal o fase diestral del ciclo. La finalización de la fase luteal es marcada por la regresión del CL. (luteolisis) 14-15 días después de la ovulación o principio del estro 1-2 días más tarde. (Paredes E. 2016).

1.3 Transferencia de Embriones

Mediante este procedimiento se busca recolectar del útero un embrión entre seis y ocho días postovulación (a través de lavado uterino) de una yegua donante que fue servida previamente. El embrión se transfiere (de manera quirúrgica o no quirúrgica) al útero de otra yegua receptora sincronizada previamente con la donadora (Losinno L, Agular J. 2002.).

Esta técnica es muy utilizada en Colombia y otros países, con el fin de obtener potros de yeguas en entrenamiento, ya que las yeguas que son entrenadas o están en competencias, pueden presentar fallas para concebir o deben ser retiradas de competencia cuando están gestantes para garantizar su salud y la continuidad de la gestación; conseguir más de un potro de una yegua cada año; obtener potros de potrancas de dos años, que aún no tienen capacidad corporal para mantener la gestación, pero podrían así iniciar su vida reproductiva más temprano; obtener potros de yeguas subfértiles o de yeguas con problemas de salud de índole no reproductiva, así como la utilización de la técnica como herramienta en investigación.(Aguilar J, Woods GL. 1997.)

1.3.1 Embrión Congelado

Esta técnica se refiere a la criopreservación del embrión a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, el primer nacimiento de un potro fue reportado en 1983, si bien hay algunos resultados promisorios en nuestro país, ésta técnica no ha alcanzado el nivel de desarrollo y difusión que tiene, por ejemplo, en bovinos (Lossino y Aguilar ,2002).

La congelación convencional (CC) consiste en la exposición del embrión a concentraciones crecientes de crioprotectores, deshidratando el embrión mientras se va enfriando a $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta -6°C , cuando se induce el “seeding”, iniciándose la cristalización; a continuación, se descende la temperatura hasta -35°C y finalmente, se introduce en nitrógeno líquido a -196°C para su almacenamiento (Slade NP, et al. 1985).

1.3.1.1 Factores que influyen en la congelación de embriones equinos

Calidad, tamaño y edad del embrión

El tamaño y el estadio de desarrollo del embrión recuperado son factores claves en el éxito de la congelación de embriones equinos. La calidad del embrión recuperado es también de suma importancia, ya que sólo son aptos para la congelación los embriones de grado I (excelente) o grado II (bueno), según la clasificación de Mckinnon y Squires. Afortunadamente, la gran mayoría de los embriones recuperados son de buena calidad. Los mejores resultados se obtienen cuando congelamos mórulas o blastocistos tempranos, con un diámetro medio de 200 µm, carentes de blastocele y sin cápsula glicoproteica que lo rodea. Estas características tienen mucha importancia en el proceso de congelación y descongelación, ya que los cambios de volumen del embrión, la cantidad de agua y la permeabilidad a los crioprotectores varía enormemente a medida que el embrión se va desarrollando. Cuando congelamos mórulas o blastocistos tempranos, el 80% de los embriones recuperados son viables tras la descongelación, obteniéndose unos índices de preñez del 50-60%, incluso pudiendo llegar al 86% (Syverson y col. 2009).

Toxicidad de los crioprotectores

Son varios los CPs empleados en la congelación de embriones equinos, los más comunes: dimetilsulfóxido, glicerol, etilenglicol y propilenglicol. Diferentes concentraciones, y combinaciones de ellos han sido estudiadas y comparadas por numerosos investigadores en busca de la fórmula que permita un proceso de congelación y descongelación rápida, sencilla y sobretodo, que no dañe el embrión. La finalidad de los crioprotectores en el proceso de congelación es proteger al embrión de la formación de cristales de hielo por un efecto de

deshidratación celular, mientras lo sometemos a un sobreenfriamiento y posterior congelación. El daño producido por los CPs viene dado por los efectos tóxicos directos de éstos sobre las células, así como por el shock osmótico durante la exposición inicial y la posterior eliminación durante su descongelación. Los efectos tóxicos directos vienen dados tanto por la temperatura a la que se realiza el equilibrado del embrión en un medio con CP puesto que determina el coeficiente de permeabilidad del embrión al CP, así como el tiempo. Las características únicas del embrión equino condicionan también la concentración y los tiempos de equilibrado en el crioprotector, en función de la etapa de desarrollo del embrión a congelar, puesto que a partir de que se desarrolla la capsula glicoproteica la permeabilidad a los CP varía enormemente, obligando a mayores tiempos de equilibrado que pueden dañar el embrión. Parece ser que el CP más permeable en el equino es el etilenglicol (Pfaff y col. 1993).

Recuperación del embrión, número de ovulaciones y la yegua donante

Eldridge-Panuska y col. (2005) demostraron una tasa de recolección embrionaria del 78% cuando realizaron el lavado uterino 6.5 d después de la visualización ecográfica de la ovulación u 8 días después de la administración de HCG; observando que la sincronización de la recolección con la administración de HCG, resultó en la obtención de un mayor número de embriones del tamaño adecuado. Se ha observado un retardo en el descenso de los embriones al útero en el caso de yeguas viejas, cuando se insemina postovulación, cuando inseminamos con semen congelado o pronto en la estación reproductiva (T.A. estaout,2006).

1.3.2 Embrión Refrigerado

Este sistema reduce la presión de sincronización sobre las receptoras ampliando el margen de días para la transferencia. Los resultados obtenidos con embriones refrigerados por 12 a 30 hs. en medio y recipientes especiales son semejantes a los transferidos directamente y en varios países es una práctica rutinaria. (Lossino y Aguilar ,2002).

1.3.3 Embrión Vitrificado

La vitrificación es un proceso físico de criopreservación donde una solución líquida es transformada en un sólido estable, cuando se congela a bajas temperaturas, utilizando altas concentraciones de crioprotectores. Una de las ventajas de esta técnica es que se puede realizar en poco tiempo y no necesita equipos costosos. Entre los inconvenientes contamos con las altas concentraciones de crioprotectores que se emplean, ya que son tóxicos para las células a temperatura fisiológica, por lo que la manipulación tanto en la preparación como en la descongelación requiere de mucha atención y experiencia. En este caso, se emplean diferentes soluciones de vitrificación (I. Martín, A.Monge, 2005). En este proceso participan 3 factores: la velocidad de enfriamiento (se consigue que sea más alta por inmersión en nitrógeno líquido o en nieve de nitrógeno líquido), la viscosidad del medio (depende de la concentración de crioprotector y el punto de transición vítrea) y el volumen del contenedor (volúmenes más pequeños permiten una mayor transferencia del calor) (Saragusti & Arav, 2011).

Proceso de vitrificación

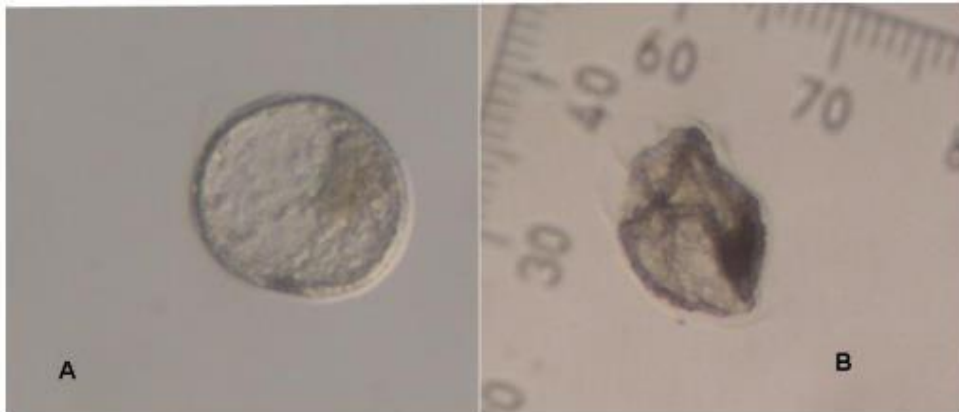


Ilustración 8 saragustin & aray 2011.) Cambio de la estructura del embrión. En la imagen a se muestra la estructura antes del proceso de vitrificación. En la b, el embrión es sometido a sustancias crioprotectoras que lo deshidratan.

Los diferentes procesos de vitrificación han ido evolucionando desde que se obtuvieron los primeros resultados con éxito en condiciones de laboratorio (Riha y col., 1991; Vajta & Kuwayama, 2006). Lo que promovió el desarrollo de forma comercial, partiendo de la simple idea de dejar caer el embrión, previamente en contacto con un pequeño volumen de solución, en el nitrógeno líquido (Visuete G., 2016).

Las diferentes estrategias para conseguir dicho fin consisten en el diseño de diferentes soportes y herramientas para criopreservar el embrión, entre los que se encuentran:

- **Micro-rejillas de cobre**, que permiten introducir directamente al embrión en nitrógeno líquido (Martino y col., 1996; Vajta & Kuwayama, 2006).
- **Open Pulled Straw o pajuela de 0.25 ml** que, tras ser calentadas, se estiran hasta conseguir un diámetro interno 0.8 mm y un espesor de la pared 0.075 mm, permitiendo una disminución de la concentración del crioprotector y una mayor

velocidad de enfriamiento (Vajta y col., 1997; Vajta & Kuwayama, 2006; Risco y col., 2007).

- **Cryoloop**, es un bucle de nylon donde se suspende la célula con el medio que lo contiene y seguidamente en el nitrógeno líquido (Lane y col., 1999; Vajta & Kuwayama, 2006; Risco y col., 2007).
- **Hemipajuelas**, son dispositivos sobre los que se deja el embrión en 1 µl de crioprotector y este se introduce en el interior de una pajuela normal (Vanderzwalmen y col., 2000; Saragusty & Arav, 2011).
- **Cryotop**, es una fibra extrafina de polipropileno unido a un mango de plástico. Sobre la punta de la fina tira se pone el embrión con un volumen mínimo de crioprotector y este se introduce directamente en nitrógeno líquido (Kuwayama & Kato, 2000; Saragusty & Arav, 2011).
- **Plastic blade** es una lámina de plástico en forma de T que permite dejar los embriones en el centro de la T y se sumergen directamente en nitrógeno líquido para luego introducirse en la funda previamente enfriada (Almodin y col., 2010; Saragusty & Arav, 2011).
- **Ultravit** son unos microcapilares de cuarzo con un diámetro interno de 0.3mm que permite depositar el material que se desea vitrificar y se deja caer directamente en nitrógeno líquido tras lo cual se mete en una funda de plástico protectora, permitiendo tener al ovocito o embrión en un volumen de 0.2 µl (Sholz, 2012)

1.3.4 Transferencia Intraoviductal de gametos

La TIG consiste en transferir quirúrgicamente un oocito y espermatozoides al oviducto. Es realizada mediante laparotomía con la yegua en estación: una vez expuesto el oviducto, se

cargan el semen y el oocito juntos en una pipeta y son depositados allí. Las ventajas de esta técnica son la poca cantidad de espermatozoides utilizados y la disminución en la presentación de endometritis post servicio en las receptoras, (situación que en casos como la TO puede ser más alta, posiblemente por el uso de tranquilizantes y relajantes musculares usados en el proceso de aspiración folicular) En la práctica ha funcionado bien, pero solo con semen fresco. (Coutinho da Silva et al 2004).

La TIG ha sido sugerida como opción en yeguas con endometritis persistente, fallas ovulatorias, desgarros cervicales, o en algunos casos de infertilidad idiopática (Ángel D., Bran J., 2010)

1.3.5 Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides

La técnica consiste en capturar un espermatozoide con una micropipeta en un microscopio con micromanipulador e inyectarlo en el citoplasma de un oocito maduro (en metafase II) (da Silva C. 2008.)El embrión obtenido mediante ICSI puede ser transferido al oviducto de una receptora mediante laparotomía o laparoscopia, o cultivado in vitro por siete u ocho días hasta blastocisto para transferirlo, vía cervical, al útero (Carnevale EK, Maclellan LJ. 2006). El desarrollo hasta blastocisto con fertilización in vitro convencional se encuentra en un porcentaje menor al 10%, pero con ICSI se consigue hasta un 80% de clivaje y luego del cultivo y la transferencia del embrión se reporta un porcentaje de preñez del 50% (Hinrichs K. 2006.) Para realizar ICSI no se precisa de espermatozoides móviles y con una pajilla pueden fertilizarse un gran número de oocitos (Carnevale EK, Maclellan LJ. 2006).

La ICSI proporciona las siguientes ventajas sobre la TO: el semen usado puede ser congelado o fresco y sus cambios en motilidad no interfieren, se disminuye el riesgo de endometritis pues la yegua no es inseminada, asimismo, no es necesario someter a la receptora a

aspiración folicular. Mediante ICSI es posible tratar cada oocito individualmente, hasta que alcance estado de blastocisto y pueda ser transferido a una receptora, con la posibilidad que cada uno de ellos genere un potro, mientras que con la TO son transferidos a receptoras muchos oocitos posiblemente inviiables, que no formarán blastocistos. De otro lado, al realizar la ICSI se corre el riesgo de lisar el oocito y las tasas de clivaje son menores en comparación con la fertilización in vivo 24, 28, 37. También, el costo del proceso es muy alto si se compara con técnicas como TE o TO. (Ángel D., Bran J., 2010).

1.3.6 Ventajas y desventajas de la transferencia de embriones

Quevedo, 2002; enumera como ventajas de la Transferencia de Embriones las siguientes:

- Brinda la capacidad de obtener preñeces de hembras de edad avanzada o senil, pero de gran valor genético.
- Aumenta la producción de las yeguas superiores permitiendo que haya una mayor influencia genética de la madre.
- Permitir que de una excelente yegua ganadora en las pistas de exposición y siendo adicionalmente una yegua donadora, se puede obtener varias crías vivas por año. Esto incrementa la selección de animales en cuanto a su línea de sangre, preservando la descendencia de padres campeones a sus hijos. Por otro lado, no se hace necesario la preñez de la yegua donadora, ya que esto afecta en cierta forma el desempeño deportivo del ejemplar debido a su estado de gestación.
- La recuperación embrionaria ha sido también utilizada para evaluar la fertilidad de los sementales, las diluciones seminales y el semen congelado.
- El hecho de habitar en el trópico de la gran ventaja de obtener alrededor de unas 10 crías al año, por yegua donadora. Esto mismo no sucede con los países de estaciones

en los cuales las yeguas se sirven hasta comienzos de la primavera, con lo cual disminuye el número de embriones recuperados.

- Desde el punto de vista comercial, el caballista que posea un buen semental y una yegua donadora de buena raza y ganadora en pistas, podrá vender embriones a muy buen precio, los cuales son el producto de la biotecnología desarrollada en su criadero.

Desventajas

- La transferencia de embriones en equinos no ha dado lugar al mismo progreso genético que en bovinos, debido a la carencia de un método efectivo de superovulación. (Mckinnon y Squires; 1993).
- Otro de los grandes problemas es la incapacidad de utilizar semen congelado en los programas de transferencia embrionaria equina, debido a que estadísticamente el porcentaje es del 50%, lo cual hace que la rata de preñez sea mucho menor. (Nishikawa, 1976).

- Los altos costos que implica desarrollar la parte técnica como tal, es decir, seguir la yegua por ultrasonido, preñarla, recuperar el embrión, evaluar la calidad del mismo, realizar la transferencia de la yegua donadora a la receptora y por último confirmar preñez de la receptora. (Quevedo, 2002).
- Es muy difícil y hasta restrictivo tener en un mismo establecimiento a la donante, la receptora y el semental a la vez. Generalmente a la mayoría de los criaderos no les gusta la idea de mantener las receptoras en sus potreros debido a los costos que generan. (Quevedo, 2002).

CAPITULO 2

Resultados de las diferentes técnicas usadas en la transferencia de embriones en equinos

El primer reporte de fertilización in vitro en equinos se dio en 1989, y la mayoría de las investigaciones reportan tasas de fertilización in vitro de oocitos equinos entre 4 y 33% (Bezard J. 1992).

Los índices de preñez según el autor para embriones frescos, mediante transferencia no quirúrgica están en torno al 75-80% (Losinno y col. 2001).

Carnevale en el 2006 realizó una comparación entre los porcentajes de preñez post transferencia no quirúrgica entre embriones refrigerados que son luego vitrificados y los porcentajes de preñez de embriones únicamente vitrificados.

En la tabla 1 se puede observar que en los tres (3) estados de desarrollo se obtuvo un mayor porcentaje de preñez en los embriones que fueron únicamente vitrificado, debido a que esta

técnica evita la formación de hielo y, por tanto, el daño al embrión, cuenta con protocolos optimizados que aportan grandes mejoras a los tratamientos reproductivos, conservando intacto el potencial de implantación del embrión.

Tabla 1 Efecto del desarrollo embrionario en los porcentajes de preñez de embriones refrigerados y vitrificados luego de la transferencia embrionaria no quirúrgica (carnevale, 2016).

Estado de desarrollo	Refrigerado/vitrificado	Vitrificado	Combinado
Mórula Tardía	5/7 (71%)	4/4 (100%)	9/11 (82%)
Blastocisto Temprano	8/13 (62%)	11/16 (69%)	19/29 (66%)
Combinado	13/20 (65%)	15/20 (75%)	28/40 (70%)

Según los autores Castaño, Múnera, Gómez, Oquendo, y Moncada en 2008 “el porcentaje de embriones recuperados sobre el total de lavados realizados fue de (45.63%)”, menciona que es más bajo que el reportado por Ramos en 2007 y aún más que el reportado por Samper, en 2000, en parte tal vez como consecuencia de la caída en la fertilidad que se observa en las yeguas criollas colombianas en el segundo semestre del año. Por el contrario, la tasas de embriones implantados (51.06%) y la de gestaciones obtenidas sobre el número total de embriones transferidos (48.93%) fueron muy parecidas a las de Ramos y Samper, Las cifras

presentadas en la tabla No. 2 podrían apoyar la ya mencionada relativa estacionalidad reproductiva de las yeguas criollas colombianas, que fue reportada en 1996 por Otálvaro donde dice que el 64% de las yeguas “lavadas” se trabajó en el primero y en el cuarto meses de observación, lo cual puede ser indicio de mayor actividad reproductiva en ese momento; sin embargo, la tasa de gestación obtenida en cada uno de los cuatro meses fue prácticamente idéntica, aun cuando el número de embriones fuera dos o tres veces mayor. Todo esto podría indicar que, a pesar de que la actividad reproductiva aparente fuera mayor en julio y octubre, la fertilidad real sigue siendo igual en todos los meses. Podemos considerar que no hubo una diferencia significativa en el estudio en cuanto al porcentaje de implantación, pero si se aprecia una diferencia en cuanto al porcentaje de recuperación de embriones, lo cual puede estar asociado a variables medioambientales, nutricionales y de manejo.

Tabla 2 Distribución mensual de los eventos durante el periodo de evaluación. (Castaño, Múnera, Gómez, Oquendo, y Moncada en 2008).

Periodo	No. De yeguas “lavadas”	No. (%) de embriones recuperados	No. (%) de embriones implantados
22 de junio a 21 de julio	38	17 (44.7)	9 (52.9)
27 de julio a 21 de agosto	22	6 (27.3)	3 (50)
25 de agosto a 25 de septiembre	15	8 (53.3)	4 (50)
27 de septiembre a 23 de octubre	28	16 (57.1)	8 (50)
Total	103	47 (45.6)	24 (51.1)

En el 2010 Quevedo D. reportó que, con su investigación, identificó el día más propicio para realizar la transferencia de embrión (T.E) de la yegua donante a la yegua receptora con el fin de incrementar el porcentaje de gestaciones obtenidas. Esta investigación se llevó a cabo en tres diferentes criaderos ubicados en la sabana de Bogotá: Potrillos (Cogua), La Ceiba (Facatativa) y Tikal (Tenjo); se compararon los porcentajes de gestaciones obtenidas, se realizó una proyección de crías al año y la relación costo / beneficio entre los diferentes días de transferencia de embriones. Para esto se trabajó con 20 yeguas donantes y 53 yeguas receptoras. Con lo anterior se obtuvo que el tratamiento con mayores embriones implantados fue el T4 con un promedio de gestaciones obtenidas por yegua de 1,4 ($P \leq 0,05$) y con un porcentaje de gestaciones de 87,5%. En cuanto a la relación Costo / Beneficio, el tratamiento T4, fue el que obtuvo la mejor relación con un valor de 2,34 y además este tratamiento presenta la mayor utilidad bruta. Esto indica que el día más propicio para realizar la T.E. es el (día -3) o Tratamiento 4, ya que es en el cual se obtiene un mayor porcentaje de gestaciones y la relación costo / beneficio es mayor. N. Martínez, J. Pinzón, J. Porras, J. Pérez, E. Buitrago y otros (2014) realizan una comparación de las técnicas de vitrificación y congelación lenta; Se evaluó el desarrollo embrionario en el 75 % de los embriones vitrificados ($n=4$); el 20 % de los embriones fueron sometidos a congelación lenta ($n=1$). No se observaron diferencias significativas en los grupos respecto al desarrollo embrionario, pero sí mayor tendencia de supervivencia en los embriones vitrificados. Igualmente, uno de estos embriones vitrificados fue transferido a una receptora, se logró una preñez viable y el nacimiento de un potro vivo. Se han reportado tasa de preñez de 26% para embriones equinos obtenidos por ICSI. (Maclellan, Stokes, Preis y Carnevale, 2010).

Por otro lado, en varios estudios mencionan que las bajas tasas de preñez obtenidas de embriones producidos con oocitos vitrificados es debida a características morfológicas y funcionales únicas del oocito, como lo son su tamaño, el volumen de agua intracitoplasmática, la distribución de los organelos, la organización del citoesqueleto y la organización de la cromatina. (Azari et al., 2016; Sprícigo et al., 2014)

Fue demostrado en un estudio que la vitrificación de oocitos no afecta las tasas de escisión de cigotos (67,0% vs. 73,8% de control), pero si reduce la tasa de Blastocistos (9,6% frente a 23,0%), además en esta investigación observaron que los niveles de metilación del ADN en los oocitos y embriones de escisión temprana fue menor para los oocitos vitrificados (Chen et al., 2016). Se identificó que los oocitos inmaduros son más sensibles al estrés anisotónico, con una menor estabilidad de la membrana celular que los oocitos en metafase II (Leon et al., 2012; Xueli et al., 2015), aunque parece ser que las células del cumulo protegen al oocito de los daños de la criopreservación, En equinos se observó que los oocitos en metafase II con células del cúmulo conservan mejor la calidad del huso meiótico durante la vitrificación que los oocitos desnudos (38,1% vs 3,1% respectivamente) (Tharasanit, Colleoni, Galli, Colembrander y Stout, 2009).

Los oocitos inmaduros en la etapa de vesícula germinal (GV) tienen menor permeabilidad y estabilidad a la membrana que los madurados, lo que los hace menos tolerantes a la criopreservación.

Actualmente la criopreservación de oocitos equinos sigue siendo un desafío debido a su sensibilidad al estrés oxidativo, probablemente como consecuencia del contenido sustancial de lípidos en las mitocondrias y el retículo endoplásmico liso. Además, aunque no están bien caracterizados, los oocitos equinos tienen aparentemente una pobre permeabilidad a los crioprotectores (Leon et al., 2012). Asimismo, altas concentraciones de crioprotectores son

tóxicas para las células, sin embargo, el impacto de la toxicidad se ha logrado reducir a través del uso de bloqueadores de formación de hielo sintéticos adicionados a las soluciones de vitrificación. En un trabajo en equinos se usó el bloqueador supercool X-1000 (21st Century Medicine Inc.) y se logró obtener mayores tasas de maduración y mejor integridad de membrana con los oocitos tratados con el bloqueador 30% y 46% que con los no tratados 13% y 31% (León et al., 2012). Los bloqueadores de hielo sintéticos mejoraron la tasa de supervivencia de los oocitos debido a su capacidad para unirse a la membrana celular e impedir la formación de cristales de hielo (León et al., 2012).

Sin embargo, una alternativa para mejorar la supervivencia de oocitos después de la vitrificación es la selección de oocitos competentes para la crioconservación por medio de la evaluación morfológica. El azul brillante de cresilo (BCB) es una técnica de tinción supravital que se ha utilizado para identificar con éxito los oocitos más competentes en bovinos y equinos (Pereira et al., 2014). La técnica BCB estima la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), una enzima que se sintetiza en los oocitos en crecimiento, pero se disminuye su actividad cuando los oocitos han terminado su fase de crecimiento. (Villamil, Ongaratto, Moreira, Taranco y Bó, 2016).

Los oocitos expuestos al BCB muestran una coloración azul cuando el citoplasma tiene bajos niveles de G6DPH, esta tinción es una herramienta que puede mejorar la evaluación visual de los oocitos y proporciona una mejor escogencia de los grupos de oocitos competentes para ser vitrificados (Hajarian et al., 2010). En una investigación encontraron que los oocitos vitrificados expuestos al BCB alcanzaron estadio MII más rápido que otros grupos vitrificados (51,5% - 40,3%). Estos resultados indican que la selección de oocitos inmaduros usando BCB podría mejorarla madurez nuclear después de la vitrificación. (Hajarian et al., 2010).

En varios estudios no se han encontrado diferencias entre las técnicas de congelación lenta y vitrificación para la criopreservación de embriones equinos menores de 300 μm ; con resultados que varían entre el 50 y 70% de preñez. (Squires, 2016; Martins et al., 2005; Díaz et al., 2015; Sánchez et al., 2017).

A medida que el tamaño del embrión aumenta más allá de las 300 μm , la supervivencia del mismo después de la criopreservación se hace menos viable obteniendo diferentes resultados bastante desalentadores para ambas técnicas (Squires, 2016; Diaz et al., 2015; Hendriks, Roelen, Colenbrander y Stout, 2015), entre las causas que se le adjudican al bajo resultado de la criopreservación de embriones equinos mayores a 300 μm , se encuentran el mayor tamaño y volumen del blastocelo (Díaz et al., 2015; Squires, 2016; Sanchez et al., 2017), la intensa actividad mitótica y por tanto el rápido aumento celular (Diaz et al., 2015; Squires, 2016; Sanchez et al., 2017) y la presencia de la cápsula de glicoproteína embrionaria. (Díaz et al., 2015; Squires, 2016; Sánchez et al., 2017).

La cápsula embrionaria se desarrolla al día 6.5 poco después de que el embrión entra en el útero, coincidiendo con el inicio de la blastulación (Díaz et al., 2015), por tal razón para obtener embriones sin que se haya formado la capsula deben recuperarse al rededor del día 6 o 6.5 post ovulación, estando en fase de mórula o blastocisto temprano, lo cual dificulta la búsqueda y disminuye la tasa de recuperación. (Díaz et al., 2015; Squires, 2016; Sánchez et al., 2017).

No obstante, las funciones de la cápsula no han sido completamente dilucidadas se sabe que es fundamental para la viabilidad embrionaria (Díaz et al., 2015); pero parece ser que la baja permeabilidad de dicha cápsula es el principal obstáculo para el éxito de la criopreservación (Diaz et al., 2015). Por tal motivo la punción de la cápsula se presenta como una alternativa factible para la crioconservación de embriones con presencia de la capsula.

Hendricks et al. (2015) en su investigación evaluó la cantidad y tipo de daños causados por la congelación lenta y la vitrificación en la integridad celular y la actividad mitocondrial (indicativo de la capacidad metabólica) en embriones equinos menores y mayores de 300µm. Ambas técnicas de criopreservación mostraron altas tasas de daño en embriones mayores de 300µm, sin diferencias significativas entre ellas (53.3% +/- 27% y 26.3% +/-18.5% para la vitrificación y CL respectivamente).

Similarmente Tharasanit et al. (2009) encontraron que 19.9% de células dañadas después de la CL para embriones mayores de 300µm. Aunque no encontraron Diferencias en la proporción de embriones que se desintegraron entre la CL (6/15, 40%) y la vitrificación (2/14, 14%).

Por otro lado, la exposición de los embriones mayores de 300µm a crioprotectores de vitrificación resultó en tasas más altas de muerte celular que la exposición a la crioprotectores para congelación lenta (6.8% vs 0.3%).

Hendricks et al. (2015) también encontró que para embriones menores de 300µm, tampoco hubo diferencias significativas para ambas técnicas (3.3% para la congelación lenta vs 19.9% para la vitrificación); Resultado comparable con lo descritos por Moussa et al. (2005; 42% congelación lenta y 46% para la vitrificación) y Oberstein et al. (2001; 26% congelación lenta y 49% Vitrificación) al igual que Sánchez et al. (2017; 55.7% Vitrificación 75% Congelación Lenta).

Ante este panorama de resultados negativos de crioconservación de embriones mayores de 300µm, se ha venido desarrollando una alternativa que consiste en el colapso de la cavidad del blastocele antes de la vitrificación. (Diaz et al., 2015; Squires, 2016; Sánchez et al., 2017) Choi et al. (2011) lograron tasas de preñez del 71% para embriones mayores de 300µm, después de punción del blastocisto y aspiración del líquido del blastocele. (Diaz et al., 2015; Sánchez et al., 2017).

Díaz et al. (2015) Reportaron tasas de preñez del 83.3% y el nacimiento de potros sanos después de la transferencia de 6 embriones equinos de día 8 mayores de 300µm, colapsados, vitrificados y calentados (Sánchez et al., 2017).

Recientemente Ferris, McCue, Trundell, Morrissey y Barfield (2016) informaron sobre un método para colapsar manualmente embriones mayores de 300µm, antes de la vitrificación. Confrontaron la técnica estándar con micromanipulador vs la técnica manual utilizando una aguja calibre 25 para perforar la cápsula y retirar el fluido del blastocelo; obtuvieron 11 de 15 preñeces mediante el método del micromanipulador y 7 de 15 preñeces para la técnica Manual. (Squires, 2016).

Sánchez et al. (2017) adquirieron tasas de preñez del 70% de embriones mayores de 300µm, colapsados y vitrificados en hemipajuelas.

Los resultados que podemos observar en la Tabla 3 evidencian que la técnica de aspiración del blastocelo se presenta como una alternativa eficiente para la vitrificación de embriones equinos mayores de 300µm, resultados alentadores para desarrollar futuras investigaciones y perfeccionar dicha técnica.

Tabla 3. Producción de embriones In vivo e In vitro con criopreservación congelación lenta y vitrificación. (Villamil et. Al 2012).

Sistema de producción de embriones	Sistema de criopreservación	Embriones #	Re- expansión n (%)	Eclosión n(%)
In vivo	Congelación lenta	100	86 (86)	81 (81)

	Vitrificación	110	93 (85)	78 (71)
In vitro	Congelación lenta	222	89 (40)	45 (20)
	Vitrificación	223	155 (69)	132 (59)

En la tabla 4 podemos evidenciar mayor porcentaje en cuanto a Morfología y supervivencia tanto en las 24 horas y 72 horas pos congelación de los embriones con el método de congelación OPS, ya que este método alcanza tasas de enfriamiento de más de 20.000°C/min, por lo que disminuye los daños tóxicos y osmóticos en las células (Vajta et ál. 1998).

Tabla 4. Comparación de la morfología y supervivencia de los embriones según el método de conservación (xueli et al 2010)

Métodos criopreservación	# de embriones	Morfología Normal/descongelados %	Supervivencia embriones %	
			24 h	72 h
Congelación lenta	155	75.8 ± 6.1	46.9 ± 3.7	24.7 ± 5.4
OPS	153	87.9 ± 5.2	58.0 ± 6.8	35.2 ± 6.0
CPS	158	85.4 ± 4.9	56.3 ± 4.4	34.9 ± 6.7

Se puede evidenciar en la tabla 4 la comparación existente de la morfología y supervivencia de los embriones según el método de criopreservación, congelación lenta, OPS y CPS, donde se puede deducir que con la criopreservación de OPS se obtuvo mayor porcentaje tanto de la morfología normal como la supervivencia al momento de descongelación de los embriones.

Tabla 5 Comparación de la morfología y supervivencia de los embriones según el método de conservación (Xueli et al 2010)

Método criopreservacion	# de embriones	Morfología Normal/descongelados %	Supervivencia embriones %	
			24 h	72 h
Congelación lenta	63	87.7 ± 7.1	52.3 ± 2.6	27.5 ± 5.7
OPS	68	88.6 ± 7.1	63.4 ± 7.7	38.7 ± 5.4
CPS	67	86.3 ± 5.5	63.4 ± 8.6	37.2 ± 3.8

En la Tabla 5 se puede observar un alto porcentaje en Morfología de los embriones con el método de congelación OPS, ya que este método alcanza tasas de enfriamiento de más de 20.000°C/min, por lo que disminuye los daños tóxicos y osmóticos en las células (Vajta et ál. 1998), pero en este caso el porcentaje para supervivencia a las 24 horas pos congelación en los métodos de OPS y CPS son similares pero a las 72 horas pos congelación sigue siendo el método OPS con el porcentaje más alto.

Tabla 6 Tasas de desarrollo embrionarios según el metodo de criopreservacion (Vanhuong et al., 2017)

Protocolo	Blastocisto descongelado N	Blastocisto re expandidos a las 24 h N /%	Tasa de eclosion a las 48h blastocistos descongelados N/%	Tasa de eclosion a las 48h blastocisto expandido N/%
Control	51	51	50 (98)	50 (98)
Congelación lenta	47	42	31 (66)	31 (73)
Vitrificación equilibramiento lenta	57	49	46 (90)	46 (93)
Vitrificación equilibramiento lenta	50	48	42 (84)	42 (87)

Las tasas de desarrollo embrionario son menores para los embriones in vitro comparado con los in vivo debido a sus diferencias morfológicas, metabólicas y genómicas. Los embriones producidos in vitro durante la crioconservación sufren mayor estrés osmótico gracias al mayor número de lípidos en la membrana celular y a la menor flexibilidad, lo que los hace menos tolerantes a las bajas temperaturas. Los lípidos son una fuente importante de energía durante la maduración de oocitos, la fertilización y la escisión temprana del embrión. Los triglicéridos son la principal clase de lípidos sintetizados en los oocitos y los embriones bovinos. Blastocistos bovinos producidos in vitro tienen citoplasma más oscuro como

consecuencia de una mayor acumulación de lípidos que embriones derivados in vivo; Esto se asocia con deterioro de la calidad del embrión, y la reducción de la criotolerancia. (Barceló y Seidel, 2011)

Es por esto que hay mayores tasas de supervivencia en embriones producidos in vitro cuando se usa el método de vitrificación comparado con la congelación lenta (59 % - 20 % respectivamente; Villamil et al., 2012; 60% - 31%; Tabla 3; Nedambale et al., 2004; 93% - 73%; Tabla 6; Vanhuong et al., 2017; 35% - 24%; Xueli et al., 2010; Tabla 4).

Edward L. Squires, Patrick M. McCue en el 2016 en su investigación obtuvieron de 13 hembras transferidas 9 preñeces alcanzando un 69% de éxito con la transferencia de embriones convencional.

Un estudio donde se observaron las tasas de escisión y desarrollo de blastocistos de cigotos en estadios pronucleares, lo cual los hace similares en estructura a los oocitos, mostro que la técnica de vitrificación tiene mejores tasas en comparación con la congelación lenta (54%-22% vs 8,6%- 4.9% respectivamente). (Vanhuong, Walton, Catt y Robinson, 2017)

CAPITULO 3

Impacto de las técnicas de transferencia de embriones en los sistemas equinos.

La aplicación y desarrollo de la vitrificación representa una alternativa competitiva para la criopreservación de embriones, afirmación reseñada por autores como Dobrinsky (2002) y Papadopoulos et al. (2002), Esta técnica elimina la formación de cristales de hielo, una de las causas más peligrosas de daño celular post criopreservación (Vajta y Kuwayama, 2006), a su vez no altera el consumo de glucosa y piruvato por el embrión (Kaidi et al., 2001). Por tales motivos, se considera una técnica práctica y eficiente para la criopreservación de embriones y fundamental para el uso de la transferencia de embriones (Martínez et al., 2002).

Angel y Bran mencionan en su investigación en el 2010 que, en Colombia, son empleadas de manera rutinaria técnicas como la inseminación artificial (IA) (utilizando semen fresco, refrigerado o criopreservado) y la transferencia de embriones (TE), con el interés de aumentar el número de crías de determinados ejemplares o mejorar el desempeño reproductivo de estos. La transferencia de oocitos (TO) y la transferencia intraoviductal de gametos (TIG), son utilizadas en algunos países en yeguas con disfunción reproductiva; Estas técnicas tienen menor aplicabilidad en nuestro medio. La producción de embriones in vitro, junto a la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), o la clonación por transferencia nuclear, han sido realizadas en la especie, a nivel de investigación básica, o comercialmente en algunos países con altos costos, y no representan hoy una herramienta para el área clínica de campo en el país, pero son de gran interés para el conocimiento de la fisiología, de disfunciones reproductivas y del desarrollo en la especie.

La ICSI proporciona las siguientes ventajas sobre la TO: el semen usado puede ser congelado o fresco y sus cambios en motilidad no interfieren, se disminuye el riesgo de

endometritis pues la yegua no es inseminada, asimismo, no es necesario someter a la receptora a aspiración folicular. Mediante ICSI es posible tratar cada oocito individualmente, hasta que alcance estado de blastocisto y pueda ser transferido a una receptora, con la posibilidad que cada uno de ellos genere un potro, mientras que con la TO son transferidos a receptoras muchos oocitos posiblemente inviiables, que no formarán blastocistos. De otro lado, al realizar la ICSI se corre el riesgo de lisar el oocito y las tasas de clivaje son menores en comparación con la fertilización *in vivo*. También, el costo del proceso es muy alto si se compara con técnicas como TE o TO (Tabla 7).

Tabla 7 Complejidad, costo y tasa de éxito de las TRA en la práctica equina (Ángel D., Bran

PROCEDIMIENTO ^a	COMPLEJIDAD	COSTO	TASA DE ÉXITO (%)
T.E.	+	X*	33-38 ^b
T.O.	++	1.25-1.5 X	23-27 ^b
I.C.S.I	+++	1.5-2.0 X	13-18 ^c

^aTE – Transferencia embrionaria, TO – transferencia de oocitos,

ICSI – inyección intracitoplasmática de espermatozoide.

^bTasa de éxito basada en tasa de colección y tasa de preñez

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

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

J.,2010).

En la tabla 7 se observa que en la T.E. es menos complejo y su tasa de éxito es mayor en comparación con la ICSI.

Martínez N., Pinzón J. et.al, en el 2014 en su investigación realizaron un procedimiento de crío preservación de embriones equinos, a fin de conseguir una preñez viable. Se colectaron embriones equinos al día 6-6,5 ($< 300 \mu\text{m}$; $n = 24$) y se sometieron a dos técnicas de crío preservación: grupo 1 ($n = 12$), vitrificados exponiéndolos a una solución VS1 (Gli [1,4 M]) 5 min, VS2 (Gli [1,4 M] + EG [3,6 M]) y VS3 (Gli [3,4 M] + EG [4,6 M]) 1 min, empacándolos y congelándolos en nitrógeno líquido grupo 2 ($n = 12$), congelación lenta: expuestos a una solución de congelación (1,8 M de EG + 0,1 M sucrosa) por 10 min, empacados en pajillas de 0,25 ml, llevados al congelador de embriones, exponiéndolos a una curva de congelación y sumergidos en nitrógeno líquido. Posterior a la descongelación, a los 24 embriones se les removió el crío protector mediante un paso; fueron sumergidos en medio de cultivo DMEM/F12 + 10 % de suero fetal bovino (SFB) e incubados bajo atmósfera controlada (5 % CO₂, 5 % N₂, 90 % O₂) por 48 h. Se evaluó el desarrollo embrionario en el 75 % de los embriones vitrificados ($n = 4$); el 20 % de los embriones fueron sometidos a congelación lenta ($n = 1$). Donde observaron mayor tendencia de supervivencia en los embriones vitrificados, ya que presentaron un desarrollo adecuado luego de 48 h de cultivo in vitro; esto llevó a obtener el primer reporte de la preñez y el posterior nacimiento del potro por medio de este método. Esta técnica es de mayor valor práctico, debido a que no se requieren equipos costosos para su realización.

Se realizó un total de 37 colectas de las cuales se recuperaron 24 embriones, lo que llevó a obtener una tasa de recuperación del 64.8 % (tabla 8), del total de 24 embriones 4 fueron clasificados como morula y 20 como blastocisto temprano. Los embriones se dividieron

aleatoriamente en 2 grupos. Grupos vitrificación (GV) (n=12) y grupo congelación lenta (CL) (n= 12).

Tabla 8 Estado de desarrollo y calificación de los embriones precriopreservado (Martinez N., Pinzon. et al., 2014).

Estado de desarrollo	No de embriones	Calificación morfológica	Vitrificación	Congelación
Mórulas	4/24	Excelente	2	2
Blastocistos	20/24	Excelente	10	10
Total			12	12

En la tabla 8 se puede deducir que para obtener un mejor resultado se debe trabajar con un desarrollo del embrión en Blastocisto.

En el momento de la descongelación o el calentamiento de los embriones, se evaluo la morfología y calificación de cada uno, en las dos técnicas se observó la ruptura de la zona pelucida (ZP) de algunos embriones y se presentó disminución de la calidad del embrión determinado por un aumento de las células extruidas y por la presencia de áreas oscuras en el citoplasma (picnosis) que se consideraron indicativos de daño celular.

TABLA 9 clasificación de los embriones porcriopreservados (vitrificación y congelación lenta) después de su calentamiento (Martinez N., Et. Al., 2014).

Calidad	Vitrificados	Ruptura	Congelados	Ruptura Zp
1	0		0	
2	4	2	3	1
3	0		2	
Total	4		5	

El total de los embriones obtenidos en el estudio fue de 24, de los cuales solo se pudo medir la viabilidad de 9 de ellos, 4 de la técnica de vitrificación y 5 de la técnica de congelación lenta, por medio de cultivo in vitro, debido a las pérdidas presentadas al momento de la manipulación y la exposición al medio ambiente, la ruptura de la ZP de las dos técnicas utilizadas no fueron significativas.

Tabla 10 resultados de desarrollo in vitro de embriones equinos criopreservados por dos metodos. (Martínez n., Pinzón j. et al., 2014).

Vitrificación			Congelados		
ID embriones	Desarrollo a blastocisto Expandido	Clasificación morfológica	ID embriones	Desarrollo a blastocisto expandido	Calidad
1	+	1	1	+	2
2	-	3	2	-	2
3	+	1	3	-	2
4	+	2	4	-	2
			5	-	2

Se evaluaron 9 embriones, 5 congelados y 4 vitrificados, de los cuales los congelados se cultivaron en DMEM/f12 + 10% SFB a una temperatura de 38.5 °C en una atm controlada, para evaluar el desarrollo embrionario, en el que se evidencio el desarrollo a blastocisto expandido después de 48 h de cultivo, para los vitrificados se evidencio el desarrollo en el 75% (3/4), mientras que para los congelados se observó el desarrollo en el 20% (1/5); en este grupo se estallaron 4 pajillas (90%) al sacarlas del termo de congelación lo que provoco un mayor tiempo de exposición al medio de congelación.

Guillermo Vizuite en el 2016 en su estudio comparó diferentes protocolos de criopreservación de embriones equinos. Para ello, se utilizaron 14 embriones de yeguas H-a y 12 embriones de burra (de raza Andaluz y Zamorano-leones) que fueron distribuidos en 3 grupos. En los embriones de caballo se compararon 3 métodos: grupo 1 (n=5), congelación convencional en etilenglicol 1.5M y pajueta de 0.25 ml; grupo 2 (n=5), vitrificación en glicerol y etilenglicol en Fibreplug y superficie "superfría" (CMV, CryoLogic); y grupo 3 (n=4), vitrificación en glicerol y etilenglicol en pajueta de 0.25 ml. En el caso de la burra, se compararon 3 grupos de embriones criopreservados de la siguiente manera: grupo 1 (n=4), congelación convencional en etilenglicol 1.5M y pajueta de 0.25 ml; grupo 2 (n=4), vitrificación en glicerol y etilenglicol, envasados en Fibreplug y CMV; y grupo 3 (n=4), vitrificación en etilenglicol, utilizando Fibreplug y CMV. Para evaluar el daño sufrido tras los diferentes protocolos de criopreservación utilizados, los embriones fueron teñidos con DAPI, TUNEL y faloidina mediante microscopia confocal. Se apreció una pérdida de calidad morfológica entre los diferentes grupos tras el proceso de criopreservación. Los porcentajes de muerte celular y apoptosis fueron mayores en los embriones de caballo vitrificados que en los congelados. Sin embargo, los embriones de asno vitrificados mostraron un índice más

bajo de muerte celular y apoptosis. En cuanto al citoesqueleto, no se observaron diferencias entre los grupos evaluados y todos los embriones mostraron un grado I o II de citoesqueleto. La vitrificación empleando Fibreplug y superficie sólida alcanzó mayores tasas de viabilidad celular en los embriones de caballo. Los embriones equinos fueron más susceptibles a la vitrificación que a la congelación convencional. En burro, la congelación embrionaria indujo un mayor daño celular que la vitrificación, aunque las diferencias no fueron significativas. Los resultados *in vitro* obtenidos sugieren que la vitrificación es el mejor método para criopreservar embriones de burro, aunque es necesario continuar los estudios para corroborar estos hallazgos.

Braga R., Crusco S. 2017, los resultados de su estudio apuntaron a aspectos relevantes con respecto a la sincronización del estro, la inseminación artificial *in vivo* o *in vitro* y la técnica quirúrgica de la transferencia de embriones (inyección intrauterina) por ecografía. En conclusión, la inyección intrauterina es un método alternativo de transferencia de embriones con tasas de preñez similares a los métodos comunes y puede ser una opción valiosa para las yeguas con histórico de dificultad de transposición del cuello del útero durante el procedimiento de la transferencia de embrión.

Un estudio reciente realizado por Cuervo-Arango y col. en el programa comercial de la Universidad de Utrecht (2018), comparó las tasas de preñez obtenidas mediante transferencia convencional y transferencia con pinza de Wilsher con diferentes operadores y con diferencias de experiencia en transferencias entre ellos, observándose en promedio una tasa de preñez significativamente mayor con esta última (92,3% vs 70,9%). Además, observaron que la influencia del grado de experiencia práctica del operador que realiza la TE, sobre la tasa de preñez parece reducirse significativamente con la técnica de Wilsher en comparación

con la no quirúrgica tradicional. Dos especialistas con gran experiencia previa en TE con el método convencional obtuvieron tasas de preñez de 78.8% y 79.7% respectivamente versus tres especialistas con poca o ninguna experiencia con el método de Wilsher que obtuvieron 93.4%, 91.2% y 90.9% de preñez respectivamente (Cuervo Arango *et al.*, 2018).

En tal sentido, todos los estudios de criobiología tanto en embriones de animales de laboratorio como de animales de granja realizados fuera de nuestras fronteras, avalan la aplicabilidad potencial, a nivel nacional, de la técnica novedosa de vitrificación, logrando un aporte para la incorporación en nuestro país de biotecnologías avanzadas aplicadas a la reproducción y proporcionando una vía opcional de preservación de embriones con porcentajes óptimos de viabilidad, siendo además una técnica sencilla, de fácil ejecución y costo-eficiente

CONCLUSIONES

- La utilización de la biotecnología reproductiva es una realidad en cualquier sistema de producción de equino de mediana a alta complejidad, comenzando por la utilización masiva de la IA, la ultrasonografía reproductiva hasta la TE. Las Biotecnologías Reproductivas de mayor complejidad como ICSI y TIG, son de muy alto costo operativo, por ello actualmente son dirigidas a una élite de individuos de alto valor genético, económico o afectivo y ofrecen hoy herramientas para solucionar problemas de infertilidad puntuales e individuales o sirven para generar conocimiento en investigación básica; sus resultados mejoran con el incremento de experimentos controlados trasladables a sistemas reales. De otro lado, la TE, la criopreservación y algunas variaciones en la IA son técnicas bastante interesantes para el desarrollo productivo en la industria equina, en nuestro medio, siempre y cuando su utilización responda a criterios serios, científicos y de responsabilidad ética profesional.
- Tanto la congelación convencional como la vitrificación, muestran índices de preñez cada vez más elevados para embriones de pequeño tamaño, (200 μm) aunque a día de hoy, ninguna de las técnicas rinde resultados aceptables para la congelación de embriones de mayor tamaño (>200 μm).
- La eficacia reproductiva en la especie equina ha obtenido durante los últimos años un gran beneficio por la aplicación de biotecnologías reproductivas como las diferentes técnicas utilizadas de transferencia de embriones que han alcanzado

gran impacto en los sistemas productivos. Un buen ejemplo de esto son las yeguas ganadoras en las pistas de exposición y animales deportistas, donde después de terminar la temporada de competencia pasan como donadoras a centros de transferencia embriones. De esta manera se han podido obtener múltiples descendientes de estas yeguas sin interrumpir su carrera deportiva o de exposición, también por medio de este tipo de biotecnología se puede brindar la capacidad de obtener preñeces de hembras de edad avanzada o senil, pero de gran valor genético.

- Es importante tener presente que estas técnicas, son herramientas que deben ser integradas de manera adecuada a otras áreas de la producción equina, y que los profesionales deben ponerlas al servicio del conocimiento, para que ellas no constituyan un fin por sí mismas. La utilización de una TRA está sujeta a una decisión profesional, que debe ser basada en conceptos científicos amplios, pues a veces los fracasos en las técnicas pueden deberse al desconocimiento de otros factores importantes para la reproducción como la nutrición, selección genética o el manejo administrativo y sanitario de una unidad productiva.
- En Colombia el uso de la técnica de transferencia embrionaria en equinos ha sido lenta debido a falta de capacitación de los profesionales del área, falta de interés del sector equino, los altos costos y su baja efectividad.
- Son muchos los factores que afectan el éxito de un programa de congelación de embriones, entre ellos los de mayor importancia es la calidad y el estadio de desarrollo del embrión recuperado. Un mayor conocimiento en la sincronización de la donante y una mejora en los tratamientos de superovulación permitirán un mayor rendimiento de los métodos actuales.

Recomendaciones

- Es de vital importancia la capacitación y actualización constante de los profesionales y técnicos, así como fortalecer la sinergia entre la investigación y la aplicación en campo de la técnica evaluando y mejorando constantemente la misma para obtener mejores resultados.
- Es necesario fomentar la investigación en técnicas de transferencia de embriones en equinos, evaluando y ajustando constantemente la técnica para mejorar la efectividad, la calidad del producto, disminuir los costos y aumentar el uso de la misma fortaleciendo el progreso genético de la caballada colombiana.
- El uso de las biotecnologías reproductivas permite el avance en el mejoramiento genético, aumentar el número de crías por año de ejemplares de alta calidad, obtener crías de animales sin interrumpir su desempeño en actividades de competencia.

Referencias

- Acevedo. (2013). eficacia de un tratamiento de superovulacion en yeguas finas sangre chilena. Obtenido de <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131786/eficacia-de-un-tratamiento-de-superovulacion-en-yegua-fina-sangre-chilena.pdf?sequence=1>
- Aguilar J., W. G. (1997). embryo transfer in horses indications technique and expected outcomes in youngquist rs ed,. 208-213.
- Almodin C. G.; Minguetti-Camara V. C.; Paixao C. L.; Pereira P. C., 2010: Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. Human Reproduction, (25) 1192-1198. Recuperado de [https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/13666/2016000001442.pdf?sequence=3 &isAllowed=y](https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/13666/2016000001442.pdf?sequence=3&isAllowed=y).
- Aurich C., (2011): Reproductive cycles of horses. Animal Reproduction Science, (124) 220-228.
- Azari, M., Kafi, M., Ebrahimi, B., Fatehi, R., Jamalzadeh, M. (2016). Oocyte maturation, embryo development and gene expression following two different methods of bovine cumulus-oocyte complexes vitrification. Veterinary Research Communication, 41, (1), 49 - 56. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/311566682_Oocyte_maturation_embryo_d
- Budras, K., Sack, W., Rock, S. (2009). *pelvis inguinal region and urogenital organs*. Obtenido de anatomy of the horse : <http://www.ridaa.unicen.edu.ar>

- Cabrera, p., Fernández , a., & bastidas , p. (2006). Vitricación: Una Alternativa para la Criopreservación de Embriones. Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Recuperado el noviembre de 2018, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-65762006000100003&lng=es&tlng=es.
- Carnevale ek, m. l. (2006). collection, evaluation, and use of oocytes in equine assisted reproduction. vet clin equine. 843-856. Obtenido de <http://www.ridaa.unicen.edu.ar>.
- Castaño, d., Gomez , j., oquendo, & moncada, h. (2008). transferencia de embriones en equinop evaluacion de un programa.
- Chen, H., Zhang, L., Deng, T., Zou, P., Wang, Y., Quan, F., et al. (2016). Effects of oocyte vitrication on epigenetic status in early bovine embryos. Theriogenology, 86, (3), 868 - 878. Recuperado de [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(16\)00125-4/pdf](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(16)00125-4/pdf)
- Cuervo-Arango J, Claes, A.N., Stout, T.A. (2018). The effect of embryo transfer technique on the likelihood of pregnancy in the mare: a comparison of conventional and Wilsher forceps assisted transfer. Veterinary Record (en prensa).
- Colazo M.G., Mapleloft , R.J. (s.f.) Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos ciencias veterinaria. 9(1). Recuperado de: <http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/n09a03colazo.pdf>
- Da Silva , c. (2008). when should a mare go for assisted reproduction theriogenology;. 441-444. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691x08002690>

- Davies , m. (2005). anatomía de la reproducción de la yegua. 1-16. Obtenido de <http://www.ridaa.unicen.edu.ar>.
- Diaz, F., Bondioli, K., Paccamonti, D., Gentry, G. (2015). Cryopreservation of day 8 equine embryos after blastocyst micromanipulation and vitrification. *Theriogenology*, 85(5), 894 - 903. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26639642>
- Guarda, m. (2010). descripción de la asociación entre la ovulación y la fijación del embrión en el cuerno uterino en yeguas fina sangre de carrera. Obtenido de descripción de la asociación entre la ovulación y la fijación del embrión en el cuerno uterino en yeguas fina sangre de carrera, recuperado de <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131192/descripción-de-la-asociación-entre-la-ovulación-y-la-f>
- Hendriks, W., Roelen, B., Colenbrander, B., Stout, T. (2015). Cellular damage suffered by equine embryos after exposure to cryoprotectant for cryopreservation by slow- freezing or vitrification. *Equine veterinary journal*, 47 (6), 701 - 707. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25187202>
- Hinrichs k. (2006). equine cloning. *vet clin equine*; 22:857-866 recuperado <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17129808>
- Instituto colombiano agropecuario. ica. (2017). censo pecuario nacional recuperado de: <https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/epidemiologia-veterinaria/censos-2016/censo-2017.aspx>
- Kuwayama M.; Kato O., (2000): All round vitrification for human oocytes and embryos recuperado de <https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/13666/2016000001442.pdf?sequence=3 &isAllowed=y>.

Leon, P., Campos, V., Corcini, C., Santos, E., Rambo, G., Lucia, J., et al. (2012).

Cryopreservation of immature equine oocytes, comparing a solid surface vitrification process with open pulled straws and the use of a synthetic ice blocker. *Theriogenology*, 77, (1), 21 - 27. Recuperado de [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(11\)00327-X/fulltext](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(11)00327-X/fulltext)

Losinno I, agular j. (2002). reproducción y biotecnologías en la producción equina, cátedra de producción equina, depto. producción animal, facultad de agronomía y veterinaria, universidad nacional de río cuarto.

Lane M.; Schoolcraft W. B.; Gardner D. K.; Phil D., (1999): Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and sterility*, (72) 1073-1078. Recuperado de <https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/13666/2016000001442.pdf?sequence=3&isAllowed=y>.

Le blanc, m. (1998). enfermedades del aparato reproductivo: la yegua. in: calahan, p.; mathew, i.; merritt, a.; moore, j. 4ª edición. american veterinary publication inc. california, estadosunidos. Recuperado [http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131786/eficacia-de-un-tratamiento- de-superovulacion-en-yegua-fina-sangre-chilena.pdf?sequence=1](http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131786/eficacia-de-un-tratamiento-de-superovulacion-en-yegua-fina-sangre-chilena.pdf?sequence=1)

Martins, R., Costa, E., Chagas, J., Ignácio, F., Torres, C., McManus, C. (2005). Effects of vitrification of immature bovine oocytes on in vitro maturation. *Animal Reproduction Science*, 2, (2), 128 - 134. Recuperado de <http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v2n2/AR041.pdf>

- Ministerio de agricultura (2014) ministerio de agricultura y desarrollo rural cadena equina, asnal y mular”” recuperado:
<https://sioc.minagricultura.gov.co/equino/documentos/005%20-%20documentos%20técnicos/diagnostico%20cadena%20equina,%20asnal%20y%20mular.pdf>
- Marimonte a. (2016). efecto de la edad y categoria reproductiva de la yegua sobre el estado de desarrollo y viabilidad in vitro de embriones tempranos, recuperado de www.ridaa.unice.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/1570/tesis%20doctoral%20
- Maclellan, L., Stokes, J., Preis, K., Carnevale, E. (2010). Vitrification, warming, ICSI and transfer of equine oocytes matured in vivo. *Animal Reproduction Science*, 121, (1), 260 - 261. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/285119773_Vitrification_warming_ICSI_and_transfer_of_equine_oocytes_matured_in_vivo
- Martínez, N. N., Pinzón, J. E., porras , J. L., Perez, J. N., buitrago, E. R., Zambrano, J. L., & Jimenez, C. (2014). Criopresrvacion de embriones equinos y primer resporte de un potro de raza criolla colombiano nacido por transferencia de un embrion equino vitrificado. *cielo*, 1-12.
- M. miragaya, (2001) facultad de ciencias veterinarias, area de teriogenologia, universidad de buenos aires, buenos aires, argentina.
- M. luciana, (2017) alteraciones cervicales en yeguas madres y su repecucion sobre la fertilidad tomado de url <http://www.ridaa.unicen.edu.ar>.
- Mc kinnon ao, carnevale em, squires el. (1988). heterogeneous and xenogenous fertilization of in vivo matured oocytes. *journal of equine veterinary science*; 8(2):143-147.recuperado de

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080686800041>

Morel, (2005). anatomía de la reproducción de la yegua, pp. 2-15. manejo de la monta, pp. 172-173. infertilidad, pp. 315-333. fisiología de la reproducción de los équidos, cría y manejo de la yeguada, 2º edición. editorial acribia.
recuperado de url <http://ridaa.unicen.edu.ar>

McKINNON, A. y SQUIRES, E. (1993). Transferencia Embrionaria en el Equino. Clinicas Veterinarias de Norteamérica. Práctica Equina. Editorial InterMédica. Buenos Aires, Argentina. Páginas 193-227.

Nishikawa, Y. (1976). Results of conception test of frozen horse semen during the past ten years. Proc Internat Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination. 4 : 1034.

Paredes e., (2016) equisan veterinaria equina integral recuperado,
<http://www.equisan.com/images/pdf/ovulacion.pdf>.

Quevedo. J. (2002). Biotecnología Reproductiva en Equinos de Paso Colombiano de la Sabana de Bogotá. Informe de Práctica Rotativa. Trabajo de Grado, para optar el Título de Médico Veterinario. Universidad de La Salle. Bogotá. Colombia.

Quevedo d., (2010), transferencia del embrión a diferentes días de la ovulación de la receptora y su impacto sobre la fertilidad en protocolos de transferencia de embriones en equinos, recuperado de
<http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/6339/t13.10%20q39t.pdf?sequence=>

Ruiz, A. F. (2017). Anatomía y fisiología del aparato genital de la yegua. *genbiogan*.
Obtenido de <https://www.genbiogan.com/single-post/2017/01/30/anatomía-y-fisiología-del-aparato-genital-de-la-yegua>

- Riha J.; Landa V.; Kneissl J.; Matus J.; Jindra J.; Kloucek Z., (1991): Vitrification of cattle embryos by direct dropping into liquid nitrogen and embryo survival after nonsurgical transfer. *Zivocisna Vyroba-UVTIZ (CSFR)*.
- Slade NP, Takeda T, Squires EL, Elsdon RP, Seidel GE Jr. (1985) *Theriogenology* 24, 45-58. A new procedure for the criopreservation of equine embryos
- Sanchez, R., Blanco, M., Weiss, J., Rosati, L., Herrera, C., Bolwein, H., et al. (2017). influence of embryonic size and manipulation on pregnancy rates of mares after transfer of cryopreserved equine embryos. *Journal of equine veterinary science*, 49, (1), 54 - 59. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080616304592>
- Sprícigo, J., Morais, K., Ferreira, A., Machado, G., Gomes, A., Rumpf, R., et al. (2014). Vitrification of bovine oocytes at different meiotic stages using the cryotop method: assessment of morphological, molecular and functional patterns. *Cryobiology*, 69,(2), 256 - 265. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25106744>
- Squires, Edward. (2016). Breakthroughs in Equine Embryo Cryopreservation. *The Veterinary clinics of North America: Equine practice*, 32, (3), 415 - 424. Recuperado de [http://www.vetequine.theclinics.com/article/S0749-0739\(16\)30039-6/abstract](http://www.vetequine.theclinics.com/article/S0749-0739(16)30039-6/abstract)
- Squires el. (2006). superovulation in mares. *vet clin equine*; 22: 819-830.recuperado <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17129805>
- Senger p. l. (2003). the organization and function of the female reproductive tract, pp 10-41. in: p. l senger. pathways to pregnancy and parturition, current conceptions inc., pullman tomado de la url <http://www.ridaa.unicen.edu.ar>
- Saragusty J.; Arav A., (2011): Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by

slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141 1-19

Stapper C. (2018), cual es el aporte de los equinos en el proceso económico Colombiano, portafolio recuperado de <https://www.portafolio.co/negocios/cual-es-el-aporte-de-los-equinos-al-progreso-economico-colombiano-520174>

Tharasanit, T., Colleoni, S., Galli, C., Colembrander, B., Stout, T. (2009). Protective effects of the cumulus - corona radiata complex during vitrification of horse oocytes. *Reproduction*, 137, (3), 391 - 401. Recuperado de <http://www.reproduction-online.org/content/137/3/391.full>

T.A.E. Stout (2006) *Equine Veterinary Journal* 38(5) 467-478. Equine embryo transfer: review of developing potential.

Vizuete G. ,2016 implementación de la vitrificación embrionaria en razas equinas como herramienta para su conservación y progreso, recuperado de <https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/13666/2016000001442.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

Villamil, P., Lozano, D., Oviedo, J., Ongaratto, F., Bó, G. (2012). Developmental rates of in vivo and in vitro produced bovine embryos cryopreserved in ethylene glycol based solutions by slow freezing or solid surface vitrification. *Animal Reproduction Science*, 9, (2), 86 - 92. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/64b9/b9a7f345e140d09178396f272b9a5b75bcb4.pdf>

Vanhuong, D., Walton, S., Catt, S., Robinson, A. (2017). A comparative analysis of the efficacy of three cryopreservation protocols on the survival of in vitro-derived cattle embryos at pronuclear and blastocyst stages. *Cryobiology*, 77, (1), 58 - 63. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28545999>

- Vajta G.; Kuwayama M., (2006): Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, (65) 236-244. Recuperado de [https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/13666/2016000001442.pdf?sequence=3 &isAllowed=y](https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/13666/2016000001442.pdf?sequence=3&isAllowed=y).
- Vanderzwalmen P.; Bertin G.; Debauche C.; Standaart V.; Schoysman E., (2000): "In vitro" survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocysts after vitrification in a hemi-straw (HS) system. *Fertility and Sterility*, 74 S215-S216.
- W.D. Eldridge-Panuska, V.Caracciolo di Brienza, G.E. Seidel Jr. , E.L. Squires, E.M. Carnevale (2005) *Theriogenology* (63), 1308-1318. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos
- Xueli, Y., Yakun, X., Wu, H., Xian, G., Xiao, L., Wen, H., et al. (2015). Successful vitrification of bovine immature oocyte using liquid helium instead of liquid nitrogen as cryogenic liquid. *Theriogenology*, 85, (6), 1090 - 1096.
- Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Successful+vitrification+of+bovine+immature+oocyte+using+liquid+helium+instead+of+liquid+nitrogen+as+cryogenic+liquid>