La inseminación artificial en la especie equina

Evaluación de la tasa de concepción

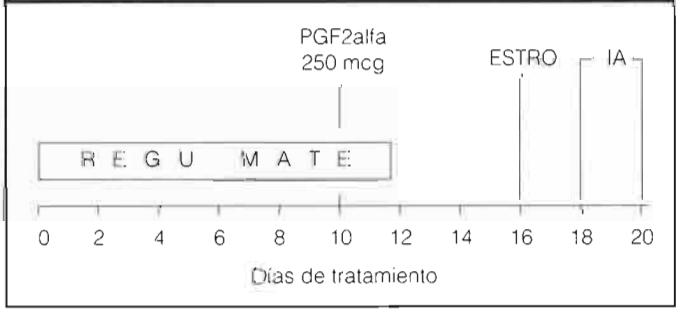
Pasquale Chiacchirini (1) - Mauricio Monaci (1) - Angela Polisca (1)
Gennaro Tortora (2) - Prospero Volpe (2)

PREMISAS

La metodología de la inseminación artificial en la yegua encuentra hace ya algunos años su aplicación práctica en numerosos países europeos y extraeuropeos. En Italia se emplea todavía escasamente, aunque mucha gente augura su mayor utilización, tanto en previsón de futuras reglamentaciones, como por el notable incremento que está experimentando la explotación equina de toda aptitud y destino (deportiva, alimenticia, agrícola).

CUADRO I

Tratamiento para la sincronización de los estros con Allyl Trenbolone (REGU MATE) y un producto de la PGF 2 alfa.



La inseminación artificial tiende indudablemente a mejorar la eficiencia reproductiva de la especie en cuanto: hace posible un empleo más racional de los reproductores; elimina los riesgos ligados a eventuales accidentes que pueden afectar al caballo semental y a la yegua durante la monta; permite evaluaciones más constantes del material seminal; ofrece la posibilidad de tener bajo estricto control infecciones y enfermedades coitales. Asímismo, cuando se practica la sincronización del celo, permite inseminar más yeguas en una misma jornada y con un solo eyaculado. Hay que recordar también que representa un medio válido para programar y realizar la mejora genética en plazos más breves, permitiendo el empleo de material seminal de alto valor genético aún después de una larga conservación.

En el estado actual, sin embargo, son dos por lo menos los obstáculos que se oponen a la difusión de esta metodología: la ausencia de adecuados centros encargados de la inseminación artificial y la negativa por parte de algunas asociaciones de raza a inscribir en los libros genealógicos a los potros nacidos con esta práctica.

La inseminación artificial se puede realizar empleando semen fresco, refrigerado y congelado (Leopold y Zironi, 1970; Klug et al., 1975; Tischner, 1975; Muller, 1982; Loomis et al., 1983; Cochran et al., 1984; Cristanelli et al., 1984; Douglas et al., 1984; Province et al., 1985; Arns et al., 1987; De Vries, 1987; Muller, 1987).

Allen et al. (1976), empleando semen fresco dentro de la hora después de la recogida y mantenido a 30-35 °C, han conseguido porcentajes de preñez del 50-60% en el primer ciclo estral y del 85-92% después de tres ciclos, contra el 75% de concepciones registradas por Von Lepel (1975) en el primer ciclo.Douglas et al. (1987) han obtenido el 59% de preñez en el primer ciclo estral, empleando material seminal refrigerado a +5°C y conservado durante 36 horas.

Generalmente los porcentajes de preñez que se consiguen con el empleo de semen congelado son significativamente inferiores respecto a los obtenidos con semen fresco, y ésto es debido verosímilmente a los daños que los espermatozoides sufren como consecuencia del proceso de congelación, como la pérdida de la integridad de la membrana acrosomial y la reducción de la motilidad (Black et al., 1989). Loomis (1983), utilizando muestras de semen fresco y congelado provenientes de un mismo caballo semental, refiere haber obtenido, en el primer ciclo estral, porcentajes de preñez del 66% y del 29% respectivamente, resultados confirmados también por Cochran (1984).

El objetivo del presente estudio ha sido el de comprobar la eficacia del método de la inseminación artificial, empleando semen fresco no diluído, sobre la base de las fertilizaciones conseguidas y en el estado del embrión extraído después de 7-8 días de la ovulación, a través de el flushing uterino.

METODOLOGIA

La investigación se ha llevado a cabo durante dos estaciones reproductivas consecutivas (mayo-agosto), empleando en su totalidad 60 yeguas de varias razas, de peso 450-650 kg y de edad comprendida entre los 4 y los 15 años. Las yeguas, clínicamente sanas, fueron sujetas a exámenes obstétrico-

(1) Instituto de Obstetricia y Ginecología Veterinaria de la Universidad de los Estudios de Perugia.

(2) Cátedra de Clínica Obstétrica y Ginecológica Veterinaria de la Universidad de los Estudios de Nápoles.

Fig. 1. Recogida del líquido seminal mediante vagina artificial.

ginecológicos por medio de estudios ecográficos (Tokyo-keiki LS-1000), tal como es descrito por Palmer y Driancourt (1980). Igualmente se realizaron exámenes bacteriológicos con la ayuda de muestras uterinas.

Las hembras resultaron pertenecer, por su potencial de fertilidad, a los grupos I y II de la clasificación de Gotze (grupo I: 70-100% potencial de fertilidad; grupo II: 50-70% potencial de fertilidad) (Von Lepel, 1975).

El material seminal ha sido extraído de tres sementales de raza árabe, de peso 600700 kg y de edad comprendida entre los 5 y los 7 años,clínicamente sanos, sujetos semanalmente durante el mes anterior al inicio de las investigaciones a exámenes macro y microscópicos del líquido seminal (motilidad media superior al 60% y anomalías morfológicas de los espermatozoides inferiores al 15%). Asimismo se han realizado exámenes bacteriológicos sobre muestras extraídas a nivel del saco prepucial y de la fosa del glande, que han resultado negativos.

Los sujetos referidos en la casuística han sido mantenidos en pradera con una integración vitamínico-mineral.

A) Inducción y sincronización de los estros y de las ovulaciones:

Las yeguas, en plena estación reproductiva, que habían mostrado ciclos estrales regulares, han recibido por vía oral una solución oleosa al 0,22% de

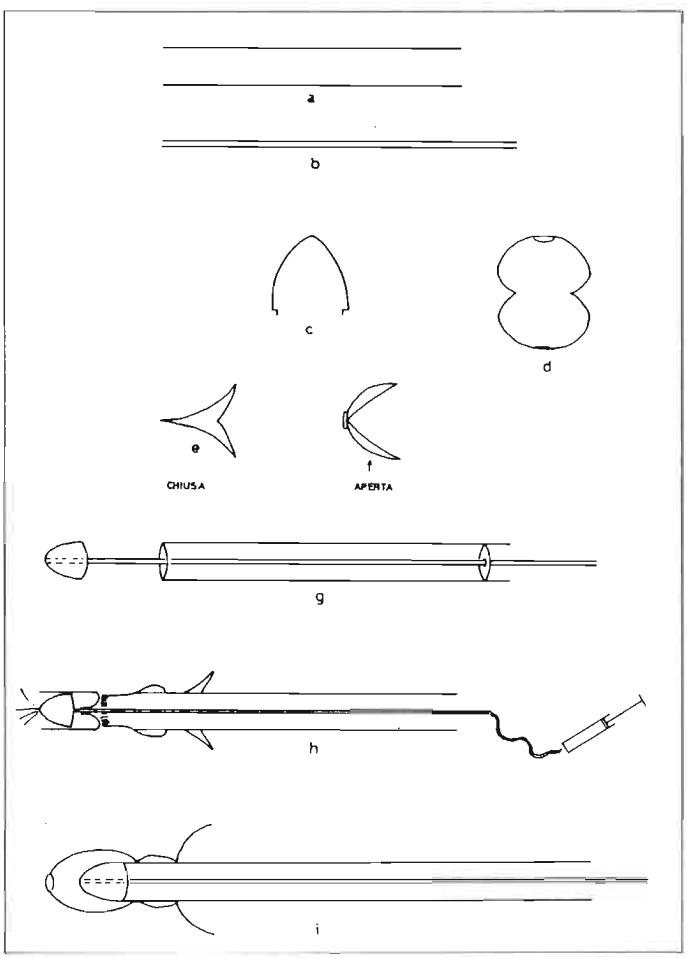


Fig. 2. El inseminador de Calaprice. (e cerrada f abierta).

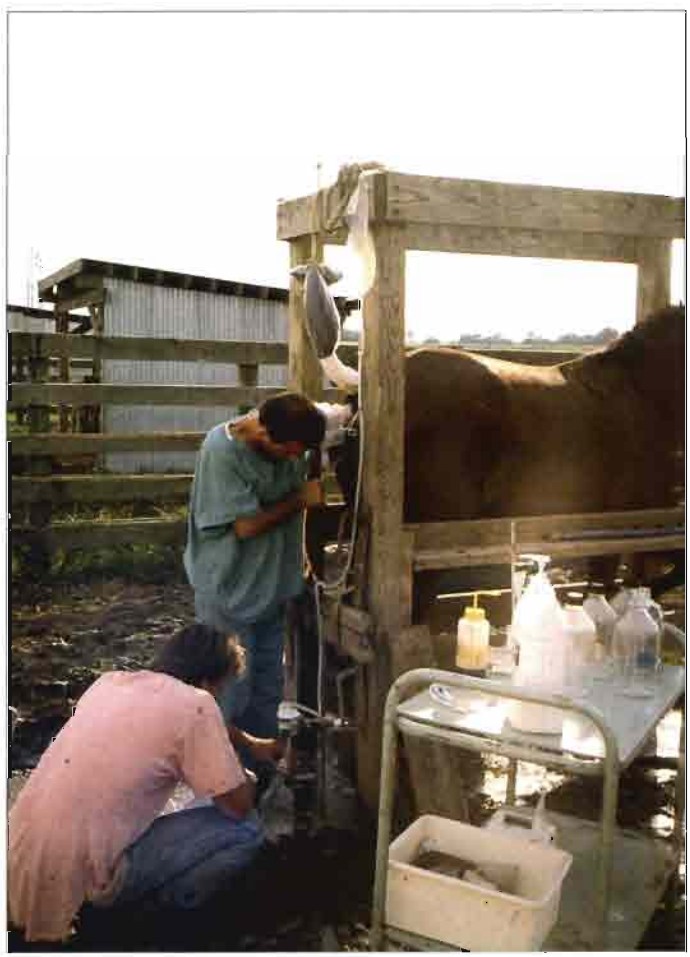


Fig. 3. La yegua, encerrada en el potro de contención, es sometida a flushing uterino 7-8 días después de la ovulación.

un progestágeno de síntesis (Allyl Trenbolone, Regumate-Roussel Uclaf) (Squires et al, 1979) en la dosis de 0,044 mg/kg de p.v. durante 12 días a partir de un día cualquiera del ciclo; así mismo el 10º día del inicio del tratamiento se han suministrado por vía intramuscular 250 mcg de un producto de la prostaglandina F2 alfa (PGF2alfa) (Estrumate-I.C.I.) (Cuadro 1).

La eficacia del tratamiento se ha evaluado tanto en base a la supresión de los estros durante el mismo, como en base al intervalo de tiempo transcurrido desde el cese del suministro de medicamentos hasta la aparición de las primeras manifestaciones estrales y de la ovulación.

B) Recogida del material seminal:

La recogida del material seminal se ha efectuado mediante vagina artificial (Amann et al., 1983) modelo C.S.U. (Animal Reproduction System), empleando cada vez o una hembra en estro o un maniquí para equinos (Fig. 1).

El líquido seminal "Gel Free", conservado en termostato a 37 °C hasta el momento del empleo (15-30 min. después de la recogida), ha sido examinado y evaluado particularmente en base al volumen, a la motilidad y a la concentración, determinada con hemocitómetro.

C) Inseminación de las yeguas:

Al aparecer las manifestaciones estrales, mostradas con el auxilio de un semental exploración (pony), el crecimiento folicular se ha seguido mediante explotación rectal.

Cuando un folículo preovulatorio se ha hecho apreciable (30-40 mm de diámetro), cada yegua ha sido inseminada en días alternos hasta que ha tenido lugar la ovulación, con 500 x 10^6 espermatozoides progresivamente móviles, empleando una pipeta de inseminación para equinos, protegida por una vaina estéril, perforable, de plástico y unida a una jeringa que contiene el material seminal, o con el inseminador de Calaprice (1975) que respeta los momentos fundamentales que se realizan en el coito natural.

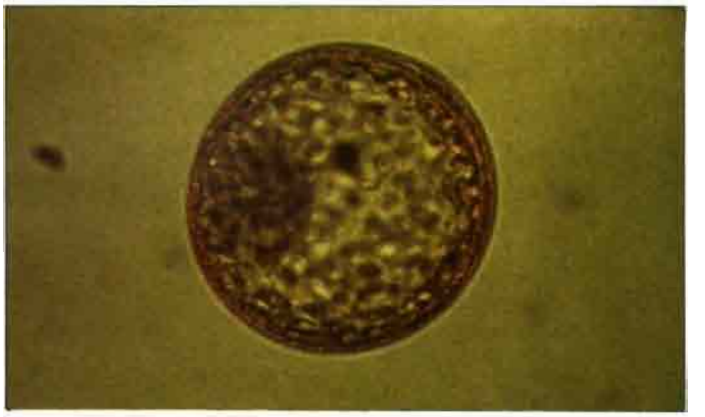


Fig. 4. Embrión viable en la fase de desarrollo de blastocitos.

El inseminador (Fig. 2) consta, en síntesis, de tres partes en acero inoxidable y de dos en pura goma de caucho, como seguidamente se describe:

a) Un cilindro de 2,5 mm × 100 cm, cerrado en la extremidad posterior por un disco agujereado en el centro, que es soporte del tubito b;

b) Un tubito de 2,5 mm × 100 cm, colocado en el interior del cilindro, que lleva en su extremidad posterior un tubo de goma con la jeringa unida que contiene el esperma (h), y en la anterior, atornillada, la parte c (g).

c) Una semiolivilla perfectamente enroscada, atravesada por una acanaladura que continúa la del tubito b.

Siguen las dos partes en goma de caucho, de las que la primera está representada por una "pera" (d) que, previo cierre del orificio con un diafragma de polietileno fácilmente perforable, es obligada a atravesar forzadamente desde la parte anterior del cilindro hasta encerrar a la semiolivilla metálica (h).

De esta forma, la "pera", además de proteger la supuesta esterilidad de la olivilla c, que en el momento oportuno - perforado el diafragma - entrará en el cuello, oprimiéndose contra el cuello mismo, interrumpirá toda relación cuello-vagina, como precisamente sucede durante el coito natural.

Un sutil velo de vaselina, que es después extendido en la extremidad anterior de la "pera", facilitará la acción; la segunda parte, colocada en la parte posterior de la "pera", está constituída por una copa replegada sobre sí misma (e), que se abre (f) apenas se inicia la extracción del inseminador de la vagina, provocando la aspiración que se realiza en el coito natural (i).

El volumen de semen necesario para la inseminación, que contiene 500 millones de espermatozoides progresivamente móviles, se ha calculado aplicando la fórmula:

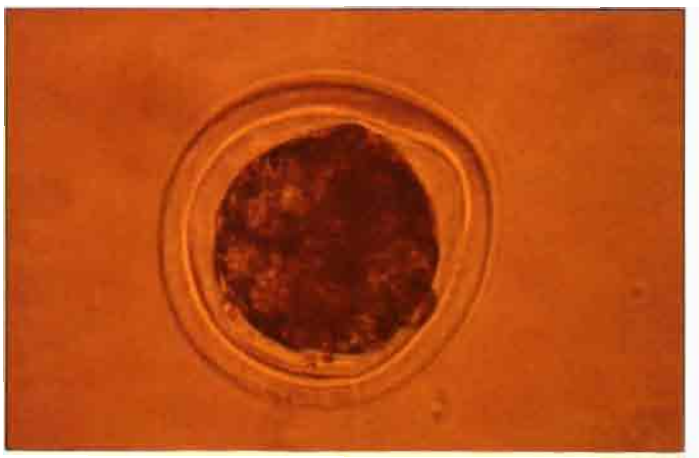


Fig. 5. Embrión no viable en la fase de desarrollo de mórula.

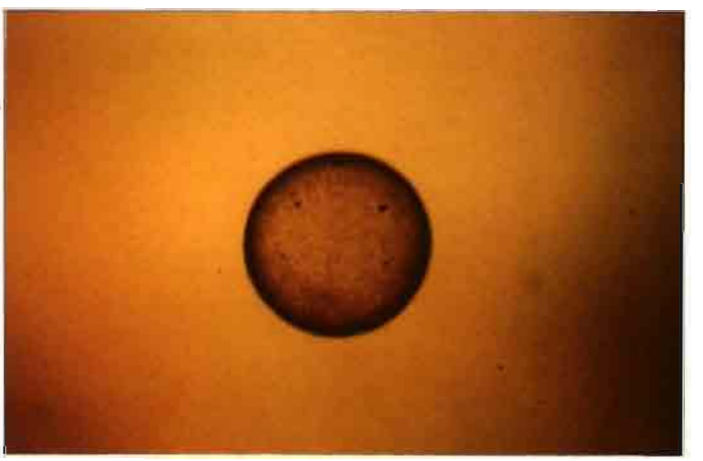


Fig. 6. Ovocélula no fecundada recuperada en el líquido de lavado.

$$V = \frac{500 \times 10^6}{(\text{espermatozoides/ml})(\% \text{ motilidad progresiva})}$$

(Yates y Whitacre, 1988)

d) Recogida de los embriones con método incruento.

Los procedimientos no quirúrgicos aplicados para la recogida de los embriones han sido los descritos por Imel et al. (1981). El flushing del útero se ha efectuado siete-ocho días después de la ovulación con el catéter de Franklin (28 French gauge), empleando para el lavado 1,5-2 litros de solución salina Dulbecco tamponada (D-PBS) (Gobco) a 37°C, con el 1% de suero fetal bovino inactivo (Sfb) (Gibco) y el 1,1% de antibióticos (Penicilina-Streptomicina) (Gibco), mediante un sistema de flujo de gravedad (Fig. 3). Terminado el flushing uterino, con el fin de restablecer la actividad ovárica, se ha suministrado a cada una de las yeguas por vía intramuscular 250 mcg de $PGF_2\alpha$. El líquido de lavado, concentrado en unos 25-30 ml en un filtro para embriones (Em Con- Immunosystem), ha sido examinado al estereomicrocopio (Wilde M8, 20-50 X) y los embriones aislados han sido mantenidos invitro en la solución D-PBS con el 20% de Sfb y clasificados por su vitalidad, en base a criterios morfológicos y al nivel de desarrollo comparado con su edad (Squires et al., 1985).

RESULTADOS

Durante el suministro del progestágeno de síntesis (Allyl Trenbolone, Regu.Mate), ninguna hembra (100%) ha presentado señales exteriores de celo, que por el contrario han aparecido en 52 sujetos (87%) como media dentro de los 4,1 días de la interrupción del tratamiento, con sucesiva ovulación en los 48 sujetos (93%), dentro de los 10,1 días de la interrupción del tratamiento mismo.

El volumen medio del eyaculado "Gel Free" por cada recogida ha sido de 20 ml. La media de las inseminaciones necesarias para cada sujeto ha sido de 2,5.

De las 48 yeguas que han ovulado se han recogido 33 embriones (69%) (Fig. 4), de los cuales 8 (25%) presentaban fenómenos degenerativos (Fig. 5), y finalmente de un sujeto se ha recuperado una ovocélula no fecundada (Fig. 6).

DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

La eficacia del método de la inseminación artificial, a los fines del porcentaje de preñez, ha resultado similar a la que se obtiene con la inseminación natural (Bristol, 1987).

En efecto, de la evaluación de las fertilizaciones obtenidas, dicho porcentaje de preñez ha sido del 69%.Con el fin de verificar la fertilización de la ovocélula, empleando el método de la inseminación artificial, y la incidencia de la mortalidad embrionaria en estados precoces de desarrollo del embrión, hemos considerado oportuno llevar nuestras observaciones directamente sobre éste, recogiéndolo al 7-8° día después de la ovulación. Esto en cuanto no habría sido posible comprobar mediante ecografía si un eventual fallo de preñez hubiera sido la expresión de mortalidad embrional o de falta de fertilización.

El 25% de los embriones recogidos no eran viables y, por tanto, causa de interrupción de la gestación sin más, no por ineficacia del método de inseminación artificial, sino por la intervención de causas que determinan la mortalidad embrional precoz; ésto podría justificar la variabilidad de los porcentajes de preñez, referidas en la bibliografía, que se han tenido con la aplicación del método de la inseminación artificial.

En efecto, durante los primeros días de la gestación se puede comprobar la mortalidad embrionaria precoz, que precisamente en la yegua ocurre con una incidencia comprendida entre el 5 y el 30% (Merkt y Gunzel, 1979: Fiolka et al., 1985; Villahoz et al., 1985). A este propósito Ginther et al. (1985) han registrado en yeguas pony, mediante examen ecográfico de la gestación, del 18,2% de mortalidad embrional entre el 11-15° día después de la ovulación.

En la yegua las ovocélulas no fertilizadas permanecen en las trompas degenerándose (Van Nieckerk y Gerneke (1966), aunque en nuestro caso ha sido posible observar en 48 animales sometidos a flushing uterino la presencia en el líquido de lavado de un sujeto de una ovocélula no fecundada.

El no descenso de la ovocélula por la trompa a la cavidad uterina estaría ligado a la presencia sobre su superficie de microvellosidades y gránulos corticales (Betteridge et al., 1979) y a la falta de producción de esteroides propios del zigoto (Flood et al., 1979), aunque por el momento nos faltan argumentos válidos para entablar una discusión sobre ello.

El empleo de la inseminación artificial en los equinos comportaría también la sincronización de los calores con el empleo de metodologías de eficacia segura; ésto con el fin de tener un mayor número de animales con estros y ovulaciones sincronizados.

El método que hemos empleado nos parece idóneo, tanto para la supresión del estro durante el tratamiento como para inducir la sincronización de los calores y de las ovulaciones; lo cual es posible si la intervención se realiza durante la plena estación reproductiva y no en la fase de transición, caracterizada por ciclos estrales irregulares y con frecuencia no asociados a actividad folicular (Webel y Squires, 1982).

Con este tratamiento se ha puesto de manifiesto un incremento de los valores plasmáticos de la hormona folículo estimulante alrededor del 8-10° día desde el inicio del suministro del progestágeno (Turner et al., 1981), y ésto podría demostrar su influencia positiva sobre la maduración folicular que, precisamente en nuestras investigaciones, ha tenido lugar en el 87% de las yeguas examinadas.

De todo lo dicho se desprende que la técnica de la inseminación artificial en la yegua no comporta particulares dificultades, pero para que se pueda utilizar con éxito es necesario, en primer lugar, centrar la atención en la elección del caballo semental, tanto por su comportamiento sexual como por las características macro y microscópicas del líquido seminal. A tal fin recordemos que un examen del líquido seminal no es suficiente para evaluar la fertilidad del sujeto, sino que son necesarias repetidas recogidas y evaluaciones, porque como se sabe, numerosos factores pueden interferir transitoriamente en el ardor sexual y en las características del semen.

Extremadamente importante para el buen éxito de la citada técnica es también la elección de las yeguas, practicada sobre los resultados del examen clínico del aparato genital, sobre la eficacia del método de sincronización de los calores y de las ovulaciones y sobre el cuidadoso procedimiento de la inseminación.

RESUMEN

Con la investigación que hemos realizado se han evaluado los resultados del empleo de la inseminación artificial en 60 yeguas, utilizando líquido seminal de tres caballos sementales durante dos estaciones reproductivas consecutivas. La sincronización de los estros y de las ovulaciones en las yeguas se ha realizado con el suministro por vía oral de un progestágeno de síntesis (Allyl Trenbolone, Regumate), en dosis de 0,044 mg/kg p.v. durante 12 días.

Cuando era apreciable un folículo preovulatorio, mediante exploración rectal, las yeguas han sido inseminadas en días alternos con 500 x 10^6 espermatozoides progresivamente móviles, hasta que ha sobrevenido la ovulación.

Siete-ocho días después de la ovulación, mediante flushing uterino, se han recogido 33 embriones (69%), de los cuales 8 (25%) no eran viables.

Palabras clave: Yegua, inseminación artificial, sincronización de los estros, fertilización.

BIBLIOGRAFIA

1) Allen W.R. and M. Tischner (1976) - Demonstration of non surgical egg transfer in the horse. - VIIIth Int. Congr. Anim. Repr. Artif. Insem., 1274.
2) Allen W.R., V. Urwin, D.J. Simpson, R.E.S. Greenwood, R.C. Crowhurst, D.R. Ellis, S.W. Ricketts, M.D.N. Hunt, N.J. Wingfield Digby (1980) - Preliminary studies on the use of oral progestagen to induce oestrus and ovulation in seasonally anoestrous thoroughbred mares. - Equine Vet. J., 12, 141.
3) Amann R.P., P.R. Loomis and B.W. Pickett (1983) - Improved Filter system for equine artificial vagina. - Eq. Vet. Sci., 3, 120.
4) Arns M.J., G.W. Webb, J.L. Kreider, G.D. Potter and J.W. Evans (1987) - Use of different non glicolysable sugars to maintain stallion sperm viability when frozen or stored at 37°C and 5°C in a bovine serum albumin. - J. Reprod. Fert. suppl. 35, 135.
5) Betteridge K.J., M.D. Eaglesome (1979) - Embryo transport through the mare's oviduct depends upon cleavage and is independent of the ipsilateral corpus luteum. - J. Reprod. Fert., Suppl. 27, 387.
6) Black E.L., R.P. Amann, R.A. Bowen and D. Frantz (1989) - Changes in quality of stallion spermatozoa during criopreservation: plasma membrane integrity and motion characteristics. - Theriogenol., 31, 283.
7) Bristol F. - Synchronization of estrus in: «Current Therapy in Equine Medicine - Edward Robinson Saunders Company - Philadelphia, London, Toronto, Mexico City, Rio de Janeiro, Sydney, Tokio, Hong Kong, 1987, 491.
8) Calaprice A. (1975) - Tavola Rotonda su: «Fisiopatologia della riproduzione e F.A. nella cavalla. Cambridge - Comunicazione personale.
9) Cochran J.D., R.P. Amann, D.P. Froman and B.W. Pickett (1984) - Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate in the post-thaw motility of equine sperm. - Theriogenol., 22, 25.
10) Cristanelli M.J., E.L. Squires, R.P. Amann and B.W. Pickett (1984) - Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure. - Theriogenol., 22, 39.
11) De Vries P.J. (1987) - Evaluation of the use of fresh extended, transported, stallion semen in the Netherlands. - J. Reprod. Fert., suppl. 35, 641.
12) Douglas Hamilton D.H., R. Osol, G. Osol, D. Driscoll and H. Noble (1984) - A field study of the fertility of transported equine semen. - Theriogenol., 22, 291.
13) Douglas Hamilton D.H., P.J. Burns, D. Driscoll and K.M. Viale (1987) - Fertility and characteristics of slow-cooled stallion semen. - J. Reprod. Fert., suppl. 35, 649.
14) Fiolka Von G., H.J. Kuller und S. Lender (1985) - Embryonale Mortalitat beim Pferd. Mh. Vet. Med., 40, 835.
15) Flood P.F., K.J. Betteridge, D.S. Irvine (1979) - Oestrogens and androgens in blastocoelic fluid and cultures of cells from equine conceptuses of 10-22 days gestation. - J. Reprod. Fert., Suppl. 27, 413.
16) Ginther O.J., M.C. Garcia, D.R. Bergfelt, G.S. Leith and S.T. Scraba (1985) - Embryonic loss in mares: pregnancy rate, lenght of interovulatory intervals and progesterone concentrations associated with loss during days 11 to 15. Theriogenol., 24, 409.
17) Imel K.J., E.L. Squires, R.P. Elsden and R.H. Shideler (1981) - Collection and transfer of equine embryos. J. Am. Vet. Med. Ass., 10, 987.
18) Klug E., H. Treu, H. Hillmann and H. Heinze (1975) - Results of insemination of mares with fresh and frozen stallion semen. - J. Reprod. Fert., Suppl. 23, 107.
19) Leopold A., A. Zironi (1970) - Sul congelamento del materiale seminale del cavallo. - Rivista di Zootecnia Agricoltura Veterinaria, 3-4, 59.
20) Loomis P.R., R.P. Amann, E.L. Squires and B.W. Pickett (1983) - Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-Lactose-Egg yolk and packaged in straws. - J. Anim. Sci., 56, 687.
21) Merkt H., A.R. Gunzel (1979) - A survey of early pregnancy losses in West Germany thoroughbred mares. - Equine Vet. J., 11, 256.
22) Müller Z.(1982) - Fertility of frozen equine semen. - J. Reprod. Fert., suppl. 32, 47.
23) Müller Z. (1987) - Practicalities of insemination of mares with deep-frozen semen. - J. Reprod. Fert., suppl. 35, 121.
24) Pace M.M. and J.J. Sullivan (1975) - Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mare inseminated with frozen stallion semen. - J. Reprod. Fert., suppl. 23, 115.
25) Palmer E. and M.A. Driancourt (1980) - Use of ultrasonic echography in equine gynecology. - Theriogenol. 13, 203.
26) Province C.A., E.L. Squires, B.W. Pickett and R.P. Amann (1985) - Cooling-rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. - Theriogenol., 23, 925.
27) Squires E.L., W.B. Stevens, D.E. Mc Glothlin and B.W. Pickett (1979) - Use an oral progestin for estrus synchronization in mares. - Theriogenol., 11, 110.
28) Squires E.L., V.M. Cook and J.L. Voss (1985) - Collection and transfer of equine embryos. - Bullettin n. 1, Fort Collins. Colorado State University. Animal Reproduction Laboratory.
29) Tischner M. (1975) - Results of artificial insemination of horses in Poland in the post-war period. - J. Reprod. Fert., suppl. 23, 111.
30) Turner D.D., M.C. Garcia, S.K. Webel, O.J. Ginther (1981) - Influence of follicular size on the response of mares to allyl trenbolone given before the onset of the ovulatory season. Theriogenol., 16, 73.
31) Van Nieckerk C.H., W.H. Gerneke (1966) - Persistence and parthenogenetic cleavage of tubal ova in the mare. - Onderstepoort J. Vet. Res., 33, 195.
32) Villahoz M.D., E.L. Squires, J.L. Voss and R.K. Schideler (1985) - Some observations on early embryonic death in mares. Theriogenol., 23, 915.
33) Von Lepel J. Frhr (1975) - Maintenance of fertility in the horse including artificial insemination. - Equine Veterinary J., 7, 97.
34) Webel S.K., and E.L. Squires (1982) - Control of oestrus cycle in mares with Altrenogest. - J. Reprod. Fert., suppl. 32, 193.
35) Yates D.J. and M.D. Whitacre (1988) - Equine artificial insemination. - Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 4, 2, 291.