



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en

VETERINARIA

Técnicas de reproducción asistida en la especie equina: revisión actual

Equine assisted reproduction techniques: current review

Autor/es

Marie Bertholon

Director/es

Lydia Gil Huerta

Facultad de Veterinaria

2023/2024

INDICE

INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS	6
METODOLOGÍA	6
RESULTADOS y DISCUSIÓN	7
TECNOLOGIAS SEMINALES	7
INSEMINACION ARTIFICIAL	12
TECNOLOGIAS OVOCITARIAS	15
FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV)	18
TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (TE)	22
TECNOLOGIAS GENETICAS APLICADAS EN REPRODUCCIÓN	22
• Transferencia nuclear (SNCT)	22
• Transferencia de genes mediada por espermatozoides (SMGT)	25
• Edición Génica	25
• CRISPR/Cas9	26
• Partenogénesis	26
TECNOLOGIAS DE SEXAJE	27
• Sexaje de espermatozoides	27
• Sexaje de embriones	28
• Sexaje fetal	29
CONCLUSIONES	30
VALORACION PERSONAL	31
BIBLIOGRAFIA	32

INDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS

Figura 1: Técnicas avanzadas de selección espermática	12
Figura 2: INRA96®	13
Figura 3: Útero de yegua mostrando los sitios de depósito de semen	13
Figura 4: Método de inseminación postcervical con semen refrigerado	13
Figura 5: Gent® y Botucrio®	14
Figura 6: Bifurcación uterina (izquierda) y unión útero-tubular (derecha) visualizados a través de un videoendoscopio	14
Figura 7: Procedimiento de inseminación profunda con semen congelado	15
Figura 8: Folículo dominante cerca de la ovulación	15
Figura 9: Técnica de OPU	16
Figura 10: Aguja de aspiración insertada hasta el centro de un folículo dominante, controlado por ecografía transrectal	16
Figura 11: Ovocitos equinos	17
Figura 12: Procedimiento de inyección intracitoplásmica en un ovocito equino	19
Figura 13: Secuencia de punción y extracción del blastocele de un blastocisto expandido	21
Figura 14: Procedimiento de transferencia embrionaria	22
Figura 15: Clon Prometea	23
Figura 16: Proceso de clonación (SNCT) en la especie equina	24
Figura 17: Determinación del sexo fetal mediante ecografía transrectal en modo B	29
Figura 18: Imagen de ecografía Doppler color en el día 240 de gestación, que muestra el patrón de vascularización característico de la gónada masculina, con el plexo pampiniforme y la vena testicular	30
Gráfica 1: Distribución anual de las publicaciones obtenidas a partir de las distintas búsquedas seleccionadas	7
Gráfica 2: Distribución anual de las publicaciones seleccionadas para la redacción de este trabajo	7

RESUMEN/ABSTRACT

Título: *Técnicas de reproducción asistida en la especie equina: revisión actual*

La importancia económica y la mejora genética actual en la especie equina explica la expansión de nuevas biotecnologías como son las técnicas de reproducción asistida (TRA). Con estas técnicas se intenta paliar los problemas de fertilidad y sus consecuentes bajas tasas de concepción, un problema en la industria equina, explicando el desarrollo y perfeccionamiento constante de TRA. Las técnicas ampliamente usadas como la inseminación artificial o la transferencia de embriones fueron objeto de un estudio profundo en el pasado y siguen investigadas hoy en día, buscando nuevas estrategias para su uso. El perfeccionamiento de técnicas como el tratamiento del semen, o la criopreservación de varios tipos de células como gametos y embriones, permite mejorar cada vez más el rendimiento reproductivo.

Otras biotecnologías más recientes, como la aspiración folicular transvaginal, la transferencia de ovocitos, la inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), o la transferencia nuclear de células somáticas, están obteniendo avances notables y constituyen actualmente líneas de investigación para ser utilizadas de forma rutinaria.

Además, las nuevas tecnologías genéticas desarrolladas en la última década como la selección y edición de genes, o la transferencia nuclear permiten obtener una descendencia con características determinadas y ampliamente deseadas, en un ámbito deportivo, estético o reproductivo.

Cada procedimiento ulteriormente citado, presentando indicaciones y limitaciones, resulta interesante su adaptación en cuanto a su aplicación práctica por veterinarios formados, en el ejercicio de su función laboral diaria. Destaca la importancia de la colaboración interdisciplinaria entre veterinarios, biólogos, y genetistas para avanzar en la mejora de las TRA.

Palabras clave: biotecnologías reproductivas, yegua, semental, semen, ovocitos, genética, fertilización.

Title: *Equine assisted reproduction techniques: current review.*

The current economic importance and genetic improvement in the equine species explains the expansion of new biotechnologies such as assisted reproductive techniques (ART). These techniques are intended to alleviate fertility problems and the resulting low conception rates, a problem in the equine industry, explaining the constant development and improvement of ART. Widely used techniques such as artificial insemination or embryo transfer have been studied in depth in the past and are still being researched today, looking for new strategies for their use. Other more recent biotechnologies, such as transvaginal follicular aspiration, oocyte transfer, intracytoplasmic sperm injection (ICSI), or somatic cell

nuclear transfer, are making remarkable progress and are now lines of research for routine use. In addition, the new genetic technologies developed in the last decade, such as gene selection and editing, or nuclear transfer, make it possible to obtain offspring with specific and widely desired characteristics, whether for sport, aesthetic or reproductive purposes

Each of the procedures listed below, with their indications and limitations, is interesting to adapt in terms of their practical application by trained veterinarians in their daily work. It highlights the importance of interdisciplinary collaboration between veterinarians, biologists and geneticists to advance the improvement of ART.

Keywords: reproductive biotechnologies, mare, stallion, semen, oocytes, genetics, fertilization.

INTRODUCCIÓN

En la última década, se han logrado avances significativos en el ámbito de la reproducción equina, lo que ha llevado a la aparición de tecnologías avanzadas de reproducción asistida (TRA), ayudando a superar múltiples problemáticas. Es esencial comprender la creciente importancia que la reproducción asistida tiene actualmente dentro de la industria equina (Stout, Crabtree y Cuervo-Arango, 2024), lo que hace necesario profundizar en estas nuevas técnicas en cuanto a su evolución, sus aplicaciones y sus contribuciones para elevar la eficacia reproductiva en los caballos.

Los objetivos de estas estrategias, según Hinrichs (2012) han sido la mejora de la eficiencia reproductiva, lo que incluye un aumento de la tasa de concepción y una disminución de los períodos intergestacionales así como preservar o mejorar los rasgos deseables en caballos a través de líneas genéticas valiosas. Sin embargo, la infertilidad es un gran desafío en cuanto al éxito de las TRAs ya que estas se ven afectadas por múltiples factores, como cambios en la producción, movilización del semen, problemas ovulatorios, etc. Además, la endometritis contribuye significativamente a la infertilidad de las yeguas y explica también el impulso de la investigación hacia tecnologías reproductivas innovadoras.

Durante el siglo pasado, se desarrollaron numerosos métodos de reproducción asistida. En los años 1930, se realizaron los primeros intentos de inseminación artificial con semen fresco, en los 1970, se introdujo la inseminación artificial con semen congelado, en la década de los 80 del siglo XX, se llevaron a cabo avances significativos en la transferencia de embriones y en la década 1990, se desarrollaron técnicas de fertilización *in vitro*, abriendo nuevas posibilidades (Ángel y Bran, 2010).

La criopreservación del semen ha permitido superar las barreras geográficas y temporales, posibilitando una amplia distribución genética, sin que la distancia represente un límite (De Coster et al., 2020). Sin embargo, la gestación equina de 11 meses y la desventaja de la gestación gemelar limitan significativamente la cantidad de descendencia por yegua en un año. La tecnología de transferencia embrionaria ha sido fundamental para superar estas limitaciones fisiológicas, permitiendo una propagación genética más rápida y efectiva.

Otras nuevas TRAs como la biopsia embrionaria, la vitrificación de embriones y la clonación se desarrollaron igualmente, y hoy en día están siendo empleadas con éxito en esta industria. Para ello se siguieron los estudios realizados en la especie bovina, utilizando los ovarios de matadero con una disponibilidad casi ilimitada de ovocitos (Deleuze, 2019).

OBJETIVOS

Los siguientes objetivos son los que consideramos alcanzar con este trabajo:

- Investigar los avances en biotecnologías y técnicas de reproducción asistida, analizando su viabilidad y aplicabilidad en la especie equina.
- Documentar los parámetros reproductivos específicos que influyen en la aplicación de estas nuevas técnicas.
- Explorar las bases genéticas de las técnicas de reproducción asistida para comprender mejor los mecanismos subyacentes y su impacto en la genética equina.

METODOLOGÍA





La realización de este trabajo se llevó a cabo mediante una revisión sistemática de documentos científicos relativos a las técnicas de reproducción asistida en équidos, incluyendo revisiones y artículos científicos. Se usaron diversas fuentes, tales como libros y trabajos en sitios web oficiales y motores de búsqueda como *Pubmed*, *Web of Science*, *ScienceDirect* y *Google Académico*.

Las palabras clave usadas para la búsqueda fueron: ***Assisted reproductive techniques, Semen processing, Cryopreservation y Intracytoplasmic Sperm Injection***. La investigación se limitará a artículos de la última década, escritos en inglés, francés y español, y enfocados en la especie equina. Los estudios que no cumplían con estos criterios fueron excluidos, al menos que fueran descriptivos de procesos antiguos y necesarios para la comprensión de los métodos explicados.

Según lo ilustrado en el **Gráfico 1**, en los diez últimos años, la investigación en el campo de la reproducción equina ha mantenido una estabilidad relativa, sin mostrar signos de incremento significativo, aunque la tendencia de los últimos cinco años aparece ligeramente acentuada en cuanto a su estudio. Esto sugiere que los avances más relevantes en este ámbito se han distribuido a lo largo de varios años en lugar de concentrarse en un periodo corto de tiempo.

El resultado de la selección de artículos empleados para la realización de este trabajo se representa en el **Gráfico 2**. Se puede observar que el 71 % de los artículos empleados cuya fecha de publicación es superior al 2013 han sido editados en los últimos años, a partir del 2017, por lo que gran parte de la información es considerablemente reciente. Los artículos de fecha de publicación inferior al 2013 no se representan en esa gráfica, ya que su empleo se limita a un uso descriptivo de procesos anatómicos y fisiológicos o explicativo de técnicas antiguas.

El número de publicaciones seleccionadas para la realización del trabajo es el siguiente, según la ecuación de búsqueda realizada para encontrarlos:

-  Assisted reproductive techniques [MeSH Terms] AND equine: 139
-  Semen processing [MeSH Terms] AND stallion: 38
-  Oocyte cryopreservation [MeSH Terms] AND equine: 12
-  Intracytoplasmic Sperm Injection [MeSH Terms] AND mare: 18

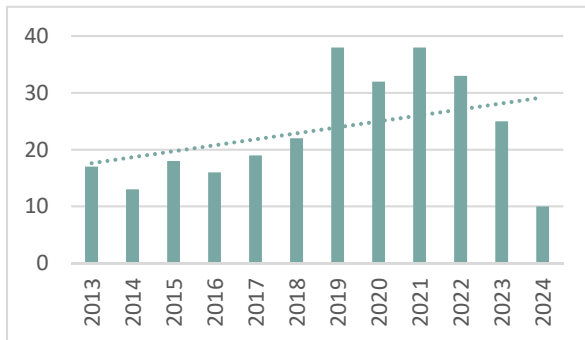


Gráfico 1: Distribución anual de las publicaciones obtenidas a partir de las distintas búsquedas seleccionadas.

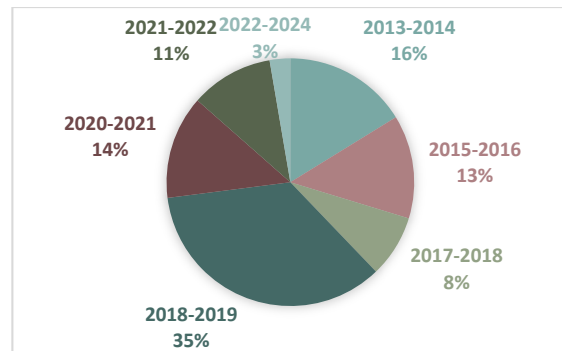


Gráfico 2: Distribución anual de las publicaciones seleccionadas para la redacción de este trabajo.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

▪ TECNOLOGÍAS SEMINALES

Una de las TRAs más usada hoy en día en la especie equina son las tecnologías seminales, las cuales engloban los diferentes procesos aplicados al semen, desde su recogida hasta su utilización incluyendo todos los procesos de preservación espermática.

La recogida seminal y la realización de un espermograma permiten, según Zuidema, Kerns y Sutovsky (2020), la evaluación de la capacidad reproductiva de los sementales, el control regular de su calidad, la determinación del nivel de fertilidad y su uso, especialmente en la inseminación artificial.

Se han desarrollado varias tecnologías innovadoras en las últimas décadas, que han permitido un avance crucial en el campo de la reproducción equina, tales como la criopreservación (Restrepo et al., 2019), el sexaje y la selección espermática (Garner, Evans y Seidel, 2013).

Preservar la integridad de los espermatozoides sometidos a protocolos de conservación es un desafío fundamental para el éxito en el desarrollo de procedimientos de TRAs (Restrepo et al., 2019), y

desempeña un papel importante en cuanto a la fertilidad obtenida tras su uso. La técnica de criopreservación de semen es un avance significativo y muy establecido en la actualidad. No obstante, según Alvarenga *et al.* (2005), sigue habiendo hoy en día una proporción de sementales con una calidad espermática y fertilidad deficientes después del proceso de congelación y descongelación. La calidad y fertilidad del semen después de la descongelación se ve afectado por diversos factores (Aurich, *et al.*, 2020):

- ✚ las características individuales de cada animal,
- ✚ la técnica empleada para la extracción del plasma seminal,
- ✚ el tipo de diluyente utilizado,
- ✚ el medio de dilución espermática,
- ✚ la curva de congelación de las pajuelas de semen,
- ✚ el tipo de almacenamiento de las pajuelas,
- ✚ el tiempo de conservación
- ✚ la temperatura de descongelación,
- ✚ la dosis seminal utilizada,
- ✚ la técnica de inseminación utilizada.

Al haber tantos factores influyentes en el éxito de la criopreservación espermática, no existe un protocolo ideal aplicable a todos los casos de reproducción asistida (Ramires Neto *et al.*, 2013).

El éxito de la criopreservación espermática equina está directamente relacionado (Restrepo *et al.*, 2019) con el efecto individual de la raza sobre la tolerancia al frío de los espermatozoides así como una reducción en el número de alteraciones que afectan a diversos aspectos como la motilidad total, la motilidad progresiva, la velocidad curvilínea, la linealidad, la permeabilidad de la membrana plasmática, la morfología, la fragmentación del ADN, la peroxidación lipídica e incluso la actividad mitocondrial del esperma.

Además, una importante desventaja que presentan los métodos de criopreservación es la necesidad de utilizar tanques de nitrógeno líquido. Estos últimos están asociados con problemas como el mantenimiento constante, la posible contaminación viral de las pajuelas y la pérdida potencial de calidad espermática (Oldenhof, Wolkers y Sieme, 2021).

Siendo constantes los costes, la rentabilidad de los procesos de recolección y congelación reside en el porcentaje del semen congelado-descongelado considerado como aceptable para su uso y de la cantidad de dosis obtenidas a partir de un mismo eyaculado (Broгна *et al.*, 2021).

Brogna et *al.*, en un estudio del 2021, demostraron que la edad y la raza del semental determinan el porcentaje de eyaculados convenientemente criopreservados para la inseminación artificial (IA). Con la edad del semental, se ve aumentado el riesgo de pérdida de estándares de calidad de los eyaculados para la criopreservación. Además, evidenciaron que existe una base genética explicando la criotolerancia del semen equino. En este análisis, la cantidad total de espermatozoides por eyaculado fue la variable más importante para la cantidad de dosis preparadas.

Como indica Ramirez Net et *al.* (2013), la extracción del plasma seminal antes de la congelación es el procedimiento más eficaz entre los requeridos para la congelación y constituye un paso fundamental. La técnica convencional para extraer el plasma seminal del eyaculado consiste en una centrifugación. No obstante, este procedimiento podría ocasionar daño mecánico al esperma (Sieme et *al.*, 2003). Con el objetivo de concentrar el semen sin recurrir a la centrifugación y minimizar el daño, Alvarenga et *al.* (2010) han estudiado un método novedoso, el cual implica la extracción del plasma seminal mediante la filtración del semen a través de un filtro compuesto por una membrana sintética hidrofílica (Sperm Filter, BotuPharma, Botucatu, Sao Paulo, Brasil).

Ciertos componentes del plasma seminal pueden presentar funciones beneficiosas y otros implicar efectos adversos en el proceso de crioconservación, como lo explican Šichtař et *al.* (2019). La identificación, el aislamiento de estas sustancias y la evaluación de sus efectos en semen congelado y descongelado podrían permitir implementar nuevas estrategias de crioconservación para mejorar la viabilidad y el rendimiento de los eyaculados, sobretodo en casos de sementales con baja calidad de congelación.

La motilidad espermática aparece incrementada con la incorporación posterior, tras la descongelación, de plasma seminal de sementales presentando una congelabilidad media o superior. Además, este método permite mantener la integridad de la membrana plasmática en sementales con congelabilidad deficiente (Šichtař et *al.*, 2019). Aunque generalmente el porcentaje de sementales que a la descongelación presentan una baja calidad, menos espermatozoides móviles, este semen podría estar utilizado de manera exitosa en TRAs como la IA intrauterina profunda o la producción *in vitro* de embriones, para los cuales es posible seleccionar los mejores espermatozoides.

Desde un punto de vista comercial, el número de dosis de semen criopreservado por eyaculación es de gran interés, siempre y cuando la calidad del semen después de la descongelación sea aceptable. Además, la composición del plasma seminal varía con las temporadas según Brogna et *al.* (2021), lo cual contribuye a cambios en la calidad del semen y es más importante durante los meses de verano, siendo los meses de mayor producción de semen criopreservado.

Otro sistema de preservación actualmente en desarrollo es la **liofilización espermática**. Según Brogna et al. (2021), aunque la práctica de criopreservación de semen está muy extendida hoy en día, el almacenamiento en tanques de nitrógeno líquido sigue siendo problemático en particular debido a su gran tamaño. Eso explica la búsqueda de una alternativa viable, como la conservación de espermatozoides en estado seco a temperaturas refrigeradas o ambientales, permitiendo también facilitar el proceso de envío y reducir los costes asociados al almacenamiento en nitrógeno líquido.

La técnica de liofilización permite eliminar la mayor parte del agua de una muestra en condiciones de vacío y baja temperatura. Es un método utilizado para la conservación de semen en diversas especies, como bovinos y cerdos, logrando incluso la producción de blastocitos. A pesar de que las células generadas por el proceso de criopreservación son viables y funcionales, el secado por convección o liofilización no lo permite. No obstante, como lo describe Choi (2011), los núcleos obtenidos a partir de células secas no viables han logrado generar crías viables mediante transferencia nuclear somática o inyección intracitoplasmática de espermatozoide en un ovocito (ICSI).

Sin embargo, durante este proceso, el ADN de los espermatozoides puede estar dañado como consecuencia del estrés, el secado o la rehidratación. En efecto, según Restrepo et al. (2019), la liofilización del semen puede alterar la viabilidad de las células, al igual que en los procesos de congelación y la vitrificación. Los autores también explican que la estabilidad de la cromatina de los espermatozoides en seco puede verse afectada por la temperatura y la duración del almacenamiento, la composición de la solución de conservación, el contenido residual de agua en la muestra y las condiciones atmosféricas de almacenamiento. Por otro lado, la tolerancia al daño inducido por la deshidratación depende del estado intrínseco de maduración/desulfuración del semen (Brogna et al., 2021).

También, Restrepo et al. (2019), destacan que los espermatozoides liofilizados pueden almacenarse de manera temporal a temperatura ambiente sin necesidad de usar crioprotectores especializados. En este caso, y a diferencia de la congelación y la vitrificación, se produce menos peroxidación lipídica a nivel del esperma y el proceso puede permitir facilitar una mayor preservación de la membrana mitocondrial del espermatozoide.

Hoy en día, para lograr un aumento de las tasas de fecundación y tasa de preñez en la práctica de TRAs, los criadores pueden seleccionar un esperma de mejor calidad dentro de un mismo eyaculado. En este caso es imprescindible investigar las técnicas disponibles para la **selección de espermatozoides** (Orsolini et al., 2021). Con los avances actuales y futuros en tecnologías de selección de espermatozoides se puede realizar una selección en calidad y sexo para ICSI, por ejemplo.

Destacar que para este procedimiento la selección manual de espermatozoide no permite la selección natural de espermatozoides viables como ocurriría de forma natural en el tracto reproductivo de la hembra y, en menor medida, durante los procedimientos convencionales de fecundación *in vitro* (FIV) (Hidalgo et al., 2017). Consecuentemente, como lo describen Assumpção et al. (2023), la ausencia de selección natural de espermatozoides puede ser un obstáculo para lograr la fecundación y el desarrollo óptimo. Específicamente con la ICSI, existe la posibilidad de seleccionar un espermatozoide que parezca normal visualmente pero que tenga daños en su ADN o estructura interna. Esto podría dar lugar a un desarrollo embrionario anormal o incluso a un aborto espontáneo. Para optimizar los resultados de la ICSI, según Orsolini et al. (2021), es necesario el uso de técnicas de selección de espermatozoides más competentes de una muestra ya que es un proceso crítico para obtener resultados satisfactorios.

Con el fin de elegir la fracción de espermatozoides viables de "alta calidad" en una misma muestra, es necesario basarse en la motilidad, morfología, integridad del ADN, carga superficial y marcadores bioquímicos como indicadores de fertilidad potencial. Sin embargo, para predecir la fertilidad, hay cada vez más evidencias de que los parámetros de selección convencionales no son suficientes. Aunque se ha demostrado que las técnicas tradicionales de selección son efectivas para seleccionar espermatozoides móviles y morfológicamente normales, no tratan otros factores importantes como la fragmentación del ADN, la integridad de la membrana y la ultraestructura del espermatozoide (Assumpção et al., 2023). Los métodos de selección espermática más ampliamente usados hoy en día son: la técnica de swim up (SU) y la centrifugación en gradiente de densidad (DGC). La utilización ambas técnicas es amplia debido a su simplicidad y rentabilidad, y se ha demostrado que seleccionan una mejor motilidad, morfología y madurez nuclear en una muestra de semen, aunque todavía existe margen para mejorar la precisión.

Como queda ilustrado en la **Figura 1**, otras técnicas avanzadas de selección espermática se han desarrollado en los últimos años (Orsolini et al., 2021), tales como:

- la combinación densidad Gradiente-Swim Up (DGC-SU),
- la filtración con lana de vidrio (GWF),
- la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS),
- la clasificación microfluídica (MF),
- la clasificación celular activada magnéticamente (MACS),
- la selección del potencial zeta.

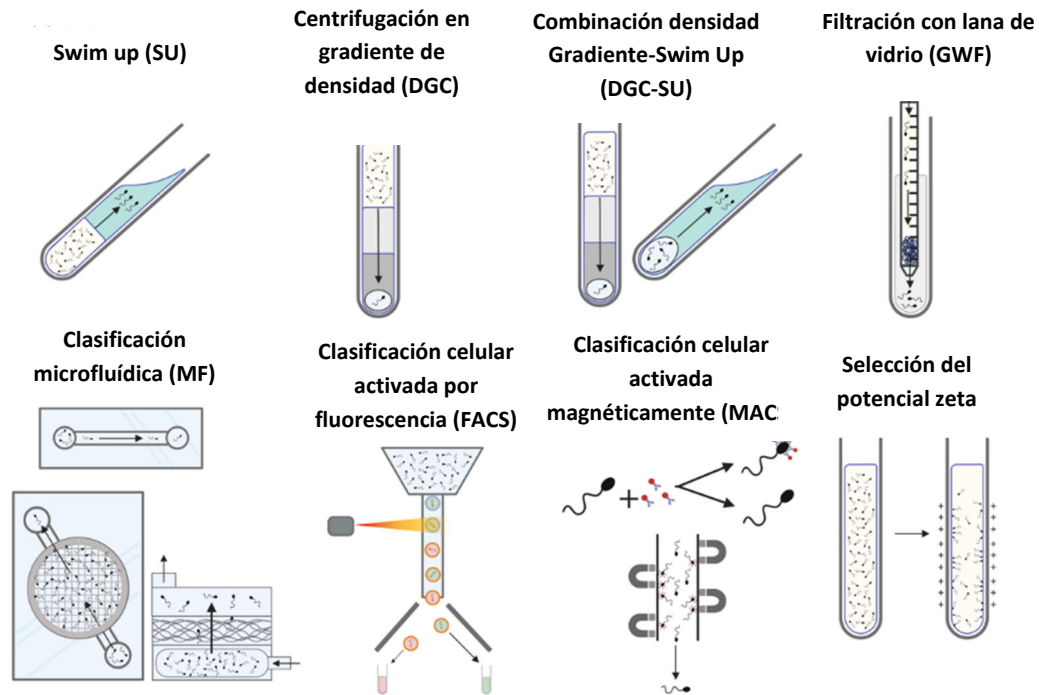


Figura 1: Técnicas avanzadas de selección espermática (Orsolini et al., 2021).

▪ INSEMINACION ARTIFICIAL

Hoy en día, la inseminación artificial (IA) sigue siendo la TRA más usada en la especie equina. Se suele utilizar como método individual o como parte esencial de otros métodos de reproducción asistida. Tiene varias ventajas importantes (Hernández, 1995) como son permitir una mayor dispersión geográfica de sementales de alta calidad, facilitando la mejora genética, además evita los inconvenientes ligados al desplazamiento de las yeguas, previene la propagación de enfermedades de transmisión venérea, reduce los costes debidos a la cubrición y previene la sobreutilización de sementales

También, la IA permite una evaluación previa del semen antes de su uso en la reproducción. En efecto, con este análisis preliminar, Kowalczyk et al. (2019) explican que con ello se asegura la calidad del material genético y se optimizan las tasas de fertilidad garantizando el uso de espermatozoides móviles y vivos.

Las yeguas ser pueden inseminar con diferentes tipos de semen: fresco, refrigerado o congelado. Esto proporciona más o menos flexibilidad en la planificación y ejecución del proceso reproductivo. Al tener tantas opciones, es posible adaptarse a las necesidades específicas de cada situación y maximizar las posibilidades de éxito.

La inseminación artificial con **semen fresco**, recién recogido del semental, se valora, se cuantifica, puede diluirse para utilizarse en varias yeguas. Se suele utilizar una dosis mínima de 500 millones de espermatozoides con motilidad progresiva (Hidalgo et al., 2020).

El **semen refrigerado** se lleva al punto de inseminación en condiciones de temperatura regulada, entre 4°C y 8°C, lo que permite un período de tiempo más amplio para la inseminación, oscilando entre uno y tres días dependiendo de la calidad del semen y las condiciones de almacenamiento (Dascanio y McCue, 2014). Este método se usa para distancias intermedias de traslado de semen y facilita una buena flexibilidad en cuanto al momento de la inseminación. Para el proceso de refrigeración, el diluyente INRA96 es uno de los más usados y permite mejorar notablemente la conservación y mantener el potencial de fertilidad hasta 48 horas (**Figura 2**)



Figura 2: INRA 96®.

Fuente: www.imvtechnologies.es/producto/inra

Para realizar la IA utilizando muestras frescas o refrigeradas se utiliza la técnica de IA postcervical, la cual consiste en introducir una sonda conectada a una jeringa conteniendo el semen, por vía vaginal, hasta pasar el cuello del útero (**Figura 3**), guiándose con el dedo que se introduce en el cérvix (Imposti, Ambrosius y Mascioli, 2018). El procedimiento se ilustra en la **Figura 4**.



Figura 3: Útero de yegua mostrando los sitios de depósito de semen.

A: Cuerpo del útero

B: Extremo del cuerno del útero (Samper, 2009).

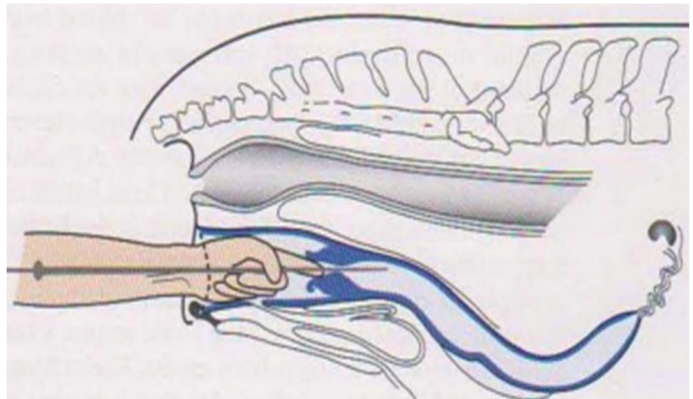


Figura 4: Método de inseminación postcervical con semen refrigerado (Senger, 2005).

Con el **semen congelado**, se mantienen los espermatozoides a temperaturas extremadamente bajas, generalmente alrededor de -196°C, utilizando nitrógeno líquido para su preservación. Este proceso de criopreservación, como lo explican Dascanio y McCue (2014), garantiza la conservación del semen por períodos prolongados y su transporte a largas distancias. Esto resulta beneficioso para la distribución a

gran escala y para la inseminación en momentos específicos del ciclo reproductivo de la hembra. No obstante, es importante tener en cuenta que el proceso de congelación puede causar daño a algunas células espermáticas, lo que puede resultar en una tasa de fertilidad menor en comparación con el semen fresco o refrigerado.

Por ese motivo, se añaden diluyentes, siendo sustancias que aumentan la viabilidad de los espermatozoides recién colectados. Estos pueden contener azúcares, tampones, antibióticos, fungicidas, yema de huevo y leche descremada, además deben proporcionar una presión osmótica y pH estables, aportar nutrientes y sustancias que protegen a los espermatozoides de las bajas temperaturas a las cuales son sometidos (Celis, et al., 2014).

El diluyente ideal usado para la criopreservación en esta especie debe proporcionar una reducción del daño ocasionado por el frío y aumentar la recuperación de espermatozoides móviles y viables incrementando así las tasas de espermatozoides útiles (Duque, Restrepo y Rojano 2016). Un ejemplo de diluyente es el Gent® y Botucurio®. (Figura 5).



Figura 5: Gent® y Botucurio® (www.minitube.com/catalog/es/gent/(https://www.globalmedgroup.com/Medios-de-cultivo-animal-140s)

Es necesario que los diluyentes tengan en su composición crioprotectores que previenen de la formación de cristales intracelulares y disminuyen los efectos tóxicos de solutos, sales o iones. Pueden ser penetrantes o no (Bollweinb et al., 2019), variando así la velocidad de congelación y la respuesta en el proceso de descongelación.

La técnica más empleada, cuando se usan dosis de semen congelado, es la ***inseminación intrauterina profunda***. Se trata de un procedimiento utilizado para depositar el semen profundamente en el útero, cerca de la papila (unión útero-tubular), ilustrada en la **Figura 5**. Este método permite una colocación más precisa y cercana a la ubicación natural de la fecundación lo que puede aumentar las posibilidades de éxito, en la reproducción.

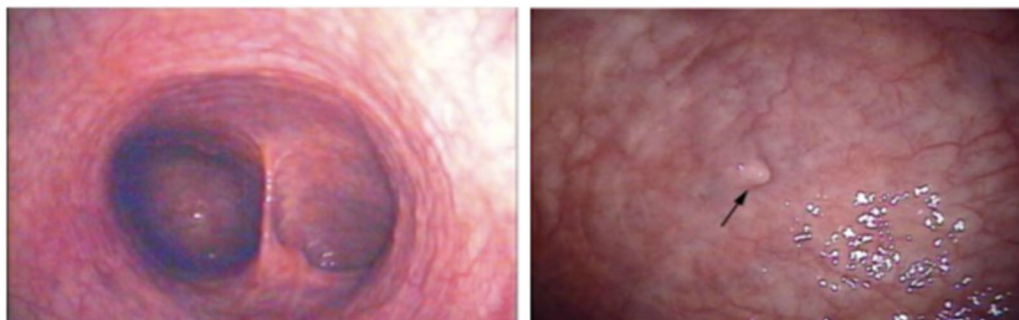


Figura 6: Bifurcación uterina (izquierda) y unión útero-tubular (derecha) visualizados a través de un video endoscopio (Dascanio y McCue, 2014).

Durante la inseminación profunda, se introduce un catéter a través de la vagina y el cérvix, hasta llegar al útero. Una vez en posición, el semen es depositado en el útero utilizando el catéter (**Figura 7**). Esta



Figura 7: Procedimiento de inseminación profunda con semen congelado (Boeta, Diaz y Hayen, 2017).

técnica se realiza preferiblemente cuando la yegua está en el momento óptimo de su ciclo reproductivo, generalmente durante la ovulación. El seguimiento del ciclo reproductivo de la yegua se lleva a cabo mediante exploración ecográfica transrectal del aparato reproductivo, determinando el nivel de edema intrauterino y la presencia de folículos dominantes ovulatorios, adoptando una forma característica, como la ilustrada en la **Figura 8**. La determinación del momento exacto de la ovulación determina la necesidad de inducir el momento de la ovulación (Chávez et al., 2020), mediante un

tratamiento hormonal con gonadotropina coriónica humana (hCG) o acetato de deslorelina o sus derivados.

La inseminación profunda tiene varias ventajas: permite una mayor concentración de espermatozoides en el sitio de fecundación y una reducción del riesgo de pérdida de semen durante el proceso (Dascanio y McCue, 2014). Además, el riesgo de contaminación está minimizado y la eficacia del procedimiento incrementada.

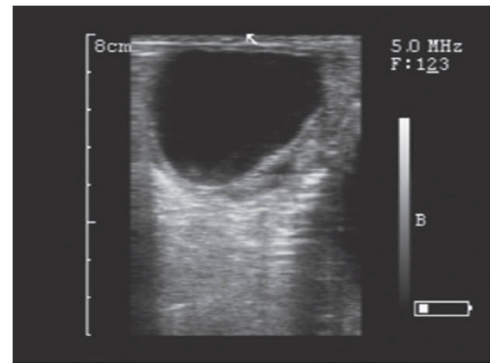


Figura 8: Folículo dominante cerca de la ovulación (Ramírez, Gutiérrez y Ramos, 2010).

Un sistema más eficiente es la **inseminación histeroscópica** en la cual se utiliza un catéter especial para introducir el semen a nivel de la unión útero-tubárica ipsilateral al folículo ovulatorio, usando un histeroscopio (Bosteels et al., 2015). Esta técnica puede aumentar las tasas de concepción en comparación con los métodos tradicionales de inseminación ya que proporciona una colocación precisa del semen en el sitio más óptimo (Chen et al., 2021). La inseminación histeroscópica es especialmente útil en yeguas con fertilidad reducida o en casos donde se sospecha la presencia de anomalías uterinas. Puede ser utilizada también para la evaluación y tratamiento de patologías reproductivas (Morris, 2004).

▪ TECNOLOGIAS OVOCITARIAS

La **superovulación** es un método que implica la estimulación del ovario con hormonas externas para generar múltiples folículos, lo que proporciona múltiples beneficios para las TRAs, pudiendo mejorar la

transferencia embrionaria (TE), la fecundación *in vitro* (FIV), o la criopreservación de ovocitos o embriones (Ginther, 2023).

Inicialmente, se investigó la superovulación en yeguas cíclicas, utilizando extracto pituitario equino (EPE) para inducir ovulaciones múltiples en yeguas anovulatorias estacionales (Abril, Castro y Porras, 2007) pero, los resultados fueron insatisfactorios con este control hormonal. En 2019, Roser y Meyers-Brown presentaron dos nuevas gonadotropinas estimulantes, reFSH y reLH, creadas mediante tecnología recombinante, que demostraron eficacia tanto en yeguas cíclicas como en aquellas que estaban en anestro estacional. Son moléculas de cadena única, heterodímeros, desarrolladas mediante ingeniería genética del DNA complementario (cDNA) que codifica cada subunidad de las hormonas nativas.

La **recolección de ovocitos (OPU)**, también conocida como aspiración folicular o punción folicular, es una técnica aplicada en producción *in vitro* de embriones. El procedimiento se realiza mediante la ovopunción transvaginal (Lazzari et al., 2020), bajo anestesia general o sedación. La ovopunción transvaginal es ecoguiada y se lleva a cabo mediante la introducción de una aguja a través de la pared vaginal hacia el ovario para aspirar el líquido intrafolicular y extraer los ovocitos (**Figuras 9 y 10**). El procedimiento dura de 20 a 60 minutos, según el número de folículos presentes en los ovarios. De media, se consiguen unos 5-6 óvulos por aspiración (Rodríguez et al., 2021).

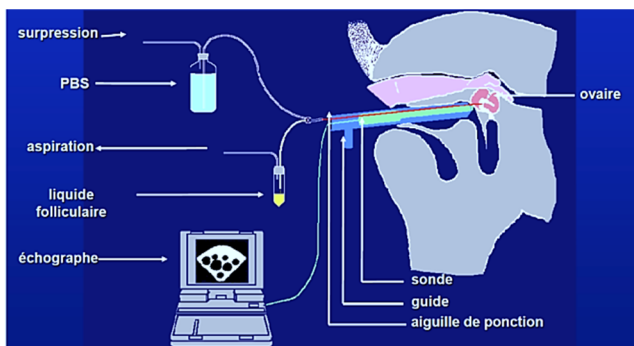


Figura 9: Técnica de OPU.
https://mediatheque.ifce.fr/doc_num.php?explnum_id=22299

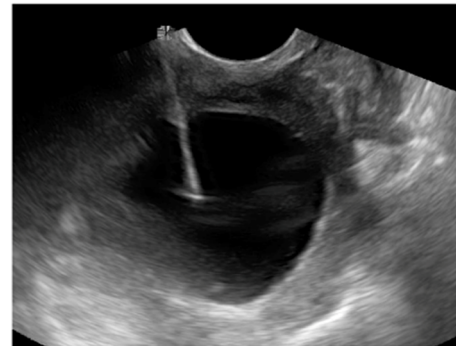


Figura 10: Aguja de aspiración insertada hasta el centro de un folículo dominante, controlado por ecografía transrectal (Ortis y Foss, 2013).

Los folículos ováricos son aspirados con una solución fisiológica para recuperar los ovocitos, los cuales son posteriormente evaluados para proceder a determinar la viabilidad y calidad antes de ser utilizados en los procedimientos de reproducción asistida (**Figura 11**).

Los resultados de la producción *in vitro* de embriones se optimizan mediante protocolos de maduración ovocitaria. Esto incluye el seguimiento de los ovocitos para la progresión meiótica, la formación del huso y los microtúbulos, la detección de anomalías cromosómicas, la maduración nuclear y la expansión de

las células del cúmulo (Farin et al., 2007). Este procedimiento es esencial en casos de subfertilidad, ya que el número de ovocitos disponibles suele ser considerablemente menor que el número de espermatozoides disponibles, en cualquier momento (Orsolini et al., 2021).

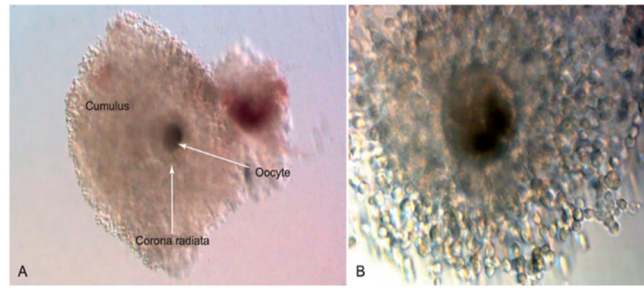


Figura 11: Ovocitos equinos (Brinsko & Blanchard, 2011).
A: Tras la recuperación con aspiración folicular.
B: Después de la maduración *in vitro* (corona radiata y cúmulo expandidos).

Los componentes del medio de lavado utilizado para recolectar ovocitos deben ser elegidos cuidadosamente y además, se deben realizar más investigaciones para confirmar los posibles efectos negativos de algunos conservantes sobre la calidad de los ovocitos (Cuervo-Arango et al., 2019). Recientemente, se ha estudiado el vínculo entre la medición del nivel de Hormona Anti-Mülleriana (AMH) en la sangre en el momento de la OPU y la cantidad de ovocitos y embriones producidos por ICSI. Las yeguas con un alto nivel de AMH producen un mayor número de embriones, aunque las yeguas con un bajo nivel de la hormona siguen capaces de producir embriones. Por lo tanto, una sola medición del nivel de AMH en la sangre no es suficiente para predecir el resultado de OPU-ICSI (Papas et al., 2021).

La OPU es un proceso delicado que requiere experiencia y equipo especializado para garantizar la seguridad y el bienestar tanto de la yegua como de la calidad de los ovocitos recolectados. Al introducir de manera repetida la aguja de aspiración desde la sonda hasta el peritoneo y atravesando la pared vaginal, podría causar peritonitis e infección ovárica (Velez et al., 2012). También, podría conllevar un riesgo de abrasión rectal o punción, pero se observa poco daño macroscópico o histológico en el ovario. Estos hallazgos son fundamentales para explicar la administración profiláctica de antibióticos después de la OPU y para informar a los propietarios sobre las complicaciones poco frecuentes pero posibles relacionadas con el procedimiento

Una vez obtenidos los ovocitos, la **criopreservación de ovocitos** tiene varias ventajas, tales como la conservación del material genético de especies en peligro de extinción, la reserva de ovocitos de yeguas jóvenes que aún no han sido evaluadas, y la creación de bancos de ovocitos para futuras investigaciones sobre TRAs. Hoy en día, existen diversos protocolos para la **vitrificación de ovocitos**. Dos de los principales son: el protocolo de exposición breve con altas concentraciones de crioprotectores, descrito por Tharasanit et al. (2006) y el protocolo de exposición prolongada con bajas concentraciones de crioprotectores, desarrollado originalmente para ovocitos bovinos y humanos por Kuwayama et al. (2005). En 2018, Ortiz-Escribano et al., evidenciaron que no había diferencia entre esos dos protocolos en cuanto a la tasa de desarrollo de los blastocitos obtenidos *in vitro*, la cual era de un 7 %.

La obtención de ovocitos permitió desarrollar otras técnicas como **Gamete Intrafalopian Transfert (GIFT)**. Este procedimiento se realiza mediante laparotomía. Una vez que el peritoneo ha sido puncionado, se exterioriza el ovario y se deposita el ovocito en el oviducto a través del infundíbulo utilizando una pipeta. Se aspira el folículo preovulatorio de la yegua receptora y se extrae el ovocito, ya que el riesgo de producir un embrión de la receptora es del 30% en caso de punción incompleta (Deleuze, 2019). Posteriormente, la yegua receptora se insemina con una gran cantidad de espermatozoides móviles. Se recomienda realizar la inseminación hasta 12 horas antes del trasplante y hasta 2 horas después del mismo. Sin embargo, si la calidad del esperma es baja, se recomienda realizar la inseminación solo 2 horas después del trasplante (Carnevale, 2004). En 1980, nació el primer potro de un trasplante de ovocitos,. Esta TRA permite la obtención de potros a partir de yeguas con trastornos reproductivos como pueden ser defectos de ovulación, infecciones o adherencias uterinas, lesiones cervicales y otras anomalías del tracto genital (Carnevale, 2004). Es una técnica invasiva para la yegua receptora no siendo la técnica de elección en yeguas subfértiles (Roser & Meyers-Brown, 2019).

Transferencia de ovocitos intra-folicular (TOIF): El objetivo del TOIF es transferir los ovocitos de una yegua donante al folículo preovulatorio de una yegua receptora. Después de recolectar los ovocitos mediante OPU en una yegua donante, se realiza una punción en el folículo preovulatorio de la yegua receptora para aspirar unos pocos mililitros de líquido folicular. Posteriormente, los ovocitos se inyectan en el folículo y se mezclan con el líquido folicular aspirado previamente en el dispositivo de transferencia (Deleuze, 2019). Ante la falta de eficacia de los tratamientos de superovulación en las yeguas, la TOIF podría ser una alternativa económica y de fácil implementación, aunque todavía no se comercializa. Esto ayudaría a reducir la necesidad de repetir OPU y TE en yeguas de alto potencial genético (Martinez de Andino et al., 2019).

- **FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV)**

En 1990, nació el primer potro producido mediante FIV, aunque la demanda posterior de producción de embriones *in vitro* en la cría comercial de caballos se quedó muy limitada hasta la última década Hisey et al. (2021). Esto se podría explicar por la dificultad en desarrollar protocolos para la FIV convencional, la cual consiste en la fecundación de ovocitos mediante la coincubación con espermatozoides. Esto a su vez podría ser causado por la incapacidad para estimular adecuadamente los espermatozoides del semental para capacitar y penetrar los ovocitos equinos *ex vivo*, los cuales presentan una pelúcida endurecida (Leemans et al., 2016). Esta capacitación insuficiente se debe en parte a la falta de medios adecuados que se asemejen al ambiente natural del oviducto que apoya y regula de manera efectiva la interacción entre los gametos (Mlodawska, 2014).

Como lo comenta Stout (2020), una serie de obstáculos significativos se presentan para establecer la producción *in vitro* de embrión equino. Entre ellos, la relativa ineficacia de la recolección de ovocitos inmaduros de yeguas donantes vivas, así como el éxito relativamente bajo del cultivo de cigotos obtenidos por ICSI hasta la fase de blastocisto. Esta última fase es crucial porque los embriones en este estado pueden transferirse sin cirugía al útero de una yegua receptora en lugar de al oviducto.

Se ha notado que, aunque la FIV con ovocitos madurados dentro del organismo no presenta buenos resultados, los que han sido madurados en laboratorio y luego transferidos al oviducto de una yegua inseminada muestran tasas de desarrollo embrionario comparables a las observadas en las ovulaciones naturales (Leemans et al., 2016). Esto ha permitido que los ovocitos madurados en laboratorio puedan ser fecundados, explicando el fallo de la fecundación por la carencia en la capacitación de los espermatozoides o en los medios de fecundación. Esto podría deberse a la ausencia de uno o más factores necesarios presentes en el oviducto, los cuales facilitan la penetración de los espermatozoides en la zona pelúcida y la posterior fecundación (McPartlin et al., 2009).

Una variante de la FIV convencional es la **Inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI)**. En la especie equina, la producción *in vitro* de embriones está actualmente restringida a esta técnica ya que la FIV convencional ha demostrado ser ineficaz (Orsolini et al., 2021). Dos pasos son imprescindibles en el proceso (Hinrichs, 2018):

1. Preparación de los espermatozoides: Los espermatozoides se preparan con un proceso de capacitación en el laboratorio. Esto implica la eliminación del plasma seminal y la selección de los espermatozoides móviles y morfológicamente normales.
2. Inyección de espermatozoides: El espermatozoide seleccionado se inyecta directamente en el citoplasma del ovocito utilizando una micropipeta especializada y un micromanipulador bajo un microscopio de alta magnificación (**Figura 12**).

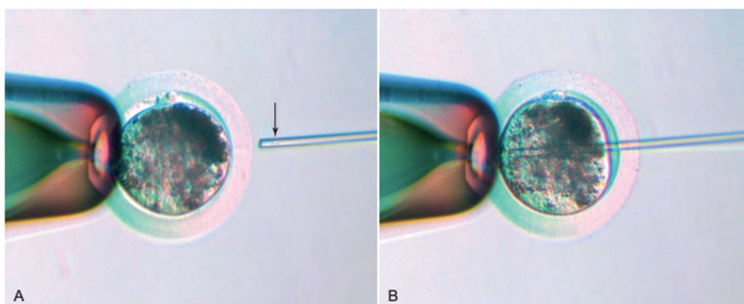


Figura 12: Procedimiento de inyección intracitoplásmica en un ovocito equino (Brinsko & Blanchard, 2011).

A: Ovocito mantenido en su sitio, con inyección de espermatozoide (flecha) adyacente a la zona pelúcida.

B: Zona pelúcida perforada por la pipeta y espermatozoide depositado en el citoplasma del ovocito.

Una de las principales ventajas de la ICSI es que se necesita una baja cantidad de espermatozoides para el procedimiento. En general, solo se requiere seleccionar un único gameto masculino para cada ovocito. Por eso, la ICSI se ha convertido en la técnica principal para producir embriones a partir de sementales

con bajo concentración o viabilidad espermática (Galli et al., 2016). Además, la ICSI permite generar un mayor número de crías a partir de una cantidad reducida de espermatozoides (Morris, 2018).

Generalmente, el semen congelado-descongelado de sementales suele contener un número limitado de espermatozoides viables y una calidad post-descongelación globalmente disminuida. Sin embargo, el semen congelado es ideal para la ICSI porque puede almacenarse y enviarse fácilmente, no requiere tanta proximidad y recolección frecuente de sementales, además, solo se necesita una fracción de eyaculado congelado para ser descongelado y obtener una cantidad suficiente de espermatozoides. Esto permite utilizar una gran variedad de sementales, independientemente de si está vivo o no (Orsolini et al., 2021). Además, se ha demostrado que el empleo de espermatozoides congelados y descongelados para la ICSI produce tasas de fecundación y desarrollo embrionario similares a las del semen fresco (Valenzuela et al., 2017).

Otros estudios han demostrado que el uso de espermatozoides liofilizados conserva la integridad cromosómica y también pueden generar descendencia viable mediante el procedimiento de ICSI, sin embargo, hay poca investigación sobre los posibles efectos de la liofilización en el proceso de fecundación y el desarrollo embrionario posterior, por eso no es una práctica común. Por lo tanto, actualmente, el uso de esperma congelado-descongelado sigue siendo la mejor opción para la ICSI equina (Orsolini et al., 2021).

▪ CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES

En 1981 se registró la primera gestación producida por un embrión equino congelado. En 1982 nació el primer potro procedente de un embrión congelado por un equipo japonés liderado por Yamamoto. En efecto, varios factores contribuyen al retraso en la progresión de esta técnica, como el coste importante, la dificultad para inducir superovulación, la baja tasa de gestación y de transferencia de embriones criopreservados con un diámetro superior a los 300 μm (Stout, 2012), la complejidad de recolectar embriones *in vivo* lo suficientemente temprano para su vitrificación, y las diferentes sensibilidades de los embriones a la criopreservación. Sin embargo, la preservación de embriones ofrece muchos beneficios ya que permite evitar la necesidad de sincronizar yeguas receptoras para la TE. También, facilita el transporte de embriones, su almacenamiento a largo plazo, y la detección temprana de ciertas enfermedades genéticas hereditarias (Hinrichs y Choi, 2012).

Los blastocitos equinos se distinguen por presentar un mayor número de células en comparación con otras especies en el mismo estadio de desarrollo (Squires y McCue, 2016). Esto se debe a la intensa actividad mitótica de los embriones equinos, lo que los puede hacer más sensibles a los efectos adversos

de la criopreservación en el citoesqueleto. También, las células son ricas en gotitas lipídicas, lo que dificulta su resistencia a la congelación (Díaz et al., 2016).

La formación de una cápsula alrededor del embrión durante su implantación en el útero dificulta la penetración del crioprotector (Bruyas et al., 2000). También, esto puede resultar en una protección insuficiente y posibles daños osmóticos. Además, los blastocitos equinos completamente desarrollados de diámetro importante, contienen una gran cantidad de líquido en su blastocele, lo que representa un obstáculo adicional para su congelación (McKinnon y Squires, 1988).

En la actualidad, hay dos técnicas principales de criopreservación de embriones equinos: la vitrificación y la congelación lenta (Dascanio y McCue 2014). La técnica de congelación lenta emplea bajas concentraciones de crioprotectores, lo que implica un proceso prolongado y la necesidad de máquinas programables.

Por otro lado, la vitrificación es una técnica rápida que utiliza materiales sencillos, pero, requiere concentraciones altas de crioprotectores, sobretodo en la etapa final antes de la inmersión en nitrógeno líquido (Hendriks et al., 2014). Las técnicas de deshidratación del embrión, previas a la congelación ultrarrápida, evolucionaron hasta el uso actual de la ruptura de la cápsula embrionaria seguida de la extracción del fluido del blastocele (**Figura 13**).

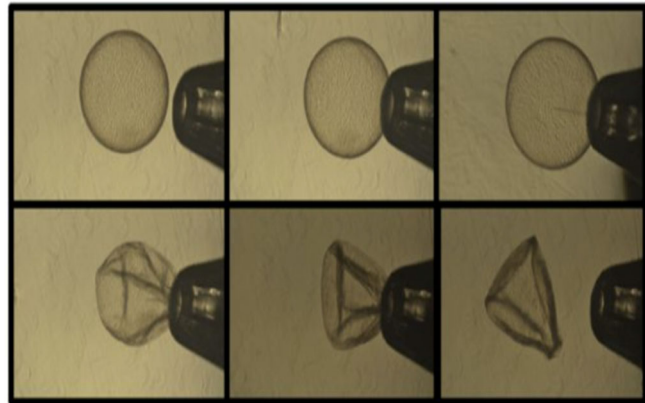


Figura 13: Secuencia de punción y extracción del blastocele de un blastocisto expandido (Choi et al. 2011).

Díaz et al. (2016) pudieron eliminar entre el 95% y el 99% del líquido del blastocele con esta técnica, lo que les permitió alcanzar una tasa de gestación del 83,3%. Varios factores influyen sobre la viabilidad embrionaria como la reducción del líquido del blastocele, el cual disminuye las probabilidades de formación de cristales de hielo y reduce el tiempo de exposición a crioprotectores. También, el uso de un protocolo con glicerol y etilenglicol permite utilizar menores concentraciones de crioprotectores y es beneficioso para el embrión. El uso de un sistema abierto de vitrificación facilita el manejo de volúmenes muy pequeños de solución de vitrificación (<1 ml), aumentando así la rapidez de los procesos de congelación y descongelación (Squires & McCue, 2016). En ambos métodos, la descongelación del embrión se realiza sumergiéndolo en un baño maría a 37 °C durante 20 segundos antes de su transferencia a la yegua receptora

▪ TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (TE)

La transferencia de un embrión de una yegua donante a una yegua receptora es un proceso llevado a cabo generalmente para mejorar la calidad genética de una yeguada, permitir que una yegua donante continúe compitiendo mientras se reproduce o habilitar que una misma yegua tenga varios potros en el mismo año (Hinrichs, 2018).

El proceso comienza con la estimulación de la ovulación en la yegua donante y luego, la recolección del embrión mediante lavado uterino con catéter Foley (**Figura 14**), que se realiza típicamente entre 7 y 8 días después de la ovulación. Una vez recolectado, el embrión se encuentra en el líquido retenido en el filtro, y luego se lava y se transfiere transcervicalmente al útero de una yegua receptora (**Figura 13B**) que ovuló desde un día antes hasta 3 días después de la yegua donante, utilizando un catéter especializado (Hinrichs, 2018). También, existe una técnica quirúrgica, permitiendo transferir el embrión a 3 cm del oviducto, vía laparotomía (Carnevale & Sessions, 2012).

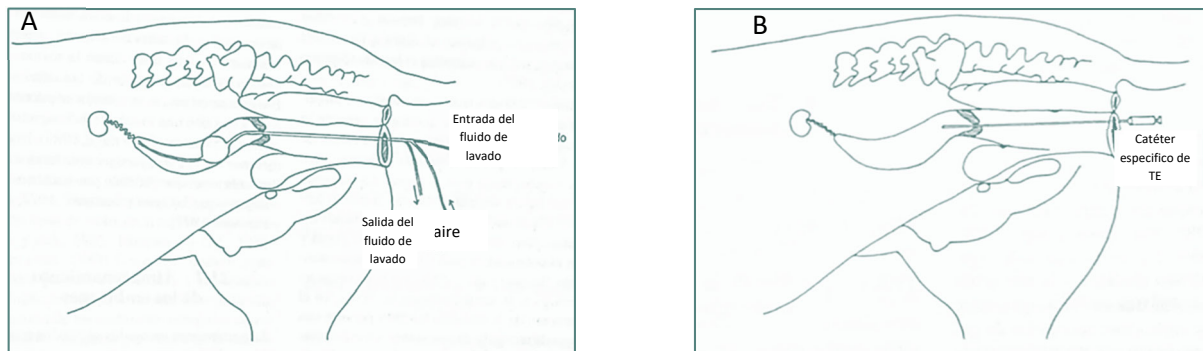


Figura 14: Procedimiento de la transferencia de embriones (Davies Morel, 2005).

A: El catéter Foley en su sitio listo para el lavado y la recogida de embriones

B: Transferencia de embriones no quirúrgica a una yegua receptora

▪ TECNOLOGIAS GENÉTICAS APLICADAS EN REPRODUCCIÓN

Transferencia nuclear (SNCT)

La clonación se define como el proceso mediante el cual se crea una copia exacta, genéticamente idéntica, de otra célula u organismo mediante reproducción asexual. Actualmente está prohibida en ciertas competiciones y Studbook y las empresas más famosas que lo practican son entre otras: Ovoclone en España, ViaGen Equine en Canadá o Clonargen Biotech en Argentina. Este método implica la utilización del material genético (ADN) de un caballo donante para generar un potro genéticamente idéntico (Campbell, 2018).

Según Cortez et al. (2023), la clonación tiene varias ventajas debido a que se puede emplear para preservar razas en peligro de extinción como el caballo de Przewalski, o en otras situaciones consideradas de emergencia como es la peste equina africana. Además, permite la preservación del material genético de animales individuales que no pueden reproducirse, debido a problemas de salud o porque el animal está muerto.

Este proceso implica la extracción del ADN del donante y su inserción en un óvulo de otra yegua, cuyo contenido de ADN ha sido eliminado previamente. Luego, se fusiona el núcleo del donante con los ovocitos receptores enucleados, los cuales se desarrollan formando un embrión. Finalmente, se cultiva el embrión *in vitro* y se transfiere al útero de una yegua receptora. La modificación de las condiciones de cultivo *in vitro* adecuadas para la activación de ovocitos equinos, la maduración de ovocitos y el desarrollo embrionario, es crucial para el éxito del procedimiento *in vitro* de SNCT, con el objetivo de minimizar las pérdidas de embriones (Galli, 2002). Un hito en esta técnica fue lo obtenido por el laboratorio de Cremona (Italia) dirigido por Galli en el 2003, obteniendo el potro Halflinger (**Figura 15**), llamado Prometea (Galli, 2008). Este método permite la reproducción de animales seleccionados y que presenten atributos deseables. Esta técnica, junto con otras como la ICSI, está siendo cada vez más usada en la reproducción equina en laboratorios de todo el mundo, lo que abre nuevas posibilidades en la cría selectiva y la conservación de especies equinas (Hisey et al., 2021). La metodología de SNCT es la siguiente (Wakchaure & Ganguly, 2016):



Figura 15: Clon Prometea
Prometea <https://cordis.europa.eu/article/id/20692-italians-unveil-first-cloned-horse/es>

1.-Recolección y maduración *in vitro* de ovocitos: Los ovocitos pueden obtenerse de ovarios de donantes vivas mediante la técnica de OPU, o de ovarios de yeguas sacrificadas. Una vez realizada la recolección y selección en función de la morfología del cúmulo, se transfieren al medio de maduración y se dejan madurar durante 24 horas. Se ha observado que los ovocitos con un cúmulo expandido tienen una mayor capacidad de maduración en comparación con los ovocitos que presentan un cúmulo compacto (Zhang et al., 1989). Las condiciones de maduración *in vitro* tienen un impacto significativo en el desarrollo de los ovocitos fecundados hasta la fase de blastocisto (Gambini et al., 2012). El medio de cultivo más utilizado para la maduración de los ovocitos de caballos es el TCM 199 suplementado con antibióticos, fluido folicular, LH y FSH (Aranda, Gil, González, 2016).

2.-Preparación de las células donantes: Las células donantes se obtienen mediante biopsia, recolección en el momento del sacrificio o después de la muerte. En el caso del caballo, se han utilizado fibroblastos fetales, fibroblastos adultos y células de la granulosa como fuentes de células donantes

(Lagutina et al., 2007). La variación en la tasa de éxito de la SNCT en caballos puede deberse a la línea celular específica usada para obtener los núcleos donantes. El ciclo celular de la célula donante es importante para el éxito del proceso, y en equinos se han empleado células en estadios G0 o G1 (Hinrichs et al., 2007).

3.-Preparación de los ovocitos enucleados: Tras 22-24 horas de maduración, se realiza la eliminación de las células del cúmulo de los ovocitos. Se aspira ligeramente a través de una micropipeta para aspirar el núcleo y una pequeña cantidad de citoplasma. En algunos casos, el uso de colorantes específicos, como Hoechst 33342, y la exposición a luz ultravioleta (UV) pueden ayudar a visualizar y asegurar la enucleación completa (Mukherjee et al., 2014).

4.-Fusión del núcleo donante con ovocitos receptores enucleados: Esta fusión puede lograrse mediante la aplicación de un breve pulso eléctrico o a través de fusión química para iniciar la fecundación. Esto implicara la formación del embrión (Gambini et al., 2012).

5.-Cultivo de embriones: Aunque el cultivo de cigotos *in vivo* en el oviducto de la yegua demostró un desarrollo un 30% superior (Choi et al., 2004), los embriones producidos *in vitro* se pueden desarrollar utilizando diversos medios como DMEM-F12, CZB28 y SOF modificado (Galli et al., 2008). Estos medios se pueden emplear para el desarrollo preimplantacional de los ovocitos de yegua fecundados (Booth et al., 2001).

6.-Transferencia del embrión al oviducto de la yegua receptora: Se transfiere el embrión, se realiza un seguimiento de la yegua se diagnostica la gestación con revisiones semanales durante el primer trimestre y luego a intervalos mensuales hasta el parto (Carneiro, 2001 y Lagutina et al., 2007). El procedimiento está ilustrado en la **Figura 16**.

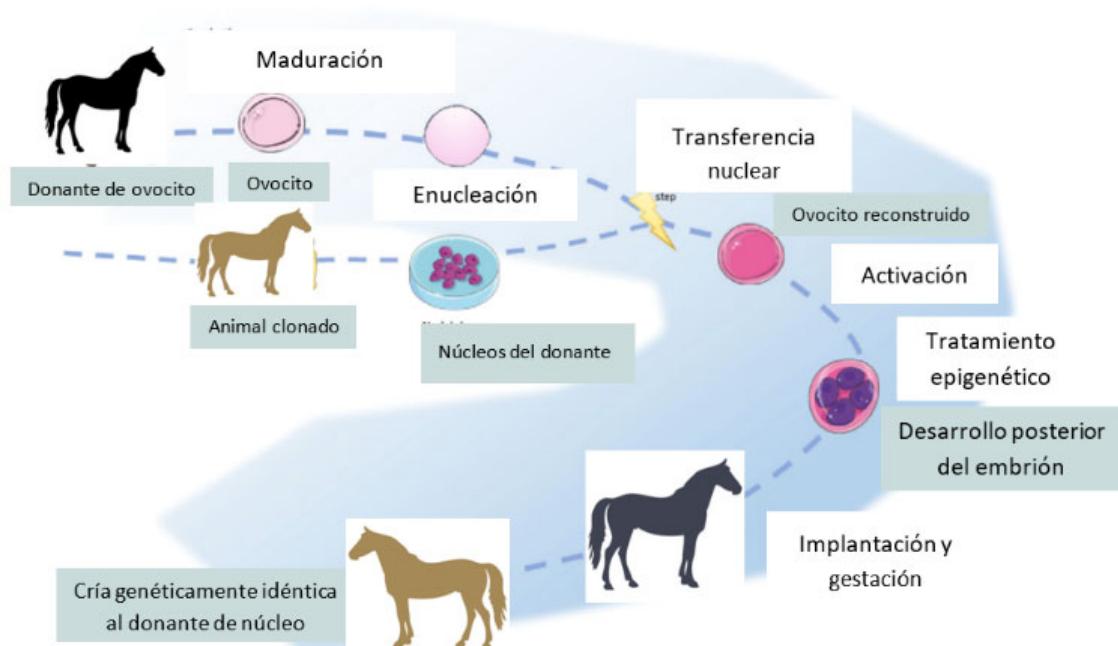


Figura 16: Proceso de clonación (SNCT) en la especie equina (autoría propia)

Transferencia de genes mediada por espermatozoides (SMGT)

La transferencia de genes mediada por espermatozoides o *Sperm-mediated gene transfer* (SMGT) es una técnica que aprovecha los avances en genética molecular y la comprensión del genoma equino. Permite a los criadores identificar y seleccionar genes específicos, asociados a características deseables.

Este método consiste en la introducción de ADN exógeno en unos espermatozoides, los cuales están utilizados para fecundar óvulos luego. Todo esto, permitiendo la transferencia de nuevas secuencias genéticas a la descendencia (Hisey et al., 2021). Uno de los principales beneficios de la SMGT es que puede acelerar el proceso de mejora genética. Esto es una ventaja importante, más rápida y eficiente para obtener rasgos como la resistencia, la velocidad, la resistencia a enfermedades, la calidad del pelaje o la disposición temperamental (Zaniboni et al., 2013). Además, la SMGT también puede ayudar a abordar problemas genéticos específicos en la cría equina, como enfermedades hereditarias o anomalías genéticas.

Edición Génica

La mejora de la salud y el bienestar animal son unos de los principales objetivos de la edición genética en caballos. Se puede utilizar esta tecnología para corregir mutaciones genéticas responsables de enfermedades hereditarias graves, como la hipertermia maligna y la inmunodeficiencia combinada severa. Al eliminar estos genes defectuosos, se puede reducir la incidencia de enfermedades en la población equina y mejorar la calidad de vida de los caballos (Hisey et al., 2021). Además de la salud, la edición genética también puede mejorar el rendimiento y la resistencia (Wilkin et al., 2017).

Desde 2008, se ha explorado la expresión de genes exógenos en embriones equinos pre-implantados mediante la transferencia del gen de fluorescencia (EGFP) utilizando técnicas como la ICSI. En 2013, se realizó la producción de embriones transgénicos mediante la transferencia génica mediada por espermatozoides del mismo gen EGFP. Sin embargo, a pesar de que el 86% de los embriones mostraron la transmisión del transgen, solo el 25% manifestó la expresión efectiva del gen (Zaniboni et al., 2013).

Se han utilizado diversos vectores como plásmidos y adenovirus para introducir genes, lo que ha permitido así complementar las funciones de los genes defectuosos (Ball, Sabeur y Allen, 2008). Se ha investigado la administración de proteína morfogenética ósea 2 (BMP2) y BMP6 en áreas de fractura utilizando vectores adenovirales. Además, se examinó la aplicación de factor de crecimiento de fibroblastos 2 y factor de crecimiento endotelial vascular 164 en casos de tendinitis utilizando vectores plasmídicos, con el propósito de fomentar la recuperación de la lesión (Kovac et al., 2018).

Es importante destacar que esta técnica se centra en la inserción de genes propios de la especie equina. Eso evita la introducción de genes de otras especies en el genoma equino, lo que podría generar organismos genéticamente modificados no deseados (Smith y Spadafora, 2005). Sin embargo, el uso de la edición genética en caballos plantea una serie de desafíos éticos, legales y de seguridad. Siempre se tendrá que garantizar que cualquier modificación genética realizada sea segura para el animal y no cause efectos secundarios indeseables.

CRISPR/Cas9

El método de CRISPR-Cas9 (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas), permite realizar cambios específicos en el genoma equino para llevar a cabo varios objetivos, desde la eliminación de genes asociados con enfermedades hereditarias hasta la introducción de rasgos deseables (Doudna y Charpentier, 2014).

El bajo número de ovocitos equinos disponibles para la investigación es una de las principales limitaciones en el uso de CRISPR/Cas9 en embriones equinos. Esto se explica por el hecho de que estos estudios tienden a requerir grandes cantidades de ovocitos para tener en cuenta las pérdidas previstas después de la fecundación hasta el desarrollo de blastocitos y durante la gestación. A pesar de estas limitaciones, los estudios que utilizan CRISPR/Cas9 en embriones equinos son vitales para el desarrollo de terapias génicas para enfermedades genéticas (Hisey et al., 2021).

En 2017, la empresa argentina Kheiron especializada principalmente en la clonación equina y dirigida por el Dr. Vichera, desarrolló la tecnología CRISPR para agilizar y perfeccionar el proceso de cría y selección de ejemplares equinos. El enfoque se centraba en la edición directa de genes durante las etapas embrionarias. Hasta ahora, se han obtenido embriones con modificaciones en el material genético, especialmente en el gen de la miostatina (Kovac et al., 2018). Esto podría potencialmente mejorar aspectos como la masa muscular, la resistencia y la velocidad en los caballos. El desarrollo de esta técnica podría ayudar a obtener más conocimientos básicos sobre el mecanismo genético de otros trastornos genéticos observados en los caballos (Moro et al., 2020).

Partenogénesis

La partenogénesis es un método en el cual un óvulo se activa, química o eléctricamente, y se desarrolla como un embrión sin ser fecundado. En este proceso, el ovocito comienza a dividirse y desarrollarse, formando un embrión que contiene únicamente material genético de la madre (Balakier y Tarkowski, 1976). Los partenotes producidos son esencialmente clones mitóticos del ovocito original y pueden

desarrollarse hasta cierto punto. Sin embargo, no continúan esta evolución debido a la falta de genética masculina (Hinrichs et al., 1995).

Aunque inicialmente se pensaba que los partenotes equinos activados *in vitro* solo podían desarrollarse hasta el estadio de mórula, estudios posteriores (Carneiro et al., 2001 y Li et al., 2004) han demostrado que pueden alcanzar una tasa de blastocisto similar a la de otras especies. Estos partenotes se utilizan como controles positivos en experimentos de desarrollo embrionario equino, ya que la fecundación *in vitro* estándar, como se ha visto, no es viable en caballos. Los métodos para inducir la partenogénesis en ovocitos equinos incluyen el uso de extractos citosólicos de semen y la aplicación de factores de crecimiento (Choi et al., 2004). Se ha observado que los caballos tienen una alta tasa de partenogénesis, lo que los hace más propensos a este fenómeno después de la activación en comparación con otras especies. Esto sugiere que diferentes tratamientos de activación pueden plantear riesgos variables de inducir partenogénesis en experimentos de fecundación y desarrollo embrionario equino (Li et al., 2000).

Una partenote también puede formarse cuando el espermatozoide no se fusiona correctamente con el núcleo del ovocito. Un método para diferenciar los partenotes de los embriones fecundados es teñirlos con una tinción nuclear de Hoechst (Li et al., 2000). Se descubrió que los pronúcleos materno y paterno presentan tinciones diferentes, según el marcador epigenético de trimetilación de lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3). Sin embargo, esta técnica no se puede utilizar para distinguir partenotes de ovocitos fecundados antes de la TE, debido a los pasos de fijación requeridos para esta técnica (Heras et al., 2015).

- **TECNOLOGIAS DE SEXAJE**

Sexaje de espermatozoides

La selección de espermatozoides en función del cromosoma X o Y es de gran interés en muchas especies (Panarace et al., 2014), y especialmente relevante en la industria equina, ya que los fenotipos pueden ser más adecuados para obtener buenos resultados deportivos o de producción, o para satisfacer las preferencias de los propietarios, dependiendo de su sexo. A nivel mundial, es la empresa Sexing Technologies (Navasota, Texas) la que tiene la patente para el sexaje de espermatozoides. Determinar el sexo puede facilitar la venta de productos con el sexo fetal conocido a un precio más importante debido al fuerte interés de muchas industrias hacia un sexo específico (Orsolini et al., 2021).

Hoy en día, la citometría de flujo es el único método probado para separar los espermatozoides portadores de los cromosomas X e Y. La clasificación por sexo con esta técnica se basa en el uso de la tinción de fluorescencia Hoescht 33342 (Garner et al., 2013). Esta se une preferentemente a regiones

ricas en adenina-timina (AT) a lo largo del surco menor del ADN, lo que permite clasificar los espermatozoides individuales según las diferencias de intensidad de los cromosomas sexuales (Samper et al., 2012). Los espermatozoides son analizados individualmente mientras pasan a través del citómetro de flujo, donde se cargan en gotas según su fluorescencia relativa y se separan (Rath et al., 2013). En el caso de los équidos, estas tecnologías de sexado han sido utilizadas con éxito para producir potros vivos, con una precisión superior al 90 % (Garner et al., 2013).

Sexaje de embriones

Actualmente, se está implementando el sexaje de embriones en programas de TE (Riera et al., 2019). En diversas especies, la determinación del sexo en embriones tempranos se ha llevado a cabo mediante la identificación del antígeno masculino específico H-Y utilizando anticuerpos fluorescentes (Crisan et al., 2015). A pesar de los beneficios de este método, no se ha utilizado todavía a gran escala en los procedimientos de TE en equinos. Esto es debido a que los métodos inmunológicos no son aplicables a embriones equinos que han alcanzado la etapa de mórula tardía o blastocisto temprano, momento en el cual el embrión ingresa al útero (Aurich y Schneider, 2014).

Existen dos técnicas utilizadas para la detección de secuencias genéticas específicas del sexo. Una de ellas es la **Detección de secuencias de DNA específicas del sexo** y para ello se utiliza la técnica de amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). No obstante, para los caballos, resulta complicada la realización de biopsias celulares en embriones, ya que son bastante sensibles a la manipulación. Esto se debe a que su desarrollo en el útero depende de una cápsula acelular intacta. A pesar de este problema, se han registrado casos de TE equinos realizados después de la biopsia (Choi, et al., 2010). Hoy en día, la PCR es una técnica ampliamente utilizada para determinar el sexo de embriones equinos, sobre todo vía la identificación de genes específicos situados en el cromosoma Y, como los genes zinc-finger (ZFX y ZFY) o la región determinante del sexo del cromosoma Y (SRY). Sin embargo, la identificación de genes presentes en una sola copia, como ZFY y SRY, puede ser complicada usando PCR de una sola célula (Crisan et al., 2015). Un estudio dirigido por Choi et al. (2010) permitió determinar con éxito el sexo de embriones equinos mediante PCR del gen SRY específico del sexo masculino.

La otra técnica es la **Detección de secuencias de RNA específicas del sexo**: Las células somáticas femeninas se caracterizan por la presencia de dos cromosomas X, lo que en teoría podría conducir a una mayor actividad de transcripción específica del cromosoma X en comparación con las células masculinas. Sin embargo, para evitar la sobreexpresión génica, una de las copias del cromosoma X se inactiva en las hembras. Este proceso de inactivación del cromosoma X requiere la acción de un ARN específico

conocido como Xist (transcripción específica del cromosoma X inactivado), que recubre el cromosoma X en cada célula femenina y lo inactiva. En un estudio publicado en 2012, se investigó la utilidad del ARN Xist para determinar el sexo de embriones equinos (Beckelmann et al., 2012). Los resultados demostraban una tasa de error del 10% mediante PCR cualitativa y una precisión aún mayor con PCR cuantitativa. El uso de sondas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) para determinar el sexo mediante el ARN Xist podría ser una alternativa con buenos resultados. Esta técnica está ya utilizada en embriones bovinos y podría adaptarse para introducir sondas específicas de los cromosomas X e Y en embriones equinos antes de la transferencia (Aurich & Schneider, 2014). Sin embargo, aún no está claro si esta técnica sería aplicable en embriones equinos debido a la existencia de la cápsula acelular.

Sexaje fetal

La determinación del sexo fetal en equino está cada vez más solicitada en la práctica veterinaria. Esta técnica puede realizarse en tres momentos específicos durante la gestación. Tempranamente (57-70 días), a mitad de la gestación (90-150 días) y al final de la misma (150-210 días) (Mebarki et al., 2019). Durante el período más temprano, el diagnóstico se basa en la identificación del tubérculo genital (precursor del pene masculino o del clítoris femenino) mediante ecografía transrectal en modo B (**Figura 17**). Sin embargo, la presencia de líquido alantoides en abundancia, movimientos fetales y un cordón umbilical excepcionalmente largo pueden complicar la identificación, requiriendo habilidades y experiencia por parte del profesional (Carmo et al., 2008).

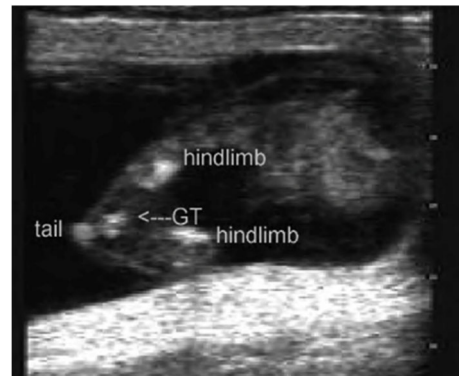


Figura 17: Determinación del sexo fetal mediante ecografía transrectal en modo B (Brinsko & Blanchard, 2011).

Para diagnóstico del sexo fetal a mitad de la gestación, se observan las gónadas fetales y los genitales externos utilizando ecografía en modo B. Un estudio reciente ha permitido determinar que la combinación de ecografía Doppler color con ecografía en modo B mejora la precisión en el diagnóstico del sexo fetal en ambos períodos de gestación, facilitando la visualización de las gónadas fetales, especialmente en machos (Resende et al., 2014). La utilización del Doppler color para evaluar la vascularización de las gónadas es muy importante, sobre todo para los profesionales menos experimentados, en el sexado fetal entre los 120 y 150 días de gestación. Durante este período, la identificación del plexo pampiniforme o la vena testicular en los fetos masculinos (**Figura 18**), así como la visualización del anillo vascular entre la corteza y la médula de los ovarios en los fetos femeninos, se

puede realizar más fácilmente, con un intervalo de tiempo más amplio entre los 90 y 180 días de gestación (Van de Velde et al., 2018). Por otra parte, en los últimos años se ha utilizado la ecografía tridimensional (3D) para la evaluación del feto equino. Esta técnica ha demostrado ser más precisa en la determinación del sexo fetal que la ecografía 2D. Sobre todo, la ecografía 3D en tiempo real se ha utilizado con éxito en el examen por vía rectal de yeguas gestantes, ofreciendo detalles de mayor calidad del tubérculo genital (entre los días 63 y 76) y de los genitales externos (entre los días 90 y 150) (Van de Velde et al., 2018).

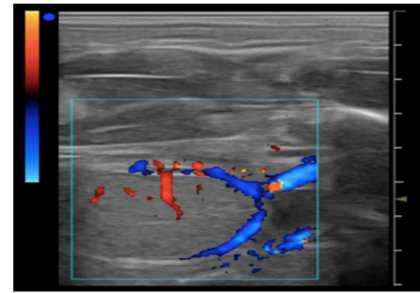


Figura 18: Imagen de ecografía Doppler color en el día 240 de gestación, que muestra el patrón de vascularización característico de la gónada masculina, con el plexo pampiniforme y la vena testicular (Ortega-Ferrusola et al., 2022).

CONCLUSIONES

Realizada la revisión bibliográfica de las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) en la especie equina, las conclusiones a las que llegamos fueron las siguientes

1. Las TRAs en la especie equina proporcionan un conjunto de ventajas como son una mayor eficiencia genética y reproductiva, una reducción del riesgo de enfermedades relacionadas con la reproducción, amplían las posibilidades reproductivas en yeguas de alto rendimiento deportivo, permiten la elección del sexo de la cría, la creación de animales con características específicas y finalmente ofrecen una amplia gama de opciones para la reproducción equina, satisfaciendo las necesidades individuales de cada criador.
2. La aplicación de las TRAs debe hacerse de manera responsable y ética, sin olvidarnos del bienestar animal minimizando el estrés, el dolor y las molestias en los animales durante los procedimientos, garantizando condiciones de vida adecuadas para los caballos utilizados en las TRAs.
3. Las TRAs presentan un futuro prometedor siempre que se perfeccionen las técnicas existentes, haya una mayor reproducibilidad en los distintos laboratorios y una mayor accesibilidad de las mismas a medida que los costos se reduzcan.

CONCLUSIONS

Following a literature review of Assisted Reproductive Technologies (ART) in the equine species, the conclusions we reached were as follows

1. ARTs in the equine species provide a number of advantages such as increased genetic and reproductive efficiency, reduced risk of reproductive related diseases, expanded reproductive

possibilities in high performance sporting mares, choice of sex of offspring, creation of animals with specific traits and finally offer a wide range of options for equine reproduction, satisfying the individual needs of each breeder.

2. The application of ART must be done in a responsible and ethical way, without neglecting animal welfare by minimising stress, pain and discomfort to the animals during the procedures, ensuring adequate living conditions for the horses used in ART.
3. ART has a promising future provided that existing techniques are improved, there is greater reproducibility across laboratories and greater accessibility as costs are reduced.

VALORACION PERSONAL

La reproducción asistida en la especie equina apasionándome desde varios años, la realización de este Trabajo de Fin de Grado me ha permitido abordar numerosas técnicas novedosas y valorar su constante investigación. He podido enfrentarme a varios desafíos, como la recopilación de información científica actualizada o la comprensión de mecanismos tecnológicos específicos. Esto me ha permitido mejorar mis habilidades de investigación y análisis crítico, así como mi capacidad a sintetizar textos y comunicar una información técnica.

Los varios meses en los cuales realice práctica en el Centro de Reproducción de “Haras d’Aubigny” en Francia me han permitido ver como se implementan en la realidad algunas TRAs, como la IA con diferentes técnicas de conservación del semen, la TE o el sexaje fetal. Esto apoyó mi interés en la reproducción asistida y explica en parte el tema elegido. Además, con la elaboración de este trabajo he podido descubrir otras técnicas o formas de realizarlas, lo que seguramente será muy importante para mi futuro trabajo.

Finalmente, la redacción de este trabajo no solo ha permitido ampliar mis conocimientos técnicos y científicos, sino que también ha perfeccionado mi forma de investigar, redactar e informarme con una bibliografía fiable.

BIBLIOGRAFIA

Abril, J. G., Castro, J. L., Porras, J. L., (2007). Evaluación del tratamiento superovulatorio con extracto de hipófisis equina en yeguas criollas. *Rev. Med. Vet* Nº 14: 51-60.

Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., & Medeiros, A. S. L. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science*, 89(1-4 SPEC. ISS.), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.07.001>

Ángel, D., & Bran, J. A. (2010). *Reproducción asistida en equinos: aportes desde la teoría. Assisted reproduction in horses: contributions from theory.*

Aranda Cardona, A. L., Gil Huerta, L., González Ortí, N., (2016). Maduración de ovocitos equinos por encapsulación. Facultad de veterinaria. Universidad de Zaragoza.

Assumpção, T.I., Lançoni, R., Foschini, M., Vieira, C. S., (2023). Equine Spermatozoa Selection by Magnetic Activation for Use in Assisted Reproduction. *J Equine Vet Sci. Apr*;123:104245. doi: 10.1016/j.jevs.2023.104245. Epub 2023 Feb 10. PMID: 36773851.

Aurich, C., & Schneider, J. (2014). Sex determination in horses—Current status and future perspectives. *Animal Reproduction Science*, 146(1–2), 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.01.014>

Balakier, H., Tarkowski, A. K., (1976). Diploid parthenogenetic mouse embryos produced by heat-shock and Cytochalasin B. *J Embryol Exp Morphol*; 35(1):25–39.

Ball, B. A., Sabeur, K., Allen, W. R., (2008). Liposome-mediated uptake of exogenous DNA by equine spermatozoa and applications in sperm-mediated gene transfer. *Equine Vet J* 2008;40(1):76–82.

Beckelmann, J., Budik, S., Bartel, C., & Aurich, C. (2012). Evaluation of Xist expression in preattachment equine embryos. *Theriogenology*, 78(7), 1429–1436. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.026>

Boeta, M., Díaz Durán, M., Hayen Valles, S., (2017). Manual de la práctica de profundización en reproducción equina. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia de México.

Bollweinb, H., Handler, J., Neuhauser, S., y Siubad, M. (2019). Comparación de los efectos de cinco diluyentes de semen en la calidad del esperma epididimario equino congelado-descongelado.

Booth, P. J., Tan, S. J., Reipurth, R., Holm, P., Callesen, H, (2001). Simplification of bovine somatic cell nuclear transfer by application of a zona-free manipulation technique. *Cloning Stem Cells* 3: 139–150.

Bosteels, J., Kasius, J., Weyers, S., Broekmans, F. J., Mol, B. W. J., & D’Hooghe, T. M. (2015). Hysteroscopy for treating subfertility associated with suspected major uterine cavity abnormalities. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009461.pub3>

Brinsko, S. P., & Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C.C., Hinrichs, K., Hartman, D., (2011). *Manual of equine reproduction*. Mosby/Elsevier.

Brogna, R., Fan, J., Sieme, H., Wolkers, W. F., & Oldenhof, H. (2021). Drying and temperature induced conformational changes of nucleic acids and stallion sperm chromatin in trehalose preservation formulations. *Scientific Reports*, *11*(1), 14076. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93569-y>

Bruyas, J. F., Sanson, J. P., Battut, I., Fi'eni, F., Tainturier, D., (2000). Effect of sucrose in diluting glycerol or ethylene glycol after thawing of frozen day 6.25 horse embryos. *J Reprod Fertil Suppl*.

Campbell, M. L. H. (2018). Is cloning horses ethical? In *Equine Veterinary Education* (Vol. 30, Issue 5, pp. 268–273). Equine Veterinary Journal Ltd. <https://doi.org/10.1111/eve.12566>

Carmo, M.T., Oliveira, J.V., Almeida, M.T., Alvarenga, M.A. (2008) Avaliaçãoultra-sonográfica da gônada fetal emequinos: Uma nova alternativa para sex-agem. In: IX Conferência Anual da ABRAVEQ IX Conferência Anual da ABRAVEQ e IV Congress Internacional de Medicina Veterinária, São Paulo.

Carneiro, G., Lorenzo, P., Pimentel, C., Pegoraro, L., Bertolini, M., Ball ,B., (2001). Influence of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on in vitro maturation and parthenogenic development in equine oocytes. *Biol Reprod*; *65*(3):899–905.

Carnevale, E. M. (2004). Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in the mare. *Animal Reproduction Science*, *82–83*, 617–624. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.002>

Carnevale, E. M., & Sessions, D. R. (2012). In Vitro Production of Equine Embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, *32*(7), 367–371. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.05.054>

Celis, A., Henao, A., Montoya, J., Restrepo, G., y Usuga, A. (2014). Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano.

Chávez, E., Gutiérrez, D., Lechuga, A., Avila, F., Cadena, S., Hernández, A., (2020). Acetato de deslorelina y gonadotropina coriónica humana y su respuesta ovulatoria en yeguas postparto. *Abanico veterinario* ISSN 2448-6132. doi: 10.21929/abavet2020.17.

Chen, J., Cheng, Y., Fu, W., Peng, X., Sun, X., Chen, H., Chen, X., & Yu, M. (2021). PPOS Protocol Effectively Improves the IVF Outcome Without Increasing the Recurrence Rate in Early Endometrioid Endometrial Cancer and Atypical Endometrial Hyperplasia Patients After Fertility Preserving Treatment. *Frontiers in Medicine*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.581927>

Choi, Y. H., Love, L. B., Westhusin, M. E., Hinrichs, K., (2004). Activation of equine nuclear transfer oocytes: methods and timing of treatment in relation to nuclear remodelling. *Biol Reprod* *70*: 46–53.

Choi, Y. H., Gustafson-Seabury, A., Velez, I. C., Hartman, D. L., Bliss, S., Riera, F. L., Roldán, J. E., Chowdhary, B., & Hinrichs, K. (2010). Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *REPRODUCTION*, *140*(6), 893–902. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0141>

Choi, Y. H., Hartman, D. L., Bliss, S. B., Hayden, S. S., Blanchard, T. L., & Hinrichs, K. (2010). 89 high pregnancy rates after transfer of large equine blastocysts collapsed via micromanipulation before vitrification. *Reproduction, Fertility and Development*, *22*(1), 203. <https://doi.org/10.1071/RDv22n1Ab89>

Choi, Y. H., Varner, D. D., Love, C.C., Hartman, D. L., Hinrichs, K., (2011). Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. *Reproduction*. 142(4):529-38. doi: 10.1530/REP-11-0145.

Cortez, J. V., Hardwicke, K., Cuervo-Arango, J., & Grupen, C. G. (2023). Cloning horses by somatic cell nuclear transfer: Effects of oocyte source on development to foaling. *Theriogenology*, 203, 99–108. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2023.03.018>

Crisan, M. I., Damian, A., Morar, I., Páll, E., Pestean, C, Groza, S., (2015). Equine embryo sexing and ultrasonographic foetal sexing - interests and applicability. *Anat Histol Embryol* 45, 329-337.

Cuervo-Arango, J., Claes, A. N., Beitsma, M., & Stout, T. A. E. (2019). The Effect of Different Flushing Media Used to Aspirate Follicles on the Outcome of a Commercial Ovum Pickup–ICSI Program in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 75, 74–77. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.01.015>

Dascanio, J., McCue, P. (2014). *Equine Reproductive Procedures* (1a edición).

Davies, Morel, M. C. G., (2005) *Fisiología de la reproducción de los équidos, cría y manejo de la yeguada* Editorial ACRIBIA, S.A.

Deleuze, S., (2019). Les techniques de reproduction artificielle. Le nouveau praticien vétérinaire équine. Vol. 12, pp. 212-219.

Diaz, F., Bondioli, K., Paccamonti, D., Gentry, T., (2016). Cryopreservation of Day 8 equine embryos after blastocyst micromanipulation and vitrification. *Theriogenology*. Mar 15;85(5):894-903. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.10.039.

Doudna, J. A., Charpentier, E, (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*; 346(6213):1258096.

Farin, C. E., Rodriguez, K. F., Alexander, J. E., Hockney, J. E., Herrick, J. R., Kennedy, S., (2007). The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation in vitro. *Anim Reprod Sci*. Mar;98(1-2):97-112. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.10.007.

Galli, C., Crotti, G., Turini, P., Duchi, R., Mari, G., Zavaglia, G., Duchamp, G., Daels, P., Lazzari, G., (2002). Frozen-thawed embryos produced by ovum pick up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. *Theriogenology* 58: 705–708.

Galli, C., Lagutina, I., Duchi, R., Colleoni, S., Lazzari, G., (2008). Somatic cell nuclear transfer in horses. *Reproduction in Domestic Animals*, Spl. Issue: 16th International Congress on Animal Reproduction 43. S2: 331-337. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2008. 01181.x

Galli, C., Colleoni, S., Claes, A., Beitsma, M., Deelen, C., Necchi, D., Duchi, R., Lazzari, G., 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, 82.

Gambini, A., Jarazo, J., Olivera, R., Salamone, D. (2012) Equine cloning: In vitro and in vivo development of aggregate embryos. *Biology of Reproduction* 87.1 doi: 10.1095/biolreprod.112.098855

Garner, D. L., Evans, K. M., & Seidel, G. E. (2013). *Sex-Sorting Sperm Using Flow Cytometry/Cell Sorting* (pp. 279–295). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0_26

Gastal, G. D., Scarlet, D., Ertl, R., Aurich, C., (2018). Influence of Short-Term Storage on Gene Expression of Equine Embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(1), 182-182.

Ginther, O. J., (2023). Contributions to Mare Reproduction Research by the Ginther Team. *J Equine Vet Sci*. Jul; 126:104295. doi: 10.1016/j.jevs.2023.104295

Hendriks, W., Roelen, B., Colenbrader, B., Stout, T. (2014). Cellular damage suffered by equine embryos after exposure to cryoprotectants by slow-freezing or vitrification. *Equine veterinary journal*, 47(6):701-707. <https://doi.org/10.1111/evj.12341>

Heras, S., Smits, K., Leemans, B., & Van Soom, A. (2015). Asymmetric histone 3 methylation pattern between paternal and maternal pronuclei in equine zygotes. *Analytical Biochemistry*, 471, 67–69. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.11.005>

Hernández, M., (1995). Patria y tradición. México. 16: 27.

Hidalgo, M., Ortiz, I., Dorado, J., Morrell, J. M., Gosálvez, J., Consuegra, C., Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., Crespo, F., (2017). Stallion sperm selection prior to freezing using a modified colloid swim-up procedure without centrifugation. *Anim Reprod Sci*. Oct; 185:83-88. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.08.005.

Hidalgo, M., Díaz, M. A., Consuegra, C., Dorado, J. M., (2020). Inseminación artificial y preparación de dosis seminales. *Equinus: Medicina y cirugía equina* ISSN 1578-861X, Nº. 57, 23-33.

Hinrichs, K., Schmidt, A. L., Selgrath, J. P., (1995). Activation of Horse Oocytes. *Biol Reprod Monograph Ser*; 1:319–24.

Hinrichs, K., Choi, Y. H., Varner, D. D., Hartman, D. L., (2007). Production of cloned horse foals using roscovitine treated donor cells and activation with sperm extract and/or ionomycin. *Reproduction* 134: 319–325.

Hinrichs, K. (2018). Assisted reproductive techniques in mares. *Reproduction in Domestic Animals*, 53, 4–13. <https://doi.org/10.1111/rda.13259>

Hinrichs, K., & Choi, Y.-H. (2012). Equine Embryo Biopsy, Genetic Testing, and Cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(7), 390–396. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.05.005>

Hinrichs, K., (2012). Assisted reproduction techniques in the horse. *Reprod Fertil Dev*. 2012;25(1):80-93. doi: 10.1071/RD12263.

Hisey, E. A., Ross, P. J., & Meyers, S. (2021a). Genetic Manipulation of the Equine Oocyte and Embryo. In *Journal of Equine Veterinary Science* (Vol. 99). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103394>

Hisey, E. A., Ross, P. J., & Meyers, S. (2021b). Genetic Manipulation of the Equine Oocyte and Embryo. *Journal of Equine Veterinary Science*, 99. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103394>

Imposti, C. G., Ambrosius, B., Mascioli, M. C., (2018). Inseminacion Artificial con Semen Congelado en Profundidad con la Utilizacion de una Pajuela en Yeguas. Facultad de Ciencias Veterinarias UNCPBA.

Kovac, M., Litvin, Y. A., Aliev, R. O., Zakirova, E. Y., Rutland, C. S., Kiyasov, A. P., & Rizvanov, A. A. (2018). Gene Therapy Using Plasmid DNA Encoding VEGF164 and FGF2 Genes: A Novel Treatment of Naturally Occurring Tendinitis and Desmitis in Horses. *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00978>

Kowalczyk, A., Czerniawska-Piątkowska, E., & Kuczaj, M. (2019). Factors Influencing the Popularity of Artificial Insemination of Mares in Europe. *Animals*, 9(7), 460. <https://doi.org/10.3390/ani9070460>

Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O., & Leibo, S. P. (2005). Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*, 11(3), 300–308. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60837-1](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60837-1)

Lagutina, I., Lazzari, G., Duchi, R., Turini, P., Tessaro, I., Brunetti, D., Colleoni, S., Crotti, G., Galli, C., (2007). Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zonafree method in cattle, horse, pig and sheep. *Theriogenology* 67: 90–98.

Lazzari, G., Colleoni, S., Crotti, G., Turini, P., Fiorini, G., Barandalla, M., Landriscina, L., Dolci, G., Benedetti, M., Duchi, R., Galli, C., (2020). Laboratory Production of Equine Embryos. *J Equine Vet Sci*. Jun; 89:103097. doi: 10.1016/j.jevs.2020.103097.

Leemans, B., Gadella, B. M., Stout, T. A. E., De Schauwer, C., Nelis, H., Hoogewijs, M., & Van Soom, A. (2016). Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization. In *Reproduction* (Vol. 152, Issue 6, pp. R233–R245). BioScientifica Ltd. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0420>

Li, X. (2000). Effects of different activation treatments on fertilization of horse oocytes by intracytoplasmic sperm injection. *J Reprod Fertil*, 119(2), 253–260. <https://doi.org/10.1530/reprod/119.2.253>

Li, X., Morris, L. H., Allen, W.R., (2000). Effects of different activation treatments on fertilization of horse oocytes by intracytoplasmic sperm injection. *J Reprod Fertil*; 119(2):253–60.

Li, X., Dai, Y., Allen, W. R., (2004). Influence of insulin-like growth Factor-I on cytoplasmic maturation of horse oocytes in vitro and organization of the first cell cycle following nuclear transfer and parthenogenesis. *Biol Reprod*; 71(4):1391–6.

Malin, K., Witkowska-Piłaszewicz, O., & Papis, K. (2022). The many problems of somatic cell nuclear transfer in reproductive cloning of mammals. In *Theriogenology* (Vol. 189, pp. 246–254). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.06.030>

Martinez de Andino, E., Brom-de-Luna, J., Canesin, H., Rader, K., Resende, H., Ripley, A., Love, C., & Hinrichs, K. (2019). Intrafollicular oocyte transfer in the horse: effect of autologous vs. allogeneic transfer and time of administration of ovulatory stimulus before transfer. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(6), 1237–1250. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01460-7>

McKinnon, A.O., Squires, E. L., (1988). Equine Embryo Transfer. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, Vol 4, Is 2. Pages 305-333, ISSN 0749-0739, doi: /10.1016/S0749-0739(17)30643-0.

Mebarki, M., Kaidi, R., Azizi, A., & Basbaci, M. (2019). Comparative efficacy of two-dimensional mode and color Doppler sonography in predicting gender of the equine fetus. *Veterinary World*, 12(2), 325–330. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.325-330>

Mlodawska, W., (2014). In vitro maturation and fertilization capacity of mare oocytes. *Medycyna weterynaryjna*. 70. 11-14.

Moro, L. N., Viale, D. L., Bastón, J. I., Arnold, V., Suvá, M., Wiedenmann, E., Olguin, M., Miriuka, S., & Vichera, G. (2020). Generation of myostatin edited horse embryos using CRISPR/Cas9 technology and somatic cell nuclear transfer. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72040-4>

Morris, L. H. A. (2004). Low dose insemination in the mare: an update. *Animal Reproduction Science*, 82–83, 625–632. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.016>

Morris, L. H. A. (2018). The development of in vitro embryo production in the horse. In *Equine Veterinary Journal* (Vol. 50, Issue 6, pp. 712–720). Equine Veterinary Journal Ltd. <https://doi.org/10.1111/evj.12839>

Mukherjee, A., Malik, H., Saha, A. P., Dubey, A., Singhal, D. K., Boateng, S., Saugandhika, S., Kumar, S., Guha, S. K., Malakar, D., (2014). Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. *J Assist Reprod Genet* 31.2: 229-239.

Oldenhof, H., Wolkers, W.F., Sieme, H. (2021). Cryopreservation of Semen from Domestic Livestock: Bovine, Equine, and Porcine Sperm. *Methods Mol Biol* 2180:365-377. doi: 10.1007/978-1-0716-0783-1_15.

Orsolini, M. F., Meyers, S. A., & Dini, P. (2021). An Update on Semen Physiology, Technologies, and Selection Techniques for the Advancement of In Vitro Equine Embryo Production: Section II. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/ani11113319>

Ortis, H.A. Foss, R.S. (2013). How to Collect Equine Oocytes by Transvaginal Ultrasound-Guided Follicular Aspiration.

Ortiz-Escribano, N., Bogado Pascottini, O., Woelders, H., Vandenberghe, L., De Schauwer, C., Govaere, J., Van den Abbeel, E., Vullers, T., Ververs, C., Roels, K., Van De Velde, M., Van Soom, A., & Smits, K. (2018). An improved vitrification protocol for equine immature oocytes, resulting in a first live foal. *Equine Veterinary Journal*, 50(3), 391–397. <https://doi.org/10.1111/evj.12747>

Panarace, M., Pellegrini, R. O., Basualdo, M. O., Belé, M., Ursino, D. A., Cisterna, R., Desimone, G., Rodríguez, E., & Medina, M. J. (2014). First field results on the use of stallion sex-sorted semen in a large-scale embryo transfer program. *Theriogenology*, 81(4), 520–525. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2013.10.021>

Papas, M., Govaere, J., Peere, S., Gerits, I., Van de Velde, M., Angel-Velez, D., De Coster, T., Van Soom, A., & Smits, K. (2021). Anti-müllerian hormone and opu-icsi outcome in the mare. *Animals*, *11*(7). <https://doi.org/10.3390/ani11072004>

Ramires Neto, C., Monteiro, G. A., Soares, R. F., Pedrazzi, C., Dell'aqua, J. A., Papa, F. O., Castro-Chaves, M. M., & Alvarenga, M. A. (2013). New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. *Theriogenology*, *79*(7), 1120-1123.e1. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2013.01.014>

Ramírez, G., Gutiérrez, C., Ramos, M., (2010). Dinámica folicular en yeguas paso fino colombiano medido por ultrasonografía en la Sabana de Bogotá. *Rev. Med. Vet.* ISSN 2389-8526.

Rath, D., Barcikowski, S., de Graaf, S., Garrels, W., Grossfeld, R., Klein, S., Knabe, W., Knorr, C., Kues, W., Meyer, H., (2013). Sex selection of sperm in farm animals: Status report and developmental prospects. *Reproduction*, *145*, R15–R30.

Resende, H. L., Carmo, M. T., Ramires Neto, C., & Alvarenga, M. A. (2014). Determination of equine fetal sex by Doppler ultrasonography of the gonads. *Equine Veterinary Journal*, *46*(6), 756–758. <https://doi.org/10.1111/evj.12213>

Restrepo, G., Varela, E., Duque, J. E., Gómez, J. E., & Rojas, M. (2019). Freezing, Vitrification, and Freeze-Drying of Equine Spermatozoa: Impact on Mitochondrial Membrane Potential, Lipid Peroxidation, and DNA Integrity. *Journal of Equine Veterinary Science*, *72*, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.10.006>

Riera, F. L., Roldán, J. E., Espinosa, J. M., Fernandez, J. E., Ortiz, I., & Hinrichs, K. (2019). Application of embryo biopsy and sex determination via polymerase chain reaction in a commercial equine embryo transfer program in Argentina. *Reproduction, Fertility and Development*, *31*(12), 1917. <https://doi.org/10.1071/RD19228>

Rodriguez, J., Maserati, M., Robilotta, T., Augusto, G., Alonso, M.A., Redoan, M., Tibary, A., Fleury, P., (2021). Recovery of Equine Oocytes in Ambulatory Practice and Potential Complications. *J Equine Vet Sci.* doi: 10.1016/j.jevs.2020.103324

Roser, J. F., & Meyers-Brown, G. (2019). Enhancing Fertility in Mares: Recombinant Equine Gonadotropins. *Journal of Equine Veterinary Science*, *76*, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.03.004>

Samper, J. (2009). Artificial Insemination with Frozen Semen, pp 175-183. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, Editorial Saunders Elsevier, Filadelfia, Estados Unidos.

Samper, J. C., Morris, L., Plough, T. A., (2012). The use of sex-sorted stallion semen in embryo transfer programs. *J. Equine. Vet. Sci.* *32*, 387–389.

Senger, P., (2005). *Pathways to Pregnancy and Parturition*, 2nd ed. Current Concepts, Ames, IA.

Šichtař, J., Bubeníčková, F., Sirohi, J., & Šimoník, O. (2019). How to Increase Post-Thaw Semen Quality in Poor Freezing Stallions: Preliminary Results of the Promising Role of Seminal Plasma Added after Thawing. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, *9*(7). <https://doi.org/10.3390/ani9070414>

Sieme, H., Martinsson, G., Rauterberg, H., Walter, K., Aurich, C., Petzoldt, R., & Klug, E. (2003). Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(2), 134–140. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00416.x>

Smith, K., Spadafora, C., (2005). Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. *Bioessays*; 27(5):551–62.

Squires, E. L., & McCue, P. M. (2016). Cryopreservation of Equine Embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, 41, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.03.009>

Squires, E., L., (2019). Perspectives on the development and incorporation of assisted reproduction in the equine industry. *Reproduction, Fertility and Development* 31(12) 1753-1757 <https://doi.org/10.1071/RD19365>

Stout, T. (2012). Cryopreservation of Equine Embryos: Current State-of-the-Art. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(s3), 84–89. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02030.x>

Stout, T. A. E. (2020). Clinical Application of in Vitro Embryo Production in the Horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, 89. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103011>

Stout, T., Crabtree, J. R., Cuervo-Arango, J., (2024). Advances in equine reproduction. *Equine Vet*; 56(4):644-649. doi: 10.1111/evj.14102.

Tharasanit, T., Colleoni, S., Lazzari, G., Colenbrander, B., Galli, C., & Stout, T. A. E. (2006). Effect of cumulus morphology and maturation stage on the cryopreservability of equine oocytes. *Reproduction*, 132(5), 759–769. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01156>

Valenzuela, O. A., Couturier-Tarrade, A., Choi, Y. H., Aubriere, M. C., Ritthaler, J., Chavatte-Palmer, P., & Hinrichs, K. (2017). 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, 371– 379.

Van de Velde, M., Roels, K., Ververs, C., Gerits, I., & Govaere, J. (2018). Equine foetal gender determination in mid- to late gestational mares: A practical inquiry. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(5), 1027–1032. <https://doi.org/10.1111/rda.13211>

Velez, I. C., Arnold, C., Jacobson, C. C., Norris, J. D., Choi, Y. H., Edwards, J. F., Hayden, S. S., & Hinrichs, K. (2012). Effects of repeated transvaginal aspiration of immature follicles on mare health and ovarian status. *Equine Veterinary Journal*, 44(SUPPL. 43), 78–83. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00606.x>

Wakchaure, R., & Ganguly*, S. (2016). Advances in equine cloning by somatic cell nuclear transfer (SCNT) technique in horses: a review. *International Journal of Bioassays*, 5(12), 5124. <https://doi.org/10.21746/ijbio.2016.12.002>

Wilkin, T., Baoutina, A., & Hamilton, N. (2017). Equine performance genes and the future of doping in horseracing. In *Drug Testing and Analysis* (Vol. 9, Issue 9, pp. 1456–1471). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/dta.2198>

Zaniboni, A., Merlo, B., Zannoni, A., Bernardini, C., Lavitrano, M., Forni, M., Mari, G., & Bacci, M. L. (2013). Expression of fluorescent reporter protein in equine embryos produced through intracytoplasmic sperm injection mediated gene transfer (ICSI-MGT). *Animal Reproduction Science*, *137*(1–2), 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.12.010>

Zhang, J. J., Boyle, M. S., Allen, W. R., Galli, C., (1989). Recent studies on in vivo fertilization of invitro matured horse oocytes. *Equine Vet J* *8*:101-104.

Zuidema, D., Kerns, K., Sutovsky, P., (2021). An Exploration of Current and Perspective Semen Analysis and Sperm Selection for Livestock Artificial Insemination. *Animals (Basel)*. Dec 15;11(12):3563. doi: 10.3390/ani11123563.