



**Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza**



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Técnicas de reproducción asistida en caballos: la fecundación *in vitro*

Assisted reproductive technology in horses: *in vitro* fertilization

Autor/es

Olga Hernández Gallarte

Director/es

Victoria Luño Lázaro
José Ignacio Martí Jiménez

Facultad de Veterinaria

2023

ÍNDICE

I.	RESUMEN/ABSTRACT	1
II.	INTRODUCCIÓN	2
A.	TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA.....	2
B.	ANATOMÍA REPRODUCTIVA DE LOS ÉQUIDOS	2
1.	Anatomía reproductiva del caballo	2
2.	Anatomía reproductiva de la yegua	4
C.	FECUNDACIÓN <i>IN VIVO</i>	6
III.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	8
IV.	METODOLOGÍA.....	9
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN (DESARROLLO)	10
A.	LA FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i> (FIV)	10
1.	¿Qué es? ¿Qué uso tiene?.....	10
2.	Problemática de la FIV en la especie equina	11
3.	Procedimiento de FIV	13
4.	Resultados obtenidos.....	21
B.	INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI).....	22
1.	El material	22
2.	Maduración de los ovocitos y selección de espermatozoides	23
3.	Microinyección	23
4.	Cultivo y transferencia de embriones	25
5.	Factores limitantes e influyentes en los resultados.....	25
6.	Ventajas y desventajas de la ICSI	26
7.	Resultados obtenidos.....	27
8.	Comparativa resultados de la transferencia embrionaria	28
C.	EL FUTURO DE LA BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA EQUINA.....	29
VI.	CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	29
VII.	VALORACIÓN PERSONAL.....	30
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	31

I. RESUMEN/ABSTRACT

Existe una gran variedad de técnicas de reproducción asistida que han experimentado una notable evolución a lo largo de las dos últimas décadas. A pesar de ello, en la especie equina la fecundación *in vitro* (FIV) convencional sigue sin poder utilizarse comercialmente debido, esencialmente, a tres problemas: la obtención de ovocitos, el endurecimiento de la zona pelúcida durante la maduración del ovocito y la capacitación espermática. Como alternativa a la FIV convencional, se ha desarrollado la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) que elude las barreras de la FIV, pero supone un gran desembolso económico. La reproducción equina sigue progresando y perfeccionándose hoy en día; se espera que la FIV convencional avance, para ofrecer una técnica de producción de embriones *in vitro* (PEIV) más económica y accesible para un mayor número de propietarios equinos.

There is a wide variety of assisted reproduction techniques that have experienced notable evolution over the last two decades. Despite this, in the equine species, conventional in vitro fertilization (IVF) still cannot be used commercially due, essentially, to three problems: obtaining oocytes, hardening of the zona pellucida during oocyte maturation and spermatic capacitation. As an alternative to conventional IVF, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) has been developed, which circumvents the barriers of IVF, but involves a large financial outlay. Equine reproduction continues to progress and be perfected today; conventional IVF is expected to advance, to offer a more affordable and accessible in vitro embryo production (IVEP) technique to a greater number of equine owners.

II. INTRODUCCIÓN

A. TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

La biotecnología de la reproducción comprende una serie de técnicas que permiten aumentar la eficiencia reproductiva y los índices de mejora genética. Contribuye de este modo a desarrollar la producción del sector ganadero, conservar las especies en peligro de extinción, incrementar la multiplicación y el transporte de material genético, así como, almacenar recursos genéticos únicos para su posible futura utilización (González-Figueroa y González, 2005).

Algunas de estas técnicas son las siguientes:

- Inseminación artificial (IA): aplicación de los espermatozoides en el tracto genital de una hembra en el momento adecuado para que se produzca la fecundación del ovocito. Puede utilizarse semen fresco, refrigerado o congelado; en los dos últimos se procesan y añaden diluyentes. La inseminación puede ser cervical (superficial, media o profunda) o intrauterina (en el cuerpo o cuernos); la técnica a emplear varía según la especie y el tipo de semen utilizado (Giraldo, 2007).
- Transferencia de embriones (TE): recolección de un embrión mediante un lavado del útero de una hembra donante. El embrión obtenido se transfiere, de manera quirúrgica o no quirúrgica, al útero de una receptora sincronizada previamente con la donadora (Ángel y Bran, 2010).
- Fecundación *in vitro* (FIV): incubación de ovocitos maduros con espermatozoides en una placa de Petri con un medio que permitirá la capacitación espermática y la posterior fecundación del ovocito para producir embriones *in vitro* (Leemans et al., 2019).
- Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI): técnica de micromanipulación que permite la fecundación *in vitro* mediante la inyección de un espermatozoide en el citoplasma de un ovocito en metafase II (Palermo et al., 1992).

B. ANATOMÍA REPRODUCTIVA DE LOS ÉQUIDOS

1. Anatomía reproductiva del caballo

El aparato reproductor del caballo está compuesto por testículos, epidídimos, conductos deferentes, pene, y glándulas sexuales accesorias (Amann, 1981; Acosta, 1997; Brito, 2007; Trejos, 2009; Ortega, 2011; Brinsko et al., 2011) (Fig. 1).

- Testículos: órganos ovoides que se encuentran en posición horizontal en la región inguinal y están recubiertos por el escroto. Se encargan de la producción de gametos y hormonas sexuales masculinas. Su tamaño varía según la raza, edad y época del año. El gameto

masculino es el espermatozoide, este consta de cabeza, cuello y cola, está completamente cubierto por una membrana plasmática. La cabeza del espermatozoide está formada por el acrosoma que cubre los dos tercios anteriores del núcleo, la lámina postacrosomal que cubre el resto del núcleo y el núcleo encerrado dentro de una membrana de doble capa. El engrosamiento de la membrana nuclear forma la placa basal en la base del núcleo, que une la cabeza al *capitulum* del cuello. La membrana plasmática está compuesta fundamentalmente por lípidos (fosfolípidos y colesterol) y proteínas; su composición lipídica está correlacionada con la tolerancia al shock por frío, cuanto mayor sea la proporción de esteroles en relación con los fosfolípidos mayor tolerancia a los procesos de congelación-descongelación. En el cuello se observan columnas segmentadas y el centríolo proximal. La cola se divide en pieza intermedia, pieza principal y pieza final. El axonema se extiende a lo largo de toda la cola y está formado por nueve dobletes de microtúbulos dispuestos alrededor de un par central de microtúbulos.

- Epidídimos: se dividen en cabeza, cuerpo y cola. La cabeza está íntimamente unida a la cara dorsal anterior del testículo y el cuerpo continúa a lo largo de la parte posterior del testículo hasta la cola. Su función es la maduración, transporte y almacenamiento de los espermatozoides.
- Conductos deferentes: se inician en el epidídimo y ascienden dorsales a la vejiga unidos por el pliegue genital, para proyectarse caudalmente hacia la uretra pélvica, lugar en el que desembocan. Su calibre aumenta debido al engrosamiento de su pared a la altura de las ampollas, que permite el almacenamiento de los espermatozoides.
- Pene: constituido por base, tronco y glande. Es de tipo musculocavernoso y está compuesto principalmente por tejido eréctil formando los cuerpos cavernosos. A lo largo del tejido existen senos venosos en los que se acumula sangre durante la erección, lo que provoca un aumento del tamaño del pene muy marcado. El glande del pene está compuesto por tejido esponjoso, denominándose la parte más craneal cabeza del pene. Esta zona está delimitada por un borde en relieve llamado “corona del glande”, continuándose caudalmente con el “cuello del glande”.

- Glándulas sexuales accesorias: las glándulas vesiculares se encuentran a ambos lados de las ampollas, tienen forma de saco y desembocan en la uretra pélvica. Caudal a estas se localiza la próstata, glándula impar con dos lóbulos bien diferenciados que convergen en una parte central. Desemboca a ambos lados del colículo seminal (punto de unión entre el conducto eyaculador y la uretra). Las glándulas bulbouretrales se localizan a ambos lados de la parte más caudal de la uretra pélvica, son algo alargadas y poseen una envoltura muscular (músculo bulbo-glandular). Su principal función es la producción de plasma seminal.

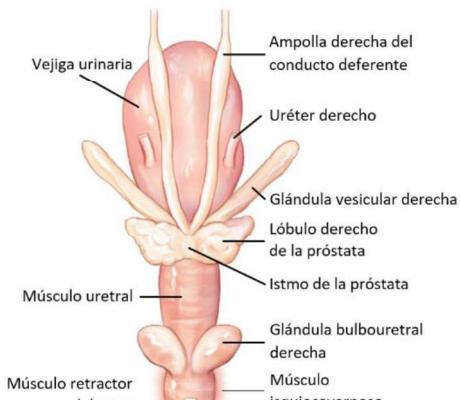


Figura 1. Glándulas sexuales accesorias del caballo (vista dorsal) (Brinsko et al., 2011)

2. Anatomía reproductiva de la yegua

La yegua es una hembra monotoca estacional de días largos, es decir, ovula exclusivamente un ovocito por cada ciclo estral y lo hace cíclicamente durante la primavera y el verano. El ciclo estral dura entre 20 a 22 días (proestro 2-4 d, estro 4-8 d, metaestro 2-3 d, diestro 12-15 d). La ovulación se produce 24-48 h antes del fin del celo. La gestación dura de 330 a 335 días (Salazar, 2016). El aparato reproductor de la yegua está compuesto por dos ovarios junto con los oviductos, útero, vestíbulo, vagina y labios vulvares (Senger, 2003; Davies, 2008; Desantis et al., 2011; Salazar, 2016; Cortes, 2020) (Fig. 2).

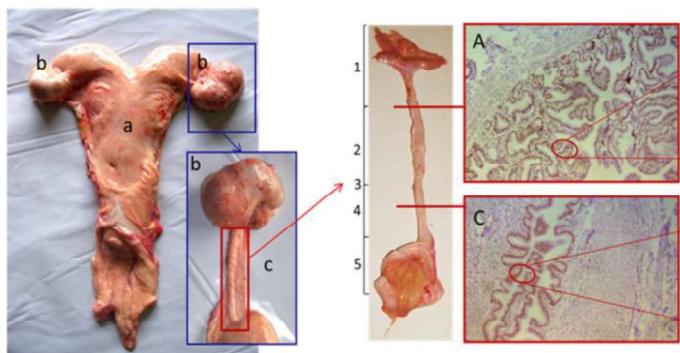


Figura 2. Aparato reproductor de la yegua (Maitan et al., 2021b)

(a) Útero, (b) ovarios y (c) oviducto. El oviducto consta de (1) infundíbulo, (2) ampolla, (3) unión ampollar-ístmica, (4) istmo y (5) unión útero-tubárica (UTJ). (A) y (C) son imágenes histológicas de la ampolla y del istmo respectivamente.

- Ovarios: órganos con función citogénica y endocrina. Están envueltos por una bolsa ovárica y son de un tamaño considerable ($35-120 \text{ cm}^3$). Presentan un borde mesovárico relacionado con el pedículo vasculonervioso y el ligamento suspensor del ovario, y un borde libre donde se halla la fosa del ovario (lugar donde se produce la ovulación). La corteza y médula se encuentran invertidas con respecto a otras especies. La unidad funcional del ovario son los folículos. En su interior se hayan los ovocitos inmaduros (ovogonias, $2n=46$) que mediante la foliculogénesis se transforman en ovocitos secundarios que podrán ser fecundados. Durante dicho proceso los ovocitos y los folículos aumentan de tamaño, al rodearse de un mayor número de capas celulares; se producen también las diferentes etapas de la meiosis del ovocito. El ovocito secundario ($n=23$) se encuentra en un folículo preovulatorio o de Graaf rodeado por células epiteliales que se diferencian en células secretoras de líquido folicular; el líquido llena la cavidad que rodea al ovocito y produce un aumento de tamaño del folículo. Las células epiteliales que rodean al folículo se organizan en la membrana de la teca externa e interna y la capa granulosa (más interna). El ovocito se encuentra unido internamente al folículo sobre un montículo de células foliculares llamado *cumulus oophorus* o cúmulo ovígero (función protectora, nutricional y reguladora de la maduración ovocitaria). Consta de una membrana plasmática u oolema y está rodeado por una matriz glicoproteica implicada en el reconocimiento espermático y bloqueo de la poliespermia, la zona pelúcida (ZP); también está rodeado por la corona radiada. Los folículos continúan desarrollándose y se denominan folículos de Graaf (Fig.3).

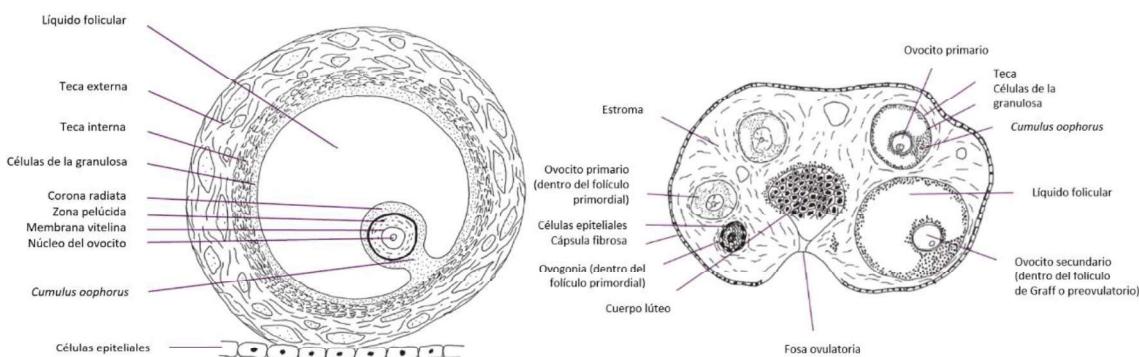


Figura 3. Folículo de Graaf equino y representación esquemática del desarrollo folicular dentro del ovario, respectivamente (Davies, 2008)

- Oviducto: son estructuras músculomembranosas cuya función es el transporte del ovocito y es donde tiene lugar la capacitación espermática y la fecundación. Está suspendido en el mesosalpinx, y se puede dividir en cuatro regiones anatómicas y funcionalmente diferentes:

infundíbulo, ampolla, istmo y unión útero-tubárica (porción estrecha que conecta con el cuerno uterino).

- Útero: órgano glandular donde se desarrolla la gestación. Tiene una estructura bicorne no segmentada en forma de T, con cuernos uterinos cortos y un cuerpo relativamente largo. Se continúa caudalmente con el cérvix que es relativamente corto, y tiene pliegues longitudinales y sin anillos cartilaginosos como en otras especies domésticas.
- Vagina y labios vulvares: mide 18 a 23 cm de largo y tiene un diámetro de 10-15 cm. Se continúa con el vestíbulo de la vagina, zona donde desemboca la uretra en su orificio externo. Los labios vulvares presentan una comisura ventral y una dorsal.

C. FECUNDACIÓN *IN VIVO*

En la yegua, el eyaculado es depositado en el cuerpo uterino y los espermatozoides deben alcanzar el oviducto y llegar a la unión útero-tubárica (UTJ), para que se produzca la fecundación en la unión entre la ampolla y el istmo (Maitan et al., 2021b). Los espermatozoides son transportados hacia el oviducto como resultado principalmente de las contracciones uterinas (transporte pasivo). Los primeros espermatozoides pueden observarse en el oviducto a las 2 h tras la inseminación, aunque la mayoría de ellos alcanzan dicha posición 4 h después de la inseminación (Bader, 1982; Brinsko, Varner y Blanchard, 1991).

Existen varios mecanismos que ayudan a eliminar la posible contaminación y los espermatozoides redundantes del útero. En primer lugar, las contracciones del miometrio expulsarán mecánicamente los espermatozoides a través del cuello uterino (Troedsson et al., 1998). En segundo lugar, la entrada de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) en la luz uterina permite la fagocitosis de los mismos (Kotilainen, Huhtinen y Katila, 1994). Si bien esta respuesta inflamatoria es perjudicial para todos los espermatozoides que se transportan a través de la luz uterina, los espermatozoides muertos son más susceptibles a ella. En el plasma seminal existen factores protectores como CRISP-3 (proteína secretora rica en cisteína 3) que inducen una marcada reducción en la unión entre los espermatozoides viables y los PMN, facilitando el ascenso (Doty et al., 2011).

Una vez en el oviducto, los espermatozoides establecen un reservorio en el istmo al unirse a las células del epitelio (Maitan et al., 2021b). Dicho reservorio selecciona espermatozoides morfológicamente normales con motilidad progresiva y que expresen ciertas proteínas de unión al ovocito (Boyle et al., 1987; Scott y Overstreet, 1998; Scott, 2000). Además, es capaz de prolongar el período de viabilidad espermática, hecho importante ya que generalmente el momento de inseminación y ovulación no están sincronizados. Los espermatozoides unidos a las células del istmo se ubican en las criptas de los pliegues oviductales; mientras que los

espermatozoides con membrana alterada y escasa viabilidad se ubican en la luz del oviducto siendo arrastrados por el fluido oviductal (Maitan et al., 2021b).

No se ha descrito completamente el ambiente oviductal, pero se sabe que la luz de la ampolla en el periodo periovulatorio contiene un entorno esencial para que los espermatozoides sean capaces de fecundar al ovocito (Maitan et al., 2021b).

Cuando los espermatozoides se exponen a ciertas moléculas presentes en el fluido oviductal ovulatorio (bicarbonato, albúmina, progesterona) se inducen varios cambios moleculares y bioquímicos en la membrana plasmática y en el citoplasma del espermatozoide que se conocen como capacitación. Este proceso es imprescindible para que los espermatozoides adquieran la capacidad fecundante. Las elevadas concentraciones de bicarbonato en el oviducto producen un aumento del mismo a nivel citoplasmático del espermatozoide. A nivel de la membrana plasmática desencadena un incremento de la fluidez, la reorganización de los fosfolípidos (Visconti et al., 1995; Gadella y Harrison, 2002) y la unión de *rafts* lipídicos en la cabeza del espermatozoide (Leemans et al., 2019). A diferencia de lo que ocurre en otras especies, en los espermatozoides equinos no se produce un agotamiento del colesterol plasmático (Maitan et al., 2021a). Por otro lado, la entrada de bicarbonato provoca la fosforilación en los residuos de tirosina de las proteínas de la cola del espermatozoide, así como un aumento en las concentraciones de Ca^{2+} (Leemans et al., 2019; Fernández, 2023).

Estos eventos permiten el cambio de motilidad progresiva a una hiperactivación espermática. Todo ello es indispensable para que los espermatozoides migren a través del medio oviductal viscoso y penetren entre las células del *cumulus* (Leemans et al., 2019). En el caso de la entrada de espermatozoides en el periodo preovulatorio, los factores de decapacitación derivados principalmente del plasma seminal evitan una capacitación prematura (Arienti et al., 1998; Sostaric et al., 2008).

Cuando el espermatozoide capacitado e hiperactivo se encuentra con el complejo *cumulus*-ovocito (CCO) se une a él y se produce la reacción acrosómica (RA). Esta consiste en la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa del espermatozoide en múltiples puntos, lo que desencadena la liberación del contenido del acrosoma (enzimas hidrolíticas) que le permiten atravesar las células del *cumulus* y la ZP, accediendo así al espacio perivitelino (Roggero et al., 2007; Maitan et al., 2021b). Cuando el espermatozoide contacta con el ovocito se reanuda la meiosis II, se produce la fusión entre el oolema y la membrana del segmento ecuatorial del espermatozoide, permitiendo la recombinación del material genético de ambos gametos y, por tanto, la fecundación. Los factores responsables de la RA son el Ca^{2+} extracelular que entra al citoplasma del espermatozoide, la progesterona presente en el líquido folicular y la glicoproteína 3 de la ZP presente en los ovocitos maduros (Leemans et al., 2019) (Fig. 4).

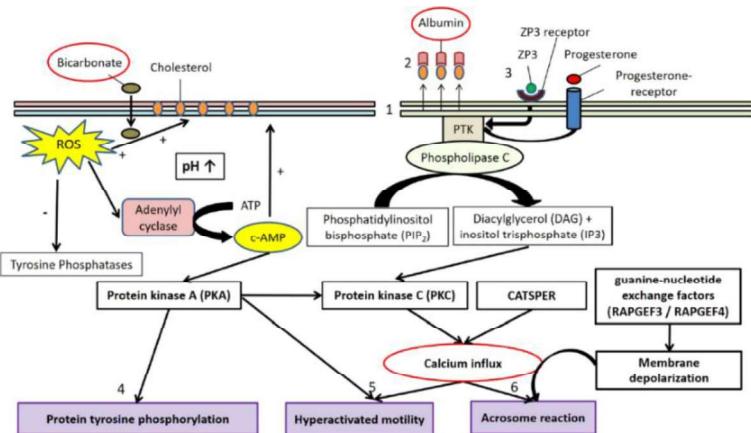


Figura 4. Vías involucradas en la capacitación espermática (Leemans et al., 2019)

Cuando los espermatozoides experimentan capacitación, ocurren los siguientes cambios: (1) aumento de la fluidez de la membrana, (2) agotamiento del colesterol (posteriormente se descubrió que no ocurre en equino), (3) agregación de receptores de balsas lipídicas, (4) fosforilación de proteína tirosina, (5) motilidad hiperactivada y (6) la RA. PTK, proteína tirosina quinasa; ROS, especies reactivas de oxígeno; ZP3, proteína ZP3; receptor ZP3, receptor de proteína ZP 3; +, activación; -, inhibición.

III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las técnicas de reproducción asistida engloban todas aquellas herramientas y procesos tecnológicos que el veterinario aplica de manera directa o indirecta sobre la reproducción. Implican, por tanto, la manipulación de ovocitos, espermatozoides y embriones con el objetivo de lograr una cría viable. Algunas de estas técnicas son la inseminación artificial, la fecundación *in vitro* y la transferencia de embriones.

A diferencia de lo que ocurre en otras especies domésticas, en la especie equina, las técnicas de reproducción asistida se han desarrollado lentamente debido a ciertas dificultades que existen a la hora de obtener el material necesario, como ovarios y ovocitos, o inducir la superovulación en la yegua. Sin embargo, permiten realizar inseminaciones con semen de caballos que se encuentran a kilómetros de distancia, utilizar animales de avanzada edad con un buen historial reproductivo o animales de alta competición, etc.

Por ello, los objetivos propuestos son:

- Analizar los problemas que existen en la fecundación *in vitro* en la especie equina.
- Conocer el estado actual de la microinyección intracitoplasmática como técnica alternativa a la FIV en caballos.

IV. METODOLOGÍA

Para la realización y redacción de este trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda de bibliografía en diferentes fuentes de información en base a la “Guía de herramientas y pautas para realizar un buen TFG” de la biblioteca universitaria de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Algunas de las fuentes y plataformas utilizadas han sido Alcorze, PubMed, Google Académico y ScienceDirect. Para ello se han utilizado los términos clave que se observan en la Tabla 1, realizándose una búsqueda en inglés para obtener la mayor información posible. Para elegir y filtrar esta información se han seguido diferentes criterios como la actualidad de ésta, el número de citaciones que posee o si la información se ajustaba a la búsqueda.

Tabla 1. Resultados obtenidos en función de las palabras clave utilizadas en los distintos buscadores

	ALCORZE		PUBMED		SCIENCEDIRECT		GOOGLE ACADÉMICO	
	TOTAL	<10 años	TOTAL	<10 años	TOTAL	<10 años	TOTAL	<10 años
<i>Horse reproductive anatomy</i>	331	166	2.314	613	3.586	1.048	88.700	16.500
<i>Horse In vivo fertilisation</i>	191	79	86	27	3.996	1.289	5.330	2.270
<i>Horse assisted reproductive technology</i>	284	174	1.150	391	2.816	1.400	31.900	16.500
<i>Horse In vitro fertilisation</i>	778	313	328	146	5.636	1.804	7.520	3.050
<i>Horse ICSI</i>	493	298	155	93	628	282	5.580	2.780
<i>Horse sperm capacitation</i>	368	171	160	62	1.186	438	7.250	3.300

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN (DESARROLLO)

A. LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* (FIV)

1. ¿Qué es? ¿Qué uso tiene?

La FIV es la coincubación de espermatozoides y un ovocito maduro en un medio que desencadenará la capacitación y que favorece, por tanto, la fecundación (Fig. 5). Tras este proceso, se forma el zigoto que comienza su desarrollo hasta la etapa de mórula o blastocisto, momento en el cual son transferidos al útero o se crioconservan (Sansinena, 2020; Rooney, 2020). En esta técnica, la maduración de ovocitos y la capacitación de los espermatozoides también pueden ser realizadas *in vitro* (Hisey, Ross y Meyers, 2021).

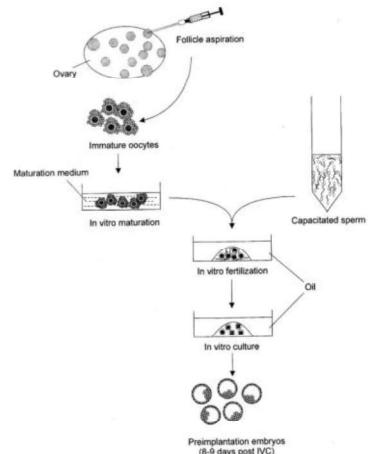


Figura 5. El procedimiento de FIV bovina (Jainudeen, Wahid y Hafez, 2013)

La FIV se emplea para producir embriones (Leemans et al., 2016a), y su principal finalidad es incrementar la eficiencia reproductiva en animales de gran valor genético y comercial y, en ciertos casos, resolver los problemas de fertilidad de hembras y machos (Ramírez y Suarez, 2021). Favorece también la generación y el almacenamiento de genética de gran valor fuera de la temporada de reproducción; o la planificación de un programa de reproducción entorno a un periodo de competición. Por otro lado, esta técnica podría optimizar las escasas reservas de semen congelado que puedan poseer los propietarios de yeguas. Todo ello, la convierte en una técnica comercialmente atractiva con gran interés a nivel mundial (Morris, 2018).

Esta técnica se implementó por primera vez en el ganado vacuno, tiempo antes de intentar ser adaptada a los programas de cría caballar (Bracket et al., 1982). Frente a los grandes avances reproductivos logrados en la especie bovina, en la especie equina no existía un protocolo estandarizado de esta técnica reproductiva hasta ahora (Felix et al., 2022). Anteriormente, cuando se alcanzaba la fecundación, la eficiencia era muy baja, solo se obtenía un 32 % de embriones fecundados tras la incubación de ovocitos madurados *in vitro* con semen congelado tratado con heparina (Moros-Nicolás et al., 2019).

2. Problemática de la FIV en la especie equina

A pesar de los numerosos estudios realizados, la FIV sigue siendo una técnica de acceso limitado y escaso éxito, debido a diferentes problemas u obstáculos que se presentan a lo largo del proceso (Ramírez y Suarez, 2021).

a) Obtención de ovocitos

Los mataderos son uno de los lugares de suministro de ovarios y, por tanto, de ovocitos. Estas muestras presentan una evidente falta de repetibilidad, y la información sobre la etapa del ciclo en la que se encuentran, así como de su historial reproductivo, es escasa. Además, existe un largo periodo de tiempo entre la recogida y la colocación en el medio de lavado de los ovocitos, lo que puede afectar su calidad (Deleuze et al., 2010). Mediante este procedimiento se obtienen ovocitos inmaduros, que será necesario madurar posteriormente *in vitro*. Una técnica alternativa es la aspiración folicular guiada por ecografía transvaginal (TVA), pero debido a la estrecha unión del ovocito a la pared del folículo, deriva en una baja tasa de recuperación y en la obtención principalmente de ovocitos de folículos atrésicos (Dell'Aquila et al., 2001). La disponibilidad de ovocitos para estudio es limitada, a diferencia de lo que ocurre en otras especies (bovinos y porcinos) (Sirard, 2018); lo que dificulta el desarrollo de la técnica debido a la falta de material de estudio (Mugnier et al., 2009).

Por otra parte, los tratamientos de superovulación no son muy eficaces en la yegua (Dippert et al., 1994; Bezard et al., 1995; Alvarenga et al., 2001), ya que no se dispone de un producto hormonal que induzca de forma fiable las ovulaciones múltiples (Squires, 2006), lo que reduce aún más la cantidad de ovocitos disponibles en la aspiración ecoguiada (Deleuze et al., 2010). Debido a la disponibilidad limitada de ovocitos equinos, los investigadores han estudiado el potencial de combinar núcleos de células somáticas equinas con ovocitos de otras especies (ovocitos heterólogos) para producir embriones con fines de investigación, lo que no ha tenido gran éxito hasta la fecha (Sessions-Bresnahan, Graham y Carnevale, 2014; Hisey, Ross y Meyers, 2021).

b) La zona pelúcida (ZP)

En el caso de la especie equina, la mayoría de los ovocitos son obtenidos inmaduros, por lo que será necesario madurarlos *in vitro*. Si se realiza este procedimiento en el laboratorio, la ZP de los ovocitos equinos se endurece, actuando como una barrera para los espermatozoides (Li et al., 1995). Para solventar este problema, Li et al. (1995) analizaron los resultados de la FIV tras la perforación zonal de la ZP para permitir el paso de los espermatozoides. Esta técnica fue utilizada previamente en otros animales de laboratorio para mejorar los resultados de la FIV,

pero produjo un grave daño al ovocito equino y optaron por usar una solución ácida para perforar la ZP de los ovocitos. Para ello, se realizó un cocultivo con espermatozoides tratados previamente con ionóforo de calcio, para que se produjese una correcta capacitación y fecundasen al ovocito. Se logró una tasa de escisión embrionaria entre el 79 % (mórula) y el 45,5 % (blastocisto). Los investigadores llegaron a la conclusión de que la perforación del ovocito y la utilización de espermatozoides tratados con ionóforo de calcio eran necesarios para lograr una correcta fecundación. A pesar de estos resultados, las tasas reales de gestación y los nacimientos de potros sanos fueron notablemente bajos (Li et al., 1995).

Posteriormente, diferentes autores (Hinrichs et al., 2002; Leemans et al., 2016a) estudiaron el efecto de la eliminación parcial o total de la ZP, pero las altas tasas de polispermia hicieron que no fuera una opción viable para resolver el problema de la FIV.

Más tarde, Hinrichs et al. (2002) descubrieron que las inadecuadas condiciones durante la maduración ovocitaria puede desencadenar la liberación prematura de gránulos corticales y producir un endurecimiento de la ZP. También observaron que al añadir fetuina (proteína que detiene el endurecimiento de la ZP en los ovocitos de ratón) al medio, el endurecimiento de la ZP de los ovocitos equinos disminuía; sin embargo, las tasas de fecundación no aumentaban.

Sin embargo, Leemans et al. (2016a) indicaron que era poco probable que el fracaso de la FIV fuese debido al endurecimiento de la ZP ya que, los ovocitos madurados *in vitro* transferidos al oviducto de una yegua inseminada lograban tasas de concepción similares a las de la inseminación artificial convencional. Este hallazgo indica que los ovocitos madurados *in vitro* tienen la capacidad de ser fecundados correctamente (Hinrichs et al., 2002).

c) Capacitación espermática

La capacitación de los espermatozoides de los sementales en condiciones *in vitro* es inadecuada y supone, según diferentes autores (Tremoleda et al., 2004; Sessions-Bresnahan, Graham y Carnevale, 2014; Leemans et al., 2016a; Leemans et al., 2019), el principal obstáculo que dificulta el desarrollo de un protocolo eficaz de FIV equina. La inadecuada capacitación obstaculiza la correcta penetración de las células del *cumulus* y la ZP *in vitro* (Tremoleda et al., 2004) y produce, por tanto, bajas tasas de fecundación (Moros-Nicolás et al., 2019). En concreto, los espermatozoides se unen a la ZP, pero no inician la RA ya que no logran alcanzar el espacio perivitelino (Maitan et al., 2021b).

El fracaso de la penetración de los espermatozoides se relaciona con la ausencia de medios de fecundación *in vitro* óptimos que contengan moléculas esenciales para desencadenar la capacitación de los espermatozoides de los sementales (Maitan et al., 2021b). Leemans et al. (2019) describieron que ciertos factores que inducen la capacitación en otras especies de

mamíferos no están involucrados en la capacitación de los espermatozoides equinos. A pesar de ello, se han identificado desencadenantes de la capacitación (biológicos y químicos) que facilitan la fosforilación de tirosina de proteínas (asociada a la cola) y la hiperactivación de los espermatozoides (Leemans et al., 2019). Los factores inductores de la capacitación no identificados probablemente estén presentes en el líquido folicular y/u oviductal y deberían identificarse para diseñar un posible medio de capacitación que sea eficaz para realizar la FIV con gametos equinos (Leemans et al., 2016b; Maitan et al., 2021b).

Por otra parte, el largo período de preincubación necesario para lograr la capacitación puede suponer otra barrera para la FIV debido a que es difícil mantener la motilidad de los espermatozoides equinos en cultivo durante tanto tiempo (Felix et al., 2022).

Diferentes estudios (Consuegra et al., 2020; Sinowatz et al., 2003; Sessions-Bresnahan et al., 2014) han demostrado que los espermatozoides de caballo tienen la capacidad de penetrar la ZP de los ovocitos bovinos (heterólogos) *in vitro* con la posterior formación de pronúcleos y escisión celular. Este hecho demuestra que las modificaciones de la ZP postovulatoria no pueden excluirse como una barrera para la FIV y, por tanto, es difícil confirmar cuál de los dos gametos es el principal responsable del fracaso de la FIV (Maitan et al., 2021b).

3. Procedimiento de FIV

a) Obtención del material

(1) Ovocitos

Los ovocitos pueden obtenerse mediante diferentes técnicas, por ejemplo, la aspiración folicular u “Ovum Pick Up” (OPU) y el procesado de ovarios de matadero (Brinsko et al., 2011).

La OPU se realiza con la yegua sedada en estación. Puede realizarse de forma transvaginal mediante una sonda ecográfica se coloca en un soporte especial que tiene una guía para introducir una aguja de punción (Fig. 6). Dicha sonda se posiciona en la vagina de la yegua; el ovario se sujeta por el recto y se manipula para llevarlo al lado peritoneal de la pared vaginal. Se introduce una aguja (calibre 12) a través de la pared vaginal hacia el folículo y se aspira el contenido de este. Si el folículo es inmaduro, es necesario colapsarlo y raspar repetidamente la pared con la aguja para desprender las células de la granulosa (Hinrichs, 2018). El lavado del folículo aumenta la tasa de recuperación de ovocitos (Gaetano et al., 2005). Otro protocolo sería la aspiración a través del flanco únicamente el folículo que va a ovular, aunque es menos eficiente y requiere una estimulación hormonal previa de la yegua mediante gonadotropinas (Hinrichs, 2018).



Figura 6. Dispositivo de aspiración transvaginal de ovocitos (Baca y Miragaya, 2015).

La OPU conlleva una serie de riesgos: desgarro rectal debido a la palpación transrectal, hemorragia interna (Vanderwall y Woods, 2002), infección ovárica (p.e. absceso ovárico), peritonitis, reacciones adversas a los medicamentos (p.e. analgésicos o antibióticos) o incluso la muerte (Bøgh et al., 2003; Velez et al., 2012). Según varios estudios (Vanderwall y Woods, 2002; Gaetano et al., 2005; Vanderwall, Hyde y Woods, 2006), no existe una disminución de la fertilidad tras la repetición de esta técnica.

El procesado de ovarios de matadero consiste en abrir mediante una hoja de bisturí los folículos y raspar las células de la granulosa con una cureta. Posteriormente, se lava el folículo con un medio específico en una placa de Petri; y el ovocito se encontrará junto a las células de la granulosa (Brinsko et al., 2011). Una vez todos los folículos visibles se han procesado, se cortan los ovarios en láminas de aproximadamente 3 mm (para abrir los folículos que se encuentren en el parénquima) y se repite el procedimiento anterior. Por último, los ovocitos se seleccionan y deben transferirse a una placa de Petri que contenga medio limpio (Hinrichs, 2010).

Los ovarios obtenidos del matadero deben enviarse lo más rápido posible al laboratorio ya que los mejores resultados se obtienen si los ovarios se reciben dentro de las 6 h posteriores al sacrificio de la yegua. Tras su extracción, los ovarios no deben refrigerarse si el tiempo de transporte es inferior a 2 h, deben mantenerse a temperatura corporal (37 °C). Si el tiempo de transporte es superior, los ovarios deben mantenerse a 20 °C (Hinrichs, 2010).

(2) Espermatozoides

Para la recogida de semen se utiliza una vagina artificial (VA). Existe una gran variedad de modelos (Missouri, japonesa, Colorado, CSU, polaca) que tratan de imitar las condiciones de temperatura y presión de la vagina de la yegua (estímulos necesarios para provocar la eyaculación). Todas ellas constan básicamente de una funda protectora, un colector con o sin filtro (el filtro atrapa la fracción gel del eyaculado), una camisa interna y un cuerpo rígido (Trejos, 2009, Brinsko et al., 2011).

La VA se rellena con agua a 45-50 °C para proporcionar una temperatura interna de 44-48 °C. Se debe tener en cuenta que los espermatozoides pueden sufrir daños permanentes al ponerse en contacto con superficies por encima de los 45 °C. La presión de la VA debe ajustarse para proporcionar un buen contacto con el pene, sin interferir con la penetración de este; pero que permita su expansión hasta su completa erección. Tanto la temperatura como la presión del

agua en la VA deben mantenerse relativamente constantes durante la recolección, para estimular correctamente al seminal y obtener la máxima cantidad de semen. Por último, la superficie interna debe lubricarse con un lubricante estéril no espermicida (Brinsko et al., 2011). Inmediatamente después de su recolección, el semen debe transportarse rápidamente al laboratorio minimizando la exposición a la luz y al choque térmico. Tanto en caso de que el semen se use de inmediato como en caso de que se conserve para ser utilizado más tarde, siempre debe mezclarse con un diluyente unos minutos tras de la recolección para maximizar su durabilidad. Una relación de dilución 1:1 a 1:2 (semen/diluyente) es adecuada si el semen no se almacena durante más de 1 a 2 h (Brinsko et al., 2011).

b) Clasificación de los ovocitos y evaluación de la calidad del semen

(1) Clasificación de los ovocitos

Los ovocitos se pueden clasificar según la morfología de su *cumulus* en compactos (Cp) o expandidos (Ex) (Hinrichs y Williams, 1997; Hinrichs, 2010; Morris, 2018) (Fig. 7).

- Compactos: provienen de folículos viables, pero estos no son tan competentes para madurar *in vitro*. Presentan unas células de la granulosa y un *cumulus* compacto; el citoplasma es homogéneo, lo que se asocia con una baja competencia meiótica.
- Expandidos: se originan en folículos atrésicos, pero tienen una alta competencia meiótica ya que han sufrido algunos cambios prematuros (incluida la expansión del *cumulus*) y aproximadamente un 60-80% maduran *in vitro*. El citoplasma es heterogéneo, esto se asocia con una alta competencia meiótica.

Los ovocitos obtenidos mediante OPU con una ausencia de la mayor parte del *cumulus* y la presencia únicamente de la corona radiada (o con una denudación parcial de la ZP), no pueden ser clasificados como ovocitos Cp o Ex (Hinrichs, 2010).

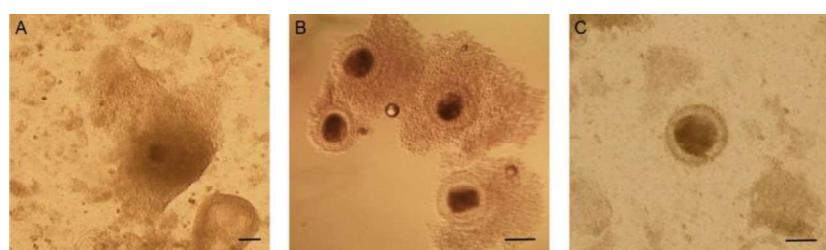


Figura 7. Ovocitos de yegua. Compactos (A), expandidos (B) y corona radiata (C).

Barra = 100 µm (Bertero et al., 2017).

(2) Evaluación de la calidad del semen

Para evaluar la calidad del semen existen diferentes parámetros que pueden estudiarse, pero el más relevante es la motilidad progresiva ya que existe una alta correlación con las tasas de fecundidad. El porcentaje normal de motilidad progresiva es de 75 %, con un rango de 60-95 %.

Otro parámetro importante es la concentración espermática, que debe estar entre 150 y 300 millones de espermatozoides/ml (Galina y Valencia, 2008; Trejos, 2009).

Es necesario también llevar a cabo la tinción de vitalidad para determinar los espermatozoides viables (no teñidos) y muertos (teñidos). Además, hay que evaluar la morfología de los espermatozoides para determinar el porcentaje de morfoanomalías; la suma de las alteraciones del acrosoma y la cabeza no deben superar un 5 % y 10 % respectivamente y el número total de las alteraciones no debe ser mayor al 30 %. Por último, se debe determinar el número total de espermatozoides (concentración x volumen de semen) (Brinsko et al., 2003).

c) Maduración *in vitro* de los ovocitos

El proceso de maduración del ovocito consiste en una serie de cambios a nivel citoplasmático y nuclear, que lo convierten en un ovocito viable, fecundable y competente para su futuro desarrollo (Tremoleda et al., 2001).

La maduración nuclear del ovocito consta de una serie de pasos: la rotura de la membrana nuclear, la formación de la placa metafásica de la primera división meiótica, la expulsión del primer corpúsculo polar y la subsiguiente formación de la placa metafásica de la segunda división meiótica (Goudet, 2001). La maduración nuclear es esencial para la fecundación, pero debe ocurrir sincrónicamente con la maduración citoplasmática para el desarrollo normal del embrión (Morris, 2018).

Los ovocitos obtenidos de matadero requieren una maduración más prolongada debido a que el tiempo que el ovocito pasa dentro del ovario antes de recogerse afecta la maduración nuclear y citoplasmática. Esto hace que los ovocitos de matadero tengan una menor competencia de desarrollo o tasa de desarrollo de blastocistos (Hinrichs, 2005).

El tiempo necesario para alcanzar estadio de metafase II (MII) difiere entre los tipos de *cumulus*; los ovocitos con *cumulus* compactos requieren 30-36 h, mientras que los ovocitos con *cumulus* expandidos requieren un período de maduración más corto (24-30 h). Una vez se ha producido la maduración no existe diferencia en el desarrollo embrionario posterior entre ambos (Hinrichs, 2005).

El medio de maduración *in vitro* más utilizado por los laboratorios se basa en TCM199 y Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12) (Hinrichs, 2018; Fernández, 2023). La fuente de proteína utilizada en dichos medios consiste en un 10 % de suero fetal bovino (SFB) que es la fuente de proteína de elección por su efecto beneficioso sobre la competencia meiótica (en comparación con la albúmina de suero bovino o el líquido folicular) (González et al., 2015; Choi et al., 2016).

La mayoría de los protocolos de maduración *in vitro* equina, para mejorar la maduración, añaden al medio combinaciones de hormona luteinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH) y estradiol. El efecto de estas hormonas y su influencia sobre la maduración y la fecundación no está claro, la justificación de su incorporación es su influencia fisiológica en la maduración de ovocitos *in vivo* (Tremoleda et al., 2001). Otras hormonas, como el estradiol y la prolactina, han sido utilizadas, pero no aparecen en los protocolos más recientes (Morris, 2018).

En estudios recientes, los CCO mantenidos a temperatura ambiente ($\sim 22^{\circ}\text{C}$) durante una noche o durante una a dos noches a 15°C , para posteriormente ser madurados durante aproximadamente 30 h, han permitido obtener tasas de fecundación aceptables (Felix et al., 2022).

En general, los principales factores que parecen influir en el potencial de desarrollo de los ovocitos equinos son la edad, la etapa de desarrollo del folículo, el almacenamiento de los ovocitos y la adaptación del protocolo de maduración *in vitro* a estos criterios (Morris, 2018).

d) Capacitación *in vitro* de los espermatozoides

Actualmente no se han identificado los desencadenantes de capacitación específicos de la especie equina necesarios para establecer un protocolo de FIV efectivo y repetible. A pesar de ello, se han identificado tres parámetros que desencadenan la capacitación: el aumento del pH intracelular, la fosforilación de tirosinas de proteínas en la cola del espermatozoide y la motilidad hiperactivada (Leemans et al., 2019).

Los eventos de capacitación se pueden imitar *in vitro* incubando los espermatozoides en un medio que contenga bicarbonato (HCO_3^-), calcio (Ca^{2+}) y albúmina, después de separar los espermatozoides del plasma seminal utilizando la centrifugación mediante gradiente de densidad (p. e. Percoll) (Leemans et al., 2019).

Se ha estudiado también el uso de otros compuestos para inducir la capacitación, como el dilauroyl fosfatidilcolina (PC12), un lípido fusogénico que induce la capacitación y la RA al reorganizar la membrana y hacerla permeable a varios iones; o la utilización de un medio de Whitten modificado (MW) para espermatozoides tratados con procaína que provoca la motilidad hiperactivada de los espermatozoides (Sessions-Bresnahan, Graham y Carnevale, 2014).

Felix et al. (2022) preincubaron semen diluido con INRA 96® durante 22 h con penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE), los cuales estimulan la motilidad de los espermatozoides y aumentan la incidencia de la RA en diferentes especies (Meizel, 1985). Dichos espermatozoides parecían estar completamente capacitados ya que penetraron entre el 47 % y el 79 % de los ovocitos durante la primera hora de exposición. Preincubaron también espermatozoides

durante 15 min a 6 h, pero no produjeron fecundación tras 1 h de coincubación; ello sugiere que la capacitación en PHE requiere entre 6 y 22 h (Felix et al., 2022).

e) Fecundación *in vitro* convencional

La RA es dependiente del calcio extracelular; además, la progesterona del líquido folicular (LF) es otro factor que podría ser responsable en la inducción de este proceso. De acuerdo con esto, se han realizado experimentos *in vitro* con ionóforo de calcio, progesterona y LF en combinación con bicarbonato y un pH alcalino para inducir la RA; obteniéndose malos resultados (Leemans et al., 2016a). Por tanto, son necesarias más investigaciones acerca de la inducción de la RA del espermatozoide equino que lleve a una fecundación exitosa (Leemans et al., 2016a; Fernández, 2023).

f) Cultivo *in vitro* y conservación del embrión

El cultivo *in vitro* sigue suponiendo un gran reto, ya que, aunque se han probado diferentes medios de cultivo (p.ej. DMEM/F-12; Chatot, Ziomek, Bavister o Global Sciencie) aplicando diferentes protocolos, se han obtenido resultados muy variables entre laboratorios. No existe, por tanto, un medio que destaque sobre el resto (Morris, 2018; Fernández, 2023).

Se han obtenido embriones de 4 días (8 a 16 células) con tasas de desarrollo de blastocistos del 25 %-35 % empleando medios de cultivo como: DMEM/F-12 con 10 % de suero fetal bovino en una mezcla de gases de 5 % O₂, 5 % CO₂ y 90 % N₂ a 38,2 °C (Hinrichs, 2005). Además, se ha descubierto que el desarrollo de los embriones es mayor en un medio SOF modificado (fluido oviductal sintético) suplementado con glucosa que cuando se cultivan inicialmente en SOF modificado y posteriormente en un medio DMEM/ F-12 (Hinrichs, 2010).

Los embriones pueden crioconservarse para ser almacenados o exportados a largo plazo; o para ser transferidos al inicio de la siguiente temporada de cría para obtener potros temprano. La técnica más común es la vitrificación, la cual consiste en la congelación ultrarrápida del embrión y no requiere equipo especializado ya que se utilizan kits comerciales. El embrión se expone previamente a altas concentraciones de crioprotectores penetrantes para evitar la formación de cristales de hielo, que provocan la deshidratación celular. Esta técnica tiene la ventaja de que el embrión se puede descongelar rápidamente dentro de la pajuela que lo almacena y transferirse directamente a una yegua receptora (Alm et al., 2010; Sadurní, 2020). Además, no tiene ningún impacto en el desarrollo del embrión, lo que la convierte en una nueva estrategia para la conservación genética (Cabeza y Gambini, 2023). Otra técnica de crioconservación es la congelación, en esta se utilizan menores cantidades de crioprotectores y la congelación es más lenta (Galli et al., 2016; Sadurní, 2020). Varios factores influyen en la crioconservación:

- Calidad del embrión: los embriones se clasifican de acuerdo a una escala de 1 a 4 según su calidad. En la especie equina no existe una clasificación estandarizada, por lo que se basa en la clasificación de embriones de la especie humana. Sólo son aptos para la congelación los embriones de grado 1 (excelente) o grado 2 (bueno) (Tabla 2).

Tabla 2. Escala de clasificación de embriones basada en las características morfológicas del embrión (Carnevale y Metcalf, 2019)

Grado	Características
1. Excelente	Excelente potencial de desarrollo, sin alteraciones o con mínimas alteraciones. Células de número par y tamaño aproximadamente igual, con tono y textura consistente del citoplasma. Masa celular compacta (mórlula) con pocas o ninguna célula extruida Blastocisto con trofoblasto definido, cierto adelgazamiento de la ZP expandida y ninguna o mínima extrusión de células a través de la ZP Restos mínimos con fragmentación nula o limitada (0–20%) o pocas o ninguna célula extruida o no compactada en etapas posteriores. ZP intacta, redonda u ovalada de dimensiones normales. Ciento adelgazamiento de la ZP con expansión del blastocisto. Sin anomalías.
2. Aceptable	Desarrollo aceptable, pero imperfecciones moderadas. Células de número impar de tamaños variados. Diferencias moderadas en el tono o textura del citoplasma. Masa de células agrupadas, pero no compactas (mórlula). Restos moderados con fragmentación entre 20-35 %, cantidad moderada de desechos celulares o células extruidas a través de la ZP de la masa celular principal. ZP grande, deforme o con hendiduras longitudinales. Anomalías escasas (vesículas o un ligero colapso del blastocisto).
3. Pobre	Probabilidad de desarrollo limitada, cambios notables en la morfología. Número desigual de células con amplias variaciones en tamaño o tono y textura del citoplasma. Fallo de compactación de la mórlula. Blastocisto con áreas de células oscuras, con menor cantidad de ZP. Gran cantidad de restos celulares, fragmentación >35%. Gran número de células extruidas de la masa celular primaria o a través de la ZP. ZP grande y/o ZP dañada, comprometiendo la función. Anomalías graves.
4. Degenerado	No es viable. Células disociadas sin membrana ni masa celular definida. Restos celulares en gran cantidad y dispersos. ZP no intacta. Anomalías graves (vesículas grandes o numerosas). Cese del desarrollo.

- Tamaño y edad del embrión: los embriones en un estadio de mórlula/blastocisto temprano ($\leq 300 \mu\text{m}$ de diámetro; 6-6,5 d) parecen tolerar mejor el proceso, pero las tasas de recuperación de estos son inferiores a las tasas de recuperación de embriones de 7 a 8 días (400-1200 μm de diámetro) (McKinnon et al., 2011). Choi et al. (2011) vitrificaron blastocistos expandidos de hasta 650 μm de diámetro colapsando el blastocele mediante un micromanipulador, previamente a su congelación. A pesar de ello, se deben continuar las investigaciones para desarrollar un dispositivo simple que

pueda colapsar de manera segura el blastocele sin necesidad de un micromanipulador (Hinrichs, 2018).

Los embriones también pueden refrigerarse a 5 °C en un medio Ham's F-10 (previamente gaseado con una mezcla de 5 % CO₂, 5 % O₂ y 90 % N₂), manteniéndose así la viabilidad de los embriones durante 24 h (Carnevale, Squires y McKinnon, 1987).

g) Transferencia embrionaria (TE)

Las yeguas receptoras de los embriones son seleccionadas según su edad (jóvenes, de 3-10 años), historial de gestaciones y peso (450-550 kg); además, se les debe realizar un examen médico y reproductivo completo (Torres, 2012; Carreño, 2020). Los embriones frescos deben transferirse a las yeguas tan pronto como se observen signos de desarrollo de blastocistos, es decir, entre el día 7-10 de cultivo (Hinrichs, 2010).

Inicialmente, la yegua receptora del embrión debe ser sincronizada con la edad del mismo, es decir, en el momento de la transferencia debe encontrarse 7 días post-ovulación. Para realizar la sincronización existen diferentes productos hormonales como: progestágenos (altrenogest), prostaglandina F2α o sus análogos, progesterona y estradiol-17β (Palma, 2001).

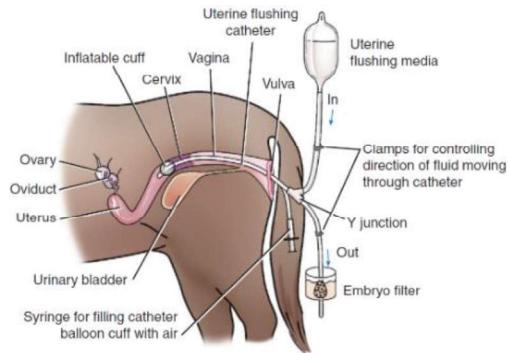
Antes de la transferencia, la yegua receptora debe ser examinada mediante palpación y ecografía transrectal. A la palpación la yegua debe tener tono uterino y el cuello debe estar cerrado. Además, se debe encontrar un cuerpo lúteo y cierto desarrollo folicular; no debe haber edema ni líquido (Brinsko et al., 2011).

La TE puede ser quirúrgica o no quirúrgica:

- Quirúrgica: en los inicios del desarrollo de la TE, la mayoría de los embriones se transfirieron quirúrgicamente a través de una laparotomía de flanco con la yegua en estación o mediante una incisión a nivel de la línea media. Esta técnica fue remplazada por la transferencia no quirúrgica debido al menor coste y rapidez de esta última (Brinsko et al., 2011).
- No quirúrgica: consiste en la introducción del embrión en el cuerpo uterino o en uno de los cuernos. El proceso se inicia con la limpieza y desinfección de la zona externa vaginal y anal, para posteriormente secarlo. El embrión, colocado previamente en una pipeta de inseminación o en una pajuela de inseminación artificial (0,25 o 0,5 ml), es introducido a través del cuello uterino para ser depositado en la luz uterina (Carreño, 2020) (Fig. 8).

Figura 8. Recuperación de embriones para su transferencia (Brinsko et al., 2011)

Ilustración de la colocación de un catéter en el útero de una yegua antes del procedimiento de lavado. Después de la inserción del catéter a través del cuello uterino, el balón se distiende con aire o líquido y el catéter se tira suavemente hacia atrás para sellar el balón en el orificio cervical interno.



Brinsko et al. (2011) utilizaron de forma rutinaria Flunixin Meglumine (500 mg, por vía intravenosa), hormona gonadotropina coriónica humana o hCG (3000 UI, por vía intramuscular) y antibióticos (sulfametoxazol y trimetoprima, 24 mg/kg por vía oral, dos veces al día). La terapia con antibióticos se continúa hasta el primer examen de gestación (a los 4 días post-tranferencia) y es reevaluada en este momento. La yegua debe ser monitoreada frecuentemente, p.e. a los 11, 13, 17, 23 y 29 días post-ovulación, y más a menudo si existiesen problemas potenciales como por ejemplo endometritis (Brinsko et al., 2011).

4. Resultados obtenidos

A pesar de las décadas de investigación y trabajo en la FIV equina, hasta el año 2022, solo habían nacido dos potros, ambos en 1991 y en un único laboratorio, el de *Palmer y colaboradores* (Palmer et al., 1991). En este experimento, las tasas de fecundación oscilaron entre 0 y 33 %, y eran muy variables, incluso dentro del mismo laboratorio (McPartlin et al., 2009). Además, los investigadores utilizaron ovocitos preovulatorios (provenientes de un folículo dominante previamente estimulado) madurados *in vivo* (Hinrichs et al., 2002); y espermatozoides frescos tratados con ionóforo de calcio (Palmer et al., 1991). Los potros nacieron tras la transferencia quirúrgica oviductal de embriones de dos células (Palmer et al., 1991; Bézard, 1992). Para obtener uno de estos potros, Palmer et al. (1991) necesitaron ocho embriones fecundados correctamente que fueron transferidos a los oviductos de ocho yeguas receptoras.

Sin embargo, tras varios años de estudio, Felix et al. (2022) han conseguido desarrollar un protocolo de FIV convencional, eficiente y repetible en la especie equina; para la producción *in vitro* de blastocistos y potros.

B. INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) es una técnica de reproducción asistida que utiliza la micromanipulación para injectar un único espermatozoide en el citoplasma de un ovocito maduro (Palermo et al., 1992; Rooney, 2020); a diferencia de la FIV que consiste en incubar juntos ovocitos maduros y espermatozoides pre-capacitados en un medio de fecundación (Hinrichs, 2012).

Los fallos en la superovulación y la FIV convencional han sido el principal motivo del uso de esta tecnología en caballos (Briski y Salamone, 2022). La ICSI es una técnica eficaz para abordar problemas reproductivos tanto en caballos como en yeguas, ya que mitiga o incluso elude las barreras reproductivas existentes que otras técnicas de reproducción no son capaces de superar (Briski y Salamone, 2022; Claes y Stout, 2022).

En los sementales con problemas reproductivos cuantitativos o cualitativos (baja concentración o mala calidad del semen) es una opción para continuar produciendo descendencia. Además, pueden utilizarse yeguas donantes subfértiles, animales prepúberes o hembras con calidad de ovocitos subóptima (Briski y Salamone, 2022).

Por otro lado, esta técnica puede utilizarse en cualquier etapa del ciclo estral o estación; siendo la única técnica de producción de embriones *in vitro* (PEIV) que puede aplicarse en caso de que una yegua muera repentinamente o necesite ser sacrificada por una fractura, cólico, etc. (Claes y Stout, 2022). Permite también maximizar el uso de espermatozoides y ovocitos de animales de élite sin alteraciones reproductivas (Briski y Salamone, 2022). El procedimiento puede llevarse a cabo mediante ICSI convencional o piezoeléctrica (Hinrichs, 2018; Fernández, 2023).

1. El material

Los ovocitos pueden ser recogidos de la misma forma que en la FIV, es decir, mediante el procesado de ovarios de matadero u OPU (Claes y Stout, 2022; Fernández, 2023).

El semen puede ser fresco, refrigerado o congelado; incluso puede descongelarse semen previamente congelado, diluirse hasta 1:200 y volverse a congelar en pajuelas (Brinsko et al., 2011). En la mayoría de los casos, se utilizan pajuelas de semen congelado ya que se suele utilizar semen de menor calidad. Las pajuelas se descongelen en un baño de agua a 39 °C durante 30 segundos y luego se someten a un método de selección para separar los espermatozoides móviles (Alm et al., 2010).

2. Maduración de los ovocitos y selección de espermatozoides

Los ovocitos se incuban hasta la maduración completa (ovocitos del folículo dominante estimulado) o para iniciar y completar la maduración (ovocitos de folículos inmaduros) (Hinrichs, 2018). El proceso de maduración (tiempos y medios) es idéntico al descrito en el apartado de la FIV convencional. Tras la maduración del ovocito se eliminan las células del *cumulus*, primero enzimáticamente, la mayoría de los laboratorios utilizan SOF con hialuronidasa y en algunos casos se ha utilizado tripsina (se desconocen sus efectos sobre el desarrollo del embrión); después se eliminan manualmente mediante un pipeteado cuidadoso (Morris, 2018; Rooney, 2020). Los ovocitos que muestran un corpúsculo polar (CP) se seleccionan para ICSI (Hinrichs, 2018).

Las técnicas de selección de espermatozoides deben ser sencillas y económicas de realizar, pero también ser capaces de eliminar eficazmente cualquier espermatozoide de baja calidad, inmóvil o muerto; así como bacterias, leucocitos y sustancias tóxicas. Debido a que cumplen todos estos requisitos, los métodos de centrifugación en gradiente de densidad y “swim-up” son los más utilizados (Osegueda-López et al., 2019; Rooney, 2020) (Fig. 9). La información sobre el efecto del método de preparación en el resultado de la ICSI es escasa (Hinrichs, 2018).

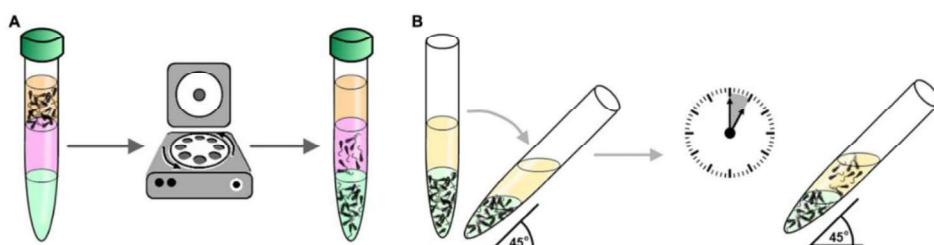


Figura 9. Métodos de selección de espermatozoides (Osegueda-López et al., 2019)

A) Selección de espermatozoides por centrifugación en gradiente de densidad (DGC): El semen se coloca encima de un gradiente de coloide (por ejemplo, partículas de sílice recubiertas con silano) preparado en un tubo de centrífuga y luego se somete a centrifugación. Posteriormente, los espermatozoides móviles se recuperan del fondo del tubo que contiene la fracción con mayor densidad de coloide. B) Selección espérmatica por “swim-up” (SU) directo: En un tubo de centrifugado se coloca un medio libre de células (amarillo en la figura) encima de la muestra seminal (verde en la figura). Luego, el tubo se inclina 45° y se incuba durante aproximadamente una hora, lo que permite que los espermatozoides móviles nadan hacia el medio libre de células donde se recolectan para aplicaciones posteriores.

3. Microinyección

En una placa Petri se colocan gotas de espermatozoides y ovocitos maduros que se observan y manejan mediante un microscopio invertido con un sistema de micromanipulación doble (Briski y Salamone, 2022). El micromanipulador está equipado con dos brazos, uno conectado a una

pipeta de sujeción (120 µm) y el otro a una pipeta de inyección (5-8 µm) que, en algunos casos, está conectado a un sistema de accionamiento piezoeléctrico. La pipeta de sujeción retiene al ovocito, colocando el primer CP en la posición 6 o 12 en el sentido de las agujas del reloj. Debido a que se espera que el material genético esté próximo al CP, se mantiene lejos del área de inyección. La pipeta de inyección, utilizada para inmovilizar y sujetar un solo espermatozoide, atravesar la membrana del ovocito en metafase II y depositar el espermatozoide en el citoplasma (Ramírez y Suárez, 2021).

Como se ha comentado anteriormente, la ICSI puede llevarse a cabo mediante dos técnicas diferentes:

- Convencional: generalmente se realiza usando con una tapa de una placa de Petri (colocada hacia arriba) que contenga varias gotas de medio de retención de ovocitos (Tyrode tamponado con Hepes que contiene albúmina, lactato y piruvato), bajo aceite mineral. Se añaden también varias gotas de espermatozoides junto a un medio Tyrode que contiene polivinilpirrolidona (al 7-10 %) para ralentizar el movimiento flagelar y posteriormente romper la cola del espermatozoide para inmovilizarlo. La cola se rompe perforando la membrana plasmática al hacer rodar la punta de una pipeta de inyección biselada en este punto. Se cree que esta acción facilita la descondensación nuclear del espermatozoide y la subsiguiente activación del ovocito (Salamone, Canel y Rodríguez, 2017). Por último, los espermatozoides son capturados con la pipeta de inyección e injectados en el citoplasma del ovocito (Brinsko et al., 2011; Briski y Salamone, 2022) (Fig. 10).

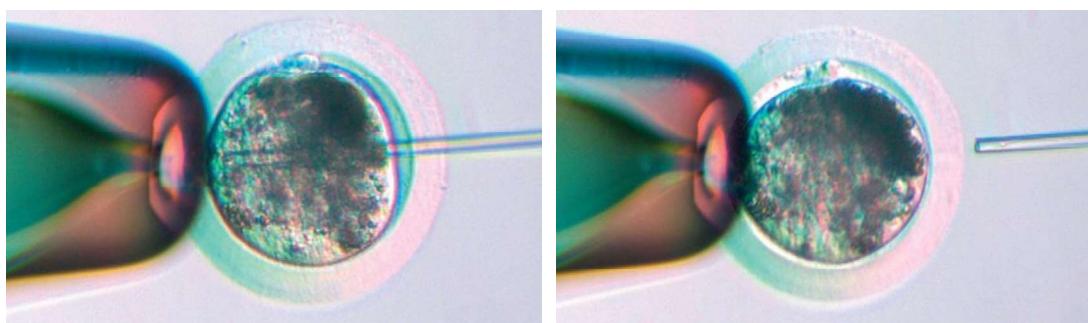


Figura 10. ICSI en un ovocito equino (Brinsko et al, 2011).

A) Ovocito sujetado mediante una pipeta roma (izquierda) y la pipeta de inyección de espermatozoides (flecha) adyacente a la ZP. B) Perforación de la ZP e inyección de espermatozoides en el citoplasma del ovocito mediante la pipeta de inyección.

- Piezoeléctrica: el procedimiento varía únicamente en el uso de una micropipeta de inyección roma con capacidad de producir microvibraciones piezoeléctricas. El sistema de accionamiento piezoeléctrico proporciona vibraciones diminutas a la pipeta de

inyección que, en un primer momento, rompe la membrana del espermatozoide y después perfora la ZP y el oolema (Brinsko et al., 2011).

No se han encontrado diferencias entre ambas técnicas en las tasas de producción de blastocistos por ovocito injectado. Sin embargo, la calidad de los embriones es significativamente mayor en los blastocistos producidos mediante la segunda técnica (Hinrichs, 2018). Claes y Stout (2022) obtuvieron uno o más blastocistos en el 78% de los procedimientos. Por otro lado, no existe diferencia en las tasas de división del embrión al realizarse la ICSI a diferentes temperaturas. A pesar de que algunos estudios informan que se debe realizar a temperatura ambiente para minimizar el riesgo de lisis de la membrana; otros investigadores realizan la ICSI a 37 °C (Morris, 2018).

Para permitir que la membrana del ovocito se repare tras la ICSI, los ovocitos se cultivan en un medio de retención post-ICSI durante aproximadamente 2 h antes de colocarlos en el medio de cultivo. Durante este período es importante evitar un aumento del pH ya que sería perjudicial para la producción de blastocistos, por lo que se utiliza un medio tamponado (CZB-H o sales de M199/ Earle con 10 % de FBS) a 38,2 °C y 5 % de CO₂ en aire. Una vez transcurrido este tiempo, se evalúa la lisis de los zigotos y se descartan los ovocitos lisados antes de iniciar el cultivo de embriones (Morris, 2018; Ramírez y Suárez, 2021).

4. Cultivo y transferencia de embriones

Tras la ICSI existen tres opciones para la transferencia de los embriones resultantes: transferencia quirúrgica inmediata al oviducto, cultivo durante 24 a 48 h y transferencia quirúrgica al oviducto o cultivo durante 7 a 8 d y transferencia transcervical al útero (Brinsko et al., 2011). Además, los embriones pueden criopreservarse, con una pérdida insignificante de viabilidad, lo que ha permitido el desarrollo de un comercio internacional de embriones y permite un uso mucho más eficiente de las yeguas receptoras. En particular, las yeguas receptoras pueden utilizarse temprano en la temporada y no es necesario sincronizar su ciclo con el de la yegua donante (Claes y Stout, 2022).

El proceso de cultivo y TE es equivalente al explicado en el apartado de la FIV convencional.

5. Factores limitantes e influyentes en los resultados

a) Factores limitantes

Se ha observado que en algunos casos existe un fracaso en la fecundación de los ovocitos debido a la ausencia de activación de estos, en su mayor parte por una descondensación incompleta de los espermatozoides, lo que sugiere un problema de comunicación entre los dos gametos durante la fecundación. Se ha reflexionado entonces entorno a la existencia de algún factor

desconocido que, en condiciones *in vivo*, es necesario para la correcta activación de los ovocitos (Bedford et al., 2004; Rooney, 2020).

Por otro lado, existen estudios sobre los blastocitos producidos mediante ICSI que han revelado un retraso en su maduración (retraso en la escisión y desarrollo embrionario temprano) en comparación con los embriones producidos *in vivo*, ello pone en duda el momento de transferencia e implantación en la yegua receptora (Rooney, 2020).

b) Factores influyentes

La edad de la yegua donante juega un papel importante en el éxito de la PEIV. Esto se debe a que el principal factor limitante para la ICSI es la calidad de los ovocitos, la cual disminuye a medida que aumenta la edad de la yegua. Por tanto, el uso de ICSI en yeguas subfértiles en las que el problema de fertilidad proviene de ovocitos de mala calidad no tendrá éxito (Hinrichs, 2018). Otros factores que juegan un papel importante en el éxito de la ICSI son: la morfología de los ovocitos, la maduración, el método ICSI utilizado y el cultivo de embriones (Rooney, 2020).

También influye en el resultado la selección de espermatozoides. Se ha sugerido que la baja eficiencia en la PEIV se debe en parte a la falta de exigencia en los métodos de selección de espermatozoides en comparación con la inseminación estándar. Estos se basan exclusivamente en la motilidad de los espermatozoides, pero no todos los espermatozoides móviles son de buena calidad. Por lo tanto, en un futuro puede ser necesario el desarrollo de nuevos métodos de selección de espermatozoides que se centren en otras características espermáticas mejor correlacionadas con la capacidad de fecundación y el posterior desarrollo embrionario. Además, al evitar la barrera que supone la ZP aumenta el riesgo de fecundación con espermatozoides defectuosos y el posterior fracaso en la PEIV (Oseguera-López et al., 2019; Rooney, 2020).

También influye en los resultados la experiencia de los técnicos que llevan a cabo la ICSI ya que los pasos que se consideran esenciales para el éxito son la correcta inmovilización del espermatozoide y la rotura del ooplasma (Vanderzwalm et al., 1996).

A pesar de todo, incluso si la ICSI se realiza con precisión, presenta tasas significativas de pérdida embrionaria temprana, por lo que es necesaria más investigación respecto a este problema (Claes et al., 2018; Rooney, 2020).

6. Ventajas y desventajas de la ICSI

a) Ventajas

- Optimiza el uso de las pajuelas de gran valor o reducida cantidad ya que la cantidad de espermatozoides utilizada para que se produzca la fecundación es baja (Galli et al., 2007; Fernández, 2023).

- Si la motilidad espermática es buena, una porción de una pajuela (un "corte") se puede usar para la fecundación de numerosos ovocitos (Fernández, 2023).
- Permite el uso de semen de calidad variada, incluyendo los que poseen una baja concentración espermática o baja motilidad; por tanto, permite la PEIV a partir de semen que podrían no producir una gestación si se utilizase en una inseminación estándar (Brinsko et al., 2011; Fernández, 2023).
- Permite el uso de semen congelado-descongelado (Salamone, Canel y Rodríguez, 2017).
- Se puede llevar a cabo fuera de la temporada de cría y en cualquier etapa del ciclo reproductivo de la yegua (Rooney, 2020).
- Su éxito general de PEIV parece ser similar o superior al de la TE tradicional y permite la posibilidad producir uno o más embriones de diferentes sementales en una sola sesión (Claes y Stout, 2022).

b) **Desventajas**

- Requiere instalaciones y equipos de alto coste, además de un personal realmente experimentado (Vélez y Hinrichs, 2011).
- Requiere en torno a 10 ovocitos para obtener un embrión vitrificable (Lazzari et al., 2020).

Las ventajas de ICSI, junto con los fracasos de la FIV, han mantenido a la especie equina a la vanguardia de esta técnica hasta la fecha; y la popularidad de este método continúa creciendo exponencialmente (Salamone, Canel y Rodríguez, 2017).

7. Resultados obtenidos

El primer potro producido mediante la ICSI nació en Estados Unidos en 1996, se utilizaron ovocitos madurados *in vitro*, y el embrión resultante se transfirió al oviducto de una yegua receptora (Squires et al., 1996).

En 2005 se descubrió un método eficaz para el cultivo *in vitro* de zigotos hasta la etapa de blastocisto derivados de ICSI (Hinrichs, 2005) y en 2007 se desarrolló el primer protocolo para la aplicación clínica de ICSI (Galli et al., 2007); desde entonces la ICSI equina se ha convertido en un procedimiento muy extendido a nivel mundial (Hinrichs, 2018).

La PEIV a través de OPU-ICSI ha aumentado enormemente en popularidad en la cría de caballos de deporte en los últimos 6 años, en gran parte debido a las mejoras en las tasas de recuperación de ovocitos y la producción de blastocistos (Claes y Stout, 2022). Actualmente, está aumentando la demanda de los programas OPU-ICSI en animales de alto valor genético y rendimiento deportivo sin problemas reproductivos, debido a la alta flexibilidad que ofrece en comparación

con otras técnicas de reproducción asistida convencionales (Cuervo-Arango, Claes y Stout, 2019).

Existe poca información disponible sobre la salud de los potros producidos por ICSI (Hinrichs, 2018). En un estudio reciente no se han encontrado diferencias significativas entre los potros producidos de forma natural y potros producidos por ICSI con respecto a: la salud general, tamaño o peso de los potros, o a la morfología placentaria o expresión de genes específicos (Valenzuela et al., 2018).

Debido a que las tasas de formación de blastocitos son muy variables entre los laboratorios de ICSI (Salamone, Canel y Rodríguez, 2017), se debe tener en cuenta que un buen laboratorio de ICSI debe obtener como resultados: tasa de maduración *in vitro* $\geq 50\%$, tasa de blastocitos por ovocito inyectado $\geq 20\%$, tasa de gestación tras la transferencia $\geq 65\%$ y tasa de parto por gestación establecida $\geq 80\%$ (Hinrichs, 2018).

8. Comparativa resultados de la transferencia embrionaria

El principal objetivo de un protocolo de FIV o ICSI es la producción de un gran número de embriones que puedan ser transferidos para la producción de potros. Los resultados varían en función de las metodologías utilizadas.

- Embriones producidos *in vivo*: el índice de gestación está entre el 50 % y el 80 %. Los porcentajes de preñez con embriones “frescos” son superiores al de vitrificados o congelados (75-85 % y 50 % respectivamente) (Carreño, 2020).
- Embriones producidos mediante OPU-ICSI: la probabilidad de gestación con embriones congelados-descongelados varía entre 70 al 77,7 %. Varios factores de la yegua donante (no su edad), de la yegua receptora y embrionario influyen en la probabilidad de preñez y parto. La tasa de gestación disminuye al transferirse los embriones posteriormente a los 3-4 días tras la ovulación (Claes y Stout, 2022).
- Embriones producidos mediante FIV convencional: en el estudio de Felix et al. (2022) la transferencia de tres blastocitos a yeguas receptoras produjo el nacimiento de tres potros normales. Este es el único estudio que aplicó verdaderamente la técnica de FIV convencional y, por tanto, el único del cual se pueden examinar los resultados de la FIV convencional en equinos.

C. EL FUTURO DE LA BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA EQUINA

A pesar del gran avance que supone el estudio de Felix et al. (2022) para la FIV convencional, es cuestionable si dicha técnica podrá competir en un futuro con los éxitos de la ICSI y la TE convencional. El protocolo que desarrollaron dichos investigadores fue exclusivo para semen fresco; y para que la FIV convencional se pueda utilizar clínicamente debe desarrollarse un protocolo eficiente en el que pueda utilizarse semen refrigerado y congelado-descongelado, ya que es poco probable que el semental deseado esté disponible cerca del laboratorio de FIV para el uso de semen fresco (Felix et al., 2022).

Como se ha comentado anteriormente, es necesario un mayor estudio de los factores que desencadenan la capacitación *in vivo* para mejorar la PEIV. Avilés, Gutiérrez-Adán y Coy (2010) evidenciaron que el fluido oviductal contiene factores esenciales para la maduración de los gametos, la capacitación espermática y desarrollo embrionario. Por ello, es necesario continuar el estudio de la composición del líquido oviductal (Leemans et al., 2016a).

Por otra parte, debido a que la FIV convencional aún no es una técnica viable comercialmente en caballos, se han utilizado diferentes técnicas para crear embriones equinos para investigación. Uno de esos métodos es la partenogénesis en la que se induce a un ovocito a madurar hasta un estado similar al de un embrión sin la introducción de un espermatozoide; otro método es la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT), en la que se inserta un núcleo de células somáticas de un caballo existente en un ovocito enucleado, creando un clon genético del caballo donante (Hisey, Ross y Meyers, 2021).

Se espera que se desarrollem otras técnicas como el uso de semen sexado, la superovulación y el diagnóstico genético de embriones para poder implantarse de forma eficaz en la industria equina. Además, se están estudiando nuevas técnicas de conservación del semen (Squires, 2019).

VI. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

Tras la revisión bibliográfica se han podido establecer las siguientes conclusiones:

- El desarrollo de la FIV convencional no ha sido comparable al de otras especies debido a la falta de material biológico disponible, al desconocimiento del ambiente oviductal necesario para la capacitación espermática y al endurecimiento prematuro de la zona pelúcida. El protocolo exitoso desarrollado recientemente utiliza semen fresco lo que limita el uso de la técnica a nivel comercial.

- El escaso éxito de la FIV convencional ha impulsado el desarrollo de la ICSI que ha permitido el desarrollo de la PEIV para la industria equina. A pesar de ello, siguen existiendo carencias que deben ser resueltas para poder adaptarse a la alta demanda actual.
- Es necesario un mayor estudio del ambiente fisiológico en el que se desarrolla la maduración del ovocito y la fecundación, ya que permitirá la mejora de las técnicas ya establecidas (OPU-ICSI, TE) y el desarrollo de la FIV convencional.

CONCLUSIONS

After the bibliographic review, the following conclusions have been established:

- The development of conventional IVF has not been comparable to that of other species due to the lack of available biological material, lack of knowledge of the oviductal environment necessary for sperm training and premature hardening of the zona pellucida. The recently developed successful protocol uses fresh semen which limits the use of the technique on a commercial level.
- The limited success of conventional IVF has driven the development of ICSI, which has allowed the development of PEIV for the equine industry. Despite this, there are still deficiencies that must be resolved in order to adapt to the current high demand.
- Further studies of the physiological environment in which oocyte maturation and fertilization takes place are needed, since it will allow the improvement of already established techniques (OPU-ICSI, TE) and the development of conventional IVF.

VII. VALORACIÓN PERSONAL

Gracias a este trabajo he revisado conceptos estudiados durante el grado de veterinaria y he profundizado en algunas de las técnicas específicas de reproducción, he descubierto debido a ello una parte esencial de la cría caballar. Paralelamente a la elaboración de este trabajo he tenido la oportunidad de realizar prácticas con expertos en reproducción equina, gracias a lo cual he podido complementar los conocimientos teóricos adquiridos en el desarrollo de la memoria que aquí presento, obteniendo así una visión global de los procedimientos que podré aplicar en mi futura carrera como veterinaria equina.

Asimismo, he aprendido a utilizar un proceso metodológico para contrastar la información encontrada en bases de datos o fondos bibliográficos y a sintetizar la misma, algo que considero muy útil para futuras búsquedas de información en el desarrollo de mi carrera profesional. Considero, por tanto, haber alcanzado los objetivos de la asignatura.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, M. (1997). *Inseminación artificial en equinos*. Trabajo Fin de Grado. Universidad autónoma agraria “Antonio Narro”.
- Alm, H., Vernunft, A., Torner, H., Bhojwani, S., Becker, F. y Kanitz, W. (2010). “ICSI – A biotechnological method to produce equine embryos *in vitro*”. *Pferdeheilkunde*, 26, pp.59-62. DOI: 10.21836/PEM20100112.
- Alvarenga, M.A., McCue, P.M., Bruemmer, J., Neves Neto, J.R. y Squires, E.L. (2001). “Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary abstract twice daily”. *Theriogenology*, 56 (5), pp. 879-887. DOI: 10.1016/s0093-691x(01)00615-x
- Amann, R.P. (1981). “A review of anatomy and physiology of the stallion”. *Journal of Equine Veterinary Science*, 1 (3), pp. 83-105. DOI : 10.1016/S0737-0806(81)80022-6
- Ángel, D. y Bran, J.A. (2010). “Reproducción asistida en equinos: aportes desde la teoría”. *Revista Ces Med Vet Zootec*, 5 (1), pp. 56-59. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321428103005> [Consultado 01-07-2023].
- Arienti, G., Carlini, E., De Cosmo, A.M., Di Profio, P. y Palmerini, C.A (1998). “Prostasome-like particles in stallion semen”. *Biology of Reproduction*, 59(2), pp. 309-313. DOI: 10.1095/biolreprod59.2.309
- Avilés, M., Gutiérrez-Adán, A. y Coy, P. (2010). “Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs?”. *Molecular Human Reproduction*, 16(12), pp. 896-906. DOI: 10.1093/molehr/gaq056
- Baca, C. y Miragaya, M. (2015). “Biotecnologías reproductivas en equinos”. *Spermova*, 5(2), pp. 189-198. DOI: 10.18548/aspe/0002.38
- Bader, H. (1982). “An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare”. *Journal of Reproduction and Fertility*, 32, pp. 59-64. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6962900/> [Consultado 01-07-2023].
- Bedford, S.J., Kurokawa, M., Hinrichs, K. y Fissore, R.A. (2004). “Patterns of Intracellular Calcium Oscillations in Horse Oocytes Fertilized by Intracytoplasmic Sperm Injection: Possible Explanations for the Low Success of This Assisted Reproduction Technique in the Horse”. *Biology of Reproduction*, 70, pp.936–944. DOI: 10.1095/biolreprod.103.021485.
- Bertero, A., Ritrovato, F., Evangelista, F., Stabile, V., Fortina, R., Ricci, A., Revelli, A., Vincenti, L. y Nervo, T. (2017). “Evaluation of equine oocyte developmental competence using polarized light microscopy”. *Society for Reproduction and Fertility*, 153 (6), pp. 775–784. DOI: 10.1530/REP-17-0125

- Bézard, J. (1992). "In vitro fertilization in the mare". En: Stout, T.A.E. y Wade, J.F. (Coord.) *Proceedings of the Second Meeting of the European equine gamete group (EEGG)*. Cracow (Poland): Agricultural University of Crakow, pp.12.
- Bezard, J., Goudet, G., Duchamp, G. y Palmer, E. (1995). "Preovulatory maturation of ovarian follicles and oocytes in unstimulated and superovulatory mares". *Biology of Reproduction*, 1, pp. 261-271. DOI : 10.1093/biolreprod/52.monograph_series1.261
- Bøgh, I. B., Brink, P., Jensen, H. E., Lehn-Jensen, H. y Greve, T. (2003). "Ovarian function and morphology in the mare after multiple follicular punctures". *Equine Veterinary Journal*, 35 (6), pp. 575-579. DOI: 10.2746/042516403775467243
- Boyle, M.S., Cran, D.G., Allen, W.R. y Hunter, R.H. (1987). "Distribution of spermatozoa in the mare's oviduct". *Journal of Reproduction and Fertility*, 35, pp. 79-86. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3479620/> [Consultado 03-07-2023].
- Brackett, B.G., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F. y Dressel, M.A. (1982). "Normal development following *in vitro* fertilization in the cow". *Biology Reproduction*, 27(1), pp. 147-158. DOI: 10.1095/biolreprod27.1.147
- Brinsko, S.P., Blanchard, T., Varner, D., Schumacher, J., Love, C., Hinrichs, K. y Hartman, D. (2011). *Manual of equine reproduction*. (3^a ed.) Maryland Heights: Mosby Elsevier.
- Brinsko, S.P., Blanchard, T.L., Rigby, S.L., Love, C.C. y Varner, D.D. (2003). "Effects of dead spermatozoa on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-stored equine semen". *Theriogenology*, 59 (3-4), pp. 735-742. DOI: 10.1016/s0093-691x(02)00941-x
- Brinsko, S.P., Varner, D.D. y Blanchard, T.L. (1991). "The effect of uterine lavage performed four hours". *Theriogenology*, 35 (6), pp. 1111-1119. DOI: 10.1016/0093-691X(91)90358-K
- Briski, O. y Salamone, D.F. (2022). "Past, present and future of ICSI in livestock species". *Animal Reproduction Science*, 246. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2022.106925
- Brito, L.F.C. (2007). "Evaluation of Stallion Sperm Morphology". *Clinical Techniques in Equine Practice*, 6(4), pp. 249-264. DOI: 10.1053/j.ctep.2007.09.004
- Cabeza, J.P. y Gambini, A. (2023). "Advancements and challenges in *in vitro* reproductive technologies for the conservation of equine species". *Theriogenology Wild*, 2., pp. 1-7 DOI: 10.1016/j.therwi.2023.100036
- Carnevale, E.M., Squires, E.L., y McKinnon, A.O. (1987). "Comparison of Ham's F10 with CO2 or Hepes buffer for storage of equine embryos at 5C for 24 H". *Journal of Animal Science*, 65 (5), pp. 1775-1781. DOI: 10.2527/jas1987.6561775x

- Carnevale, M.E. y Metcalf, E.S. (2019). "Morphology, developmental stages and quality parameters of *in vitro*-produced equine embryos". *Reproduction, Fertility and Development*, 31, pp. 1758–1770. DOI: 10.1071/RD19257
- Carreño, A.J. (2020). *Antología de la transferencia de embriones en equinos*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Antonio Nariño.
- Choi, Y.H., Gibbons, J.R., Canesin, H.S. y Rooney, K. (2016). "Effect of medium variations (zinc supplementation during oocyte maturation, perifertilization pH, and embryo culture protein source) on equine embryo development after intracytoplasmic sperm injection". *Theriogenoogy*, 86 (7), pp. 1782-1788. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.05.037
- Choi, Y.H., Velez, I.C., Riera, F.L., Roldán, J.E., Hartman, D.L., Bliss, S.B., Blanchard, T.L., Hayden, S.S. y Hinrichs, K. (2011). "Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts". *Theriogenology*, 76, pp. 143–152. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.01.028.
- Claes, A. y Stout, T.A. (2022). "Success rate in a clinical equine *in vitro* embryo production program". *Theriogenology*, 187, pp215-218. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2022.04.019
- Claes, A., Cuervo-Arango, J., Van den Broek, J., Galli, C., Colleoni, S., Lazzari, G., Deelen, C., Beitsma, M. y Stout, T.A. (2018). "Factors affecting the likelihood of pregnancy and embryonic loss after transfer of cryopreserved *in vitro* produced equine embryos". *Equine Veterinary Journal*, 51(4), pp.446-450. DOI:10.1111/evj.13028.
- Consuegra, C., Crespo, F., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., Sánchez-Calabuig, M.J., Beltrán-Breña, P., Pérez-Cerezales, S., Rizos, D. y Hidalgo M. (2020). "Fertilizing capacity of vitrified stallion sperm assessed utilizing heterologous IVF after different semen warming procedures". *Animal Reproduction Science*, 223, 106627. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106627
- Cortes, M. (2020). *Anomalías anatómicas y fisiológicas que afectan la fertilidad de la yegua*. Trabajo Fin de Grado. Universidad autónoma agraria “Antonio Narro”.
- Cuervo-Arango, J., Claes, A. N. y Stout, T. A. E. (2019). "Mare and stallion effects on blastocyst production in a commercial equine ovum pick-up–intracytoplasmic sperm injection program". *Reproduction, Fertility and Development*, 31(12), 1894. DOI: 10.1071/RD19201
- Davies, M.C.G. (2008). *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management* (3rded.). Cambridge: Cambridge University Press.
- Deleuze, S., Dubois, C.S., Caillaud, M., Bruneau, B., Goudet, G. y Duchamp, G. (2010). "Influence of Cysteamine on In Vitro Maturation, In Vitro and In Vivo Fertilization of Equine Oocytes". *Reproduction in Domestic Animals*, 45, pp. 1-7. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2008.01122.x.

- Dell'Aquila, M.E., Masterson, M., Maritato, F. y Hinrichs, K. (2001). "Influence of oocyte collection technique on initial chromatin configuration, meiotic competence, and male pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of equine oocytes". *Molecular Reproduction and Development*, 60 (1), pp. 79–88. DOI: 10.1002/mrd.1064
- Desantis, S., Zizza, S., Accogli, G., Acone, F., Rossi, R. y Resta, L. (2011). "Morphometric and ultrastructural features of the mare oviduct epithelium during oestrus". *Theriogenology*, 75 (4), pp. 671-678. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.10.007
- Dippert K.D., Jasko, D.J., Seidel Jr, G.E. y Squires E.L. (1994). "Fertilization rates in superovulated and spontaneously ovulating mares". *Theriogenology*, 41, 1411–1423. DOI: 10.1016/0093-691x(94)90192-l
- Doty, A., Buhi, W.C., Benson, S., Scoggin, K.E., Pozor, M., Macpherson, M., Mutz, M. y Troedsson, M.H.T. (2011). "Equine CRISP3 modulates interaction between spermatozoa and polymorphonuclear neutrophils". *Biology of Reproduction*, 85 (1), pp.157-164. DOI: 10.1095/biolreprod.110.084491
- Felix, M.R., Turner, R.M., Dobbie, T. y Hinrichs, K. (2022). "Successful *in vitro* fertilization in the horse: production of blastocysts and birth of foals after prolonged sperm incubation for capacitation". *Biology of Reproduction*, 107 (6), pp. 1551–1564. DOI: 10.1093/biolre/ioac172
- Fernández, P. (2023). *Caracterización del fluido folicular y oviductal equino: aplicación a las técnicas de fecundación in vitro*. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura.
- Gadella, B.M., y Harrison, R.A.P. (2002). "Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells". *Biology of Reproduction*, 67(1), 340-350. DOI : 10.1095/biolreprod67.1.340
- Gaetano, M., Merlo, B., Iacono, E. y Belluzzi, S. (2005). "Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations". *Animal Reproduction Science*, 88 (3-4), pp. 299-308. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2005.01.002ç
- Galina, C. y Valencia, J. (2008). *Reproducción de Animales Domésticos* (3^a ed.) México: Limusa.
- Galli, C., Colleoni, S., Claes, A., Beitsma, M., Deelen, C., Necchi, D., Duchi, R., Lazzari, G. y Stout, T. (2016). "Overnight shipping of equine oocytes from remote locations to an ART laboratory enables access to the flexibility of Ovum Pick Up-ICSI and embryo cryopreservation technologies". *Journal of Equine Veterinary Science*, 41. pp. 82. DOI: 10.1016/J.JEVS.2016.04.084

- Galli, C., Colleoni, S., Duchi, R., Lagutina, I. y Lazzari, G. (2007). "Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by *in vitro* procedures ranging from *in vitro* maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer". *Animal Reproduction Science*, 98, pp. 39-55. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2006.10.011
- Giraldo, J.J. (2007). "Una mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos". *Revista Lasallista de Investigación*, 4 (1), pp. 51-57. Disponible en: <http://repository.unilasallista.edu.co/dspace/handle/10567/467> [Consultado 19-07-2023].
- González-Figueroa, H. y González, H.M. (2005). "Biotecnología reproductiva: una alternativa para mejorar la producción animal". *Biotempo*, 5, pp 5-11. Disponible en: <https://revistas.urp.edu.pe/index.php/Biotempo/article/download/886/802/1952> [Consultado: 17-07-2023].
- González, L., Macedo, S., Lopes, J.S., Rocha, A. y Macias-Garcia, B. (2015) "Effect of different media and protein source on equine gametes: potential impact during *in vitro* fertilization". *Reproduction in Domestic Animals*, 50 (6), pp. 1039-1046. DOI: 10.1111/rda.12634
- Goudet, G. (2001). "A comparison between *in vivo* and *in vitro* matured oocytes in the mare". En : Morris, L. H-A, Foster, L. y Wade, J. F. (Coord.). *From epididymis to embryo*. New Orleans: R & W Publications (Newmarket) Limited, pp 44-47.
- Hinrichs K., Love C.C., Brinsko S.P., Choi Y.H. y Varner D.D. (2002). "In vitro fertilization of *in vitro*-matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization *in vivo* after oviductal transfer". *Biology of Reproduction*, 67(1), pp. 256-262. DOI: 10.1095/biolreprod67.1.256
- Hinrichs, K. (2005). "Update on equine ICSI and cloning". *Theriogenology*, 64(3), pp. 535-541. DOI : 10.1016/j.theriogenology.2005.05.010
- Hinrichs, K. (2010). "Application of assisted reproductive technologies (ART) to clinical practice". *American Association of Equine Practitioners Proceedings*, 56, pp. 195–206. Disponible en: <https://aaep.org/issue/application-assisted-reproductive-technologies-art-clinical-practice> [Consultado 19-07-2023].
- Hinrichs, K. (2012). "Assisted reproduction techniques in the horse". *Reproduction, Fertility and Development*, 25(1), pp.80-93. DOI : 10.1071/RD12263
- Hinrichs, K. (2018). "Assisted reproductive techniques in mares". *Reproduction in Domestic Animals*, 53 (2), pp. 4-13. DOI : 10.1111/rda.13259
- Hinrichs, K. y Williams, K.A. (1997). "Relationships among oocytecumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse". *Biol Reprod*, 57, pp. 377-384. DOI: 10.1095/biolreprod57.2.377.

- Hisey, E. A., Ross, P. J. y Meyers, S. (2021). "Genetic Manipulation of the Equine Oocyte and Embryo". *Journal of equine veterinary science*, 3 de febrero. DOI : 10.1016/j.jevs.2021.103394
- Jainudeen, M.R., Wahid, H. y Hafez, E.S.E. (2013). "Ovulation induction, embryo production and transfer". En: Hafez, E. S. E. y Hafez, B. (Coord.). *Reproduction in Farm Animals* (7th ed). USA: Lippincott Williams & Wilkins, pp.405-430.
- Kotilainen, T., Huhtinen, M. y Katila T. (1994). "Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus". *Theriogenology*, 41 (3), pp. 629–636. DOI: 10.1016/0093-691x(94)90173-g
- Lazzari, G., Colleoni, S., Crotti, G., Turini, P., Fiorini, G., Barandalla, M., Landriscina, L., Dolci, G., Benedetti, M., Duchi, R. y Galli, C. (2020). "Laboratory production of equine embryos". *Journal of Equine Veterinary Science*, 89. DOI: 10.1016/j.jevs.2020.103097
- Leemans B., Gadella, B.M., Stout, T.A.E., De Schauwer, C., Nelis, H., Hoogewijs, M. y Van Soom, A. (2016a). "Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization". *Reproduction*, 152 (6), pp. 233-245. DOI: 10.1530/REP-16-0420
- Leemans, B., Gadella, B.M., Stout, T.A.E., Sostaric, E., De Schauwer, C., Nelis, H., Hoogewijs, M. y Van Soom, A. (2016b). "Combined albumin and bicarbonate induces head-to-head sperm agglutination which physically prevents equine sperm-oviduct binding". *Reproduction*, 151 (4), pp. 313–330. DOI: 10.1530/REP-15-0471
- Leemans, B., Stout, T.A.E., De Schauwer, C., Heras, S., Nelis, H., Hoogewijs, M., Van Soom, A. y Gadella, B.M. (2019). "Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species?" *Reproduction*, 157 (5), pp.181-197. DOI : 10.1530/REP-18-0541
- Li, L.Y., Meintjes, M., Graff, K.J., Paul, J.B., Dennison, R.S. y Cooke, R.A. (1995). "In vitro fertilization and development of *in vitro*-matured oocytes aspirated from pregnant mares". En : Sharp, D.C. y Bazer, F.W. (Coord.) *Equine Reproduction VI*. Madison (USA) : Society for the Study of Reproduction, pp. 309-317.
- Maitan, P.P., Bromfield, E., A.E. Stout, T., M. Gadella, B. y Leemans, B. (2021b). "A stallion spermatozoon's journey through the mare's genital tract: *in vivo* and *in vitro* aspects of sperm capacitation". *Animal Reproduction Science*, 246, pp. 1-18 DOI: 10.1016/j.anireprosci.2021.106848
- Maitan, P.P., Bromfield, E.G., Hoogendijk, R., Leung, M.R., Zeev-Ben-Mordehai, T., Van de Lest, C.H., Jansen, J.W.A., Leemans, B., Domingos Guimarães, J., Stout, T.A.E., Gadella B.M. y Henning, H. (2021a). "Bicarbonate-Stimulated Membrane Reorganization in Stallion

Spermatozoa". *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9 DOI: 10.3389/fcell.2021.772254

- McKinnon, A.O., Squires, E.L., Vaala, W.E. y Varner, D.D. (2011). *Equine Reproduction* (2^a ed.). United Kingdom: Wiley-Blackwell.
- McPartlin, L.A., Suarez, S.S., Czaya, C.A., Hinrichs, K. y Bedford-Guaus S.J. (2009). "Hyperactivation of stallion sperm is required for successful *in vitro* fertilization of equine oocytes". *Biology of Reproduction*, 81 (1), pp. 199-206. DOI: 10.1095/biolreprod.108.074880.
- Meizel, S. (1985). "Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface". *The American journal of anatomy*, 174 (3), pp. 285–302. DOI: 10.1002/aja.1001740309
- Moros-Nicolás, C., Douet, C., Reigner, F., Goudet, G. (2019). "Effect of cumulus cell removal and sperm pre-incubation with progesterone on *in vitro* fertilization of equine gametes in the presence of oviductal fluid or cells". *Reproduction in Domestic Animals*, 54 (8). DOI: 10.1111/rda.13479.
- Morris, L.H.A. (2018). "The development of *in vitro* embryo production in the horse". *Equine Veterinary Journal*, 50, pp.712-720. DOI: 10.1111/evj.12839
- Mugnier, S., Kervella, M., Douet, C., Canepa, S., Pascal, G., Deleuze, S., Duchamp, G., Monget P. y Goudet, G. (2009). "The secretions of oviduct epithelial cells increase the equine *in vitro* fertilization rate: are osteopontin, atrial natriuretic peptide A and oviductin involved?" *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7 (129), pp. 1-16. DOI: 10.1186/1477-7827-7-129.
- Ortega, C. (2011). *Factores implicados en la variabilidad individual en la respuesta a la congelación del eyaculado equino: estructura de subpoblaciones, estrés oxidativo y cambios apoptóticos*. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura.
- Osegura-López I., Ruiz-Díaz S., Ramos-Ibeas P. y Pérez-Cerezales S. (2019). "Novel Techniques of Sperm Selection for Improving IVF and ICSI Outcomes". *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7. DOI: 10.3389/fcell.2019.00298.
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. y Van Steirteghem A.C. (1992). "Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte". *Lancet*, 340, pp. 17–18. DOI: 10.1016/0140-6736(92)92425-f
- Palma, G.A. (2001). *Biología de la reproducción*. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (1^a ed.)
- Palmer, E., Bézard, J., Magistrini, M. y Duchamp, G. (1991). "In vitro fertilisation in the horse: a retrospective study". *Journal of reproduction and fertility*, 44, pp. 375–384.

- Ramírez, O. y Suarez, S. (2021). *Fertilización in vitro en equinos*. Disponible en:https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/34462/2/2021_fertilizacion_vitro_equinos.pdf [Consultado: 17-07-2021].
- Roggero, C. M., De Blas, G. A., Dai, H., Tomes, C. N., Rizo, J. y Mayorga, L. S. (2007). “Complexin/synaptotagmin interplay controls acrosomal exocytosis”. *Journal of Biological Chemistry*, 282(36), pp. 26335-26343. DOI: 10.1074/jbc.M700854200
- Rooney, D. (2020). *The failure of IVF in equine reproduction and the subsequent development of OPU and ICSI techniques for the commercial breeding of Sport Horses*. Tesis doctoral. University of Veterinary Medicine Budapest.
- Sadurní, C. (2020). *Nuevos avances en tecnologías reproductivas en equinos*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Lleida.
- Salamone D.F., Canel N.G. y Rodríguez M.B. (2017). “Intracytoplasmic sperm injection in domestic and wild mammals”. *Reproduction*, 154(6), pp. 111–124. DOI: 10.1530/REP-17-0357.
- Salazar, I. (2016). *Embriología veterinaria* (2^aed.). Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela.
- Sansinena, M. (2020). “Assisted Reproductive Biotechnologies in the Horse.” En: Presicce, G. A. (Ed.). *Reproductive Technologies in Animals*. London: Academic Press, pp. 13-27.
- Scott, M.A. (2000). “A glimpse at sperm function *in vivo*: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract”. *Animal Reproduction Science*, 60–61, pp. 337–348. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00130-5
- Scott, M.A. y Overstreet, J.W. (1998). “Sperm transport”. En: Knobil, E. y Neill, J.D. (Coord.). *Encyclopedia of Reproduction*, vol. 4. New York : Academic Press, pp. 610-615.
- Senger, P.L. (2003). “The Organization and Function of the Female Reproductive Tract”. En: Senger P.L. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Pullman: Current Conceptions inc.
- Sessions-Bresnahan, D. R., Graham, J. K. y Carnevale, E. M. (2014). “Validation of a heterologous fertilization assay and comparison of fertilization rates of equine oocytes using *in vitro* fertilization, perivitelline, and intracytoplasmic sperm injections”. *Theriogenology*, 82(2), pp. 274–282. DOI : 10.1016/j.theriogenology.2014.04.002
- Sinowitz, F., Wessa, E., Neumüller, C. y Palma, G. (2003). “On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida”. *Reproduction in Domestic Animals*, 38 (2), pp. 141-146. DOI: 10.1046/j.1439-0531.2003.00401.x
- Sirard, M. (2018). “40 years of bovine IVF in the new genomic selection context”. *Reproduction*, 156 (1), pp. 1-7. DOI: 10.1530/REP-18-0008.

- Sostaric, E., Aalberts, M., Gadella, B.M. y Stout, T.A.E. (2008). "The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm". *Animal Reproduction Science*, 107 (3-4), pp. 237-248. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.04.011
- Squires, E. L., Wilson, J. M., Kato, H. y Blaszczyk, A. (1996). "A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured *in vitro*". *Theriogenology*, 45(1). DOI : 10.1016/0093-691X(96)84779-0
- Squires, E.L. (2006). "Superovulation in Mares". *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 22 (3), pp. 819-830. DOI : 10.1016/j.cveq.2006.07.005
- Squires, E.L. (2019). "Perspectives on the development and incorporation of assisted reproduction in the equine industry". *Reproduction, Fertility and Development*, 31, pp. 1753-1757. DOI : 10.1071/RD19365
- Torres, J. (2012). "Puntos críticos en un programa de transferencia embrionaria", *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 6(2), pp. 108-113. Disponible en: <https://link.gale.com/apps/doc/A343754558/AONE?u=googlescholar&sid=googleScholar&xid=9f1659e1> [Consultado 13-07-2023].
- Trejos, A.A. (2009). *Manejo reproductivo del semental equino*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro".
- Tremoleda, J.L., Stout, T.A.E., Colenbrander, B. y Bevers, M.M. (2001). "Evaluating *in vitro* maturation of horse oocytes". En: Morris, L. H-A, Foster, L. y Wade, J. F. (Coord.). *From epididymis to embryo*. New Orleans: R & W Publications (Newmarket) Limited, pp 44-47.
- Tremoleda, J.L., Stout, T.A.E., Gadella, B.M. y Colenbrander, B. (2004). "Sperm-oocyte interaction during *in vitro* fertilization in the horse". *Reproduction, Fertility and Development*, 16 (2), pp. 263. DOI:10.1071/RDv16n1Ab286
- Troedsson, M.H., Liu, I.K. y Crabo, B.G. (1998). "Sperm transport and survival in the mare : a review". *Theriogenology*, 49 (5), pp. 905-915. DOI: 10.1016/S0093-691X(98)00040-5
- Valenzuela, O.A., Couturier-Tarrade, A., Choi, Y.H., Aubrière, M.C., Ritthaler, J., Chavatte-Palmer, P. y Hinrichs, K. (2018). "Impact of equine assisted reproductive technologies (standard embryo transfer or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with *in vitro* culture and embryo transfer) on placenta and foal morphometry and placental gene expression". *Reproduction, Fertility and Development*, 30(2), pp. 371-379. DOI : 10.1071/RD16536.
- Vanderwall, D. K., Hyde, K. J. y Woods, G.L. (2006). "Effect of repeated transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration on fertility in mares". *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228 (2), pp. 248-250. DOI : 10.2460/javma.228.2.248

- Vanderwall, D.K. y Woods, G.L. (2002). "Severe internal hemorrhage resulting from transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in a mare". *Journal of Equine Veterinary Science*, 22 (2), pp. 84-86. DOI: 10.1016/S0737-0806(02)70094-4
- Vanderzwalmen, P., Bertin, G., Lejeune, B., Nijs, M., Vandamme, B. y Schoysman, R. (1996) "Two essential steps for a successful intracytoplasmic sperm injection: injection of immobilised spermatozoa after rupture of the oolema". *Human Reproduction*, 11(3), pp. 540-547. DOI: 10.1093/humrep/11.3.540
- Velez, I. C., Arnold, C., Jacobson, C.C, Norris, J.D., Choi, Y.H., Edwards, J.F., Hayden, S.S. y Hinrichs, K. (2012). "Effects of repeated transvaginal aspiration of immature follicles on mare health and ovarian status". *Equine Veterinary Journal Supplement*, (43), pp. 78-83. DOI : 10.1111/j.2042-3306.2012.00606.x
- Vélez, I.C. y Hinrichs, K. (2011). Técnicas de reproducción asistida en caballos. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 6(2), pp. 124–128. Disponible en: <https://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/view/2066> [Consultado 13-07-2023].
- Visconti, P. E., Moore, G.D., Bailey, J.L., Leclerc, P., Connors, S.A., Pan, D., Olds-Clarke, P. y Kopf, G.S. (1995). "Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway". *Development*, 121 (4), pp. 1139-1150. DOI : 10.1242/dev.121.4.1139