

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**“ACTUALIZACIÓN EN TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN
EQUINOS”**

“por”

María Mercedes ECHEVARRÍA IRABUENA

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD: Revisión monográfica

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2022**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa:



Dra. María José Estradé

Segundo Miembro (Tutor):



Dr. Nicolás Cazales

Tercer miembro:



Dra. Yael Filipiak

Fecha: 27 de diciembre de 2022



Autor:

Br. María Mercedes Echevarría

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Facultad de Veterinaria por permitirme formarme como profesional.

A mi tutor Dr. Nicolás Cazales por compartirme sus conocimientos y guiarme en este trabajo con mucha disposición y entusiasmo.

A mi familia y amigos por apoyarme siempre en toda la carrera.

TABLA DE CONTENIDOS

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	7
SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. OBJETIVOS	10
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
3. 1 Técnicas que utilizan gametos	11
3. 1. 1 Inseminación Artificial (IA).....	11
3. 1. 1. 1 Evolución y aplicabilidad.....	11
3. 1. 1. 2 Concentración, selección y sexado de semen.....	13
3. 1. 1. 3 Inseminación con semen fresco	15
3. 1. 1. 4 Inseminación con semen refrigerado.....	15
3. 3. 3. 5 Inseminación con semen congelado.....	19
3. 1. 1. 6 Inseminación profunda con dosis baja de espermatozoides.....	23
3. 1. 2 Aspiración folicular “Ovum Pick-Up” (OPU).....	24
3. 1. 2. 1 Evolución y aplicabilidad.....	25
3. 1. 2. 2 Actualidad	27
3. 1. 3 Maduración Ovocitaria (MO)	28
3. 1. 3. 1 Aplicabilidad.....	28
3. 1. 3. 2 Medios de maduración de ovocitos.....	29
3. 1. 3. 3 Criopreservación de ovocitos.....	30
3. 3. 3. 5 Actualidad de la MO.....	30
3. 1. 4 Transferencia Ovocitaria y Transferencia Intrafalopiana de Gametos	31
3. 1. 5 Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI).	32
3. 1. 5. 1 Evolución y aplicabilidad.....	32
3. 1. 5. 2 Actualidad	33
3. 2 Técnicas que utilizan embriones	35
3. 2. 1 Transferencia de Embriones (TE)	35
3. 1. 1. 1 Evolución y aplicabilidad.....	35
3. 2. 1. 2 Actualidad	38

3. 2. 2 Refrigeración y congelación de embriones	41
3. 2. 2. 1 Evolución y aplicabilidad	41
3. 2. 2. 2 Actualidad	43
3. 3. 3 Exámenes preimplantacionales en embriones.....	43
3. 2. 4 Edición Génica (EG) en embriones.....	45
3. 2. 4. 1 Evolución y aplicabilidad	45
3. 2. 4. 2 Actualidad	46
3. 3 Producción de individuos genéticamente idénticos	47
3. 3. 1 Clonación por Transferencia Nuclear de Células Somáticas (TNCS)	47
3. 3. 1. 1 Evolución y aplicabilidad	47
3. 3. 1. 2 Actualidad	49
4. CONCLUSIÓN.....	51
5. BIBLIOGRAFÍA.....	52

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Presencia y concentración de los metabolitos encontrados en el líquido folicular y en los medios TCM-199 y DMEM/F-12 (Hernández et al., 2020).	29
Figura 1. Curvas de refrigeración de BotuFlex con uno (foto izquierda) y dos hielos (foto derecha) (Botupharma, 2022).	19
Figura 2. Protocolo de inseminación artificial a tiempo fijo con semen congelado e inducción de la ovulación con Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) (McKinnon et al., 2011).	21
Figura 3. Estructura de la inseminación artificial en yeguas deportivas en Europa, incluyendo la división por tipo de semen (refrigerado o congelado) en base a reportes de centros de inseminación artificial Europeos (Kowalczyk et al., 2019).	22
Figura 4. Estructura de la inseminación artificial en yeguas madres en Europa, incluyendo la división por tipo de semen (refrigerado o congelado) en base a reportes de centros de inseminación artificial Europeos (Kowalczyk et al., 2019).	23
Figura 5. Componentes del sistema OPU: A) equipo de ultrasonido; B) bomba de aspiración; C) líneas de aspiración; D) pedal; E) guía de aguja del transductor (Sansisena, 2020).	26
Figura 6. Aguja de aspiración insertada en la guía del transductor (Sansisena, 2020).	26
Figura 7. Número de procedimientos OPU-ICSI realizados en Avantea y en clínicas externas; número de embriones obtenidos en los últimos diez años que muestran un aumento progresivo de la aplicación de esta técnica sobre todo desde 2017 a 2019 (Lazzari et al., 2020).	34
Figura 8. TE con método de Wilsher, donde se ve un ayudante sosteniendo el espéculo y la pinza de Wilsher mientras el operador introduce la pistola de transferencia (Cuervo Arango et al., 2018).	36
Figura 9. Ovario de yegua seccionado, donde se puede ver la ubicación del folículo preovulatorio adyacente a la fosa de ovulación por donde ovulará (Allen y Wilsher, 2020).	37
Figura 10. Evolución de los productos raza Polo Argentino en el Abierto de Polo Argentino desde 1993 hasta 2020; aumento de caballos nacidos por servicio natural (S/N) y por Transferencia Embrionaria (T/E) (Ballester, 2021).	39
Figura 11. Colapso artificial de un blastocisto expandido (Sansisena, 2020).	43

RESUMEN

La industria equina a nivel mundial está en crecimiento. Esto se ve reflejado por el aumento de actividades ecuestres y competencias internacionales, en las que participan caballos de gran valor genético y potencial deportivo. Lo mismo ocurre en Uruguay, donde además existe una cultura fuertemente arraigada al caballo y el sector ecuestre ha sido siempre una fuente de trabajo muy valiosa para la población. Este desarrollo ha repercutido en los Veterinarios, que hasta hace poco tiempo abarcaran todos los escenarios de la atención veterinaria equina, sin centrarse en uno de ellos. En la actualidad, son cada vez más los profesionales especializados en las diferentes áreas, ya sea clínica deportiva, cirugía, odontología, etc. El área de la reproducción particularmente, ha ido ganando protagonismo desde el surgimiento de las biotecnologías reproductivas. Estas no solo son necesarias para resolver problemas de subfertilidad/infertilidad, sino también para producir potros con mayor eficiencia, y conservar especies en peligro de extinción. La Inseminación Artificial (IA) y la Transferencia de Embriones (TE) se han investigado en profundidad por mucho tiempo y se tiene bastante conocimiento sobre ellas. En nuestro país son las únicas biotecnologías que se han implementado hasta el momento, razón por la cual se las desarrollará en mayor medida. Técnicas más nuevas como la Aspiración Folicular, la Maduración *in vitro* de ovocitos, la Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (de su sigla en inglés: ICSI) y la Criopreservación de gametos y embriones, han ido ganando terreno en estos últimos años. De igual forma lo vienen haciendo la Transferencia Nuclear de Células Somáticas (TNCS) y la Edición Génica, que permiten obtener individuos con características deseadas. A partir de una vasta y actualizada investigación bibliográfica, en esta monografía se pretende exponer las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) que se aplican en la especie equina, conocer su evolución a lo largo de los años y finalmente evaluar su aplicabilidad en Uruguay y el resto del mundo.

SUMMARY

The equine industry worldwide is growing. This is reflected by the increase in equestrian activities and international competitions, in which horses of great genetic value and sporting potential participate. The same happens in Uruguay, where there is also a culture strongly rooted to the horse, and the equestrian sector has always been a very valuable source of work for the population. This development has had an impact on Veterinarians, who until recently, used to cover all scenarios of equine veterinary care, without operating in one of them solely. At present, there are more and more professionals specialized in different areas, be it sports clinic, surgery, dentistry, etc. The area of reproduction, in particular, has been gaining protagonism since the emergence of reproductive biotechnologies. These are not only necessary to resolve subfertility/infertility problems, but also to produce foals more efficiently, and conserve endangered species. Artificial Insemination (AI) and Embryo Transfer (ET) have been extensively researched for a long time and are widely known. In our country they are the only biotechnologies that have been implemented so far, reason why they will be developed in a more extensive way. Newer techniques such as Follicular Aspiration, *In vitro* maturation of oocytes, Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) and Cryopreservation of gametes and embryos have been gaining ground in the last years. Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) and Gene Editing have also been doing it, which allow to obtain individuals with desired characteristics. Based on a vast and up-to-date bibliographical research, this monograph intends to expose the Assisted Reproduction Techniques (ART) that are applied in the equine species, to know their evolution over the years and finally to evaluate their applicability in Uruguay and in the rest of the world.

1. INTRODUCCIÓN

El stock equino a nivel mundial alcanza las 59 millones de cabezas. Los países con mayor población equina son Estados Unidos, México y Brasil. En este ranking, Argentina y Uruguay ocupan el puesto 7° y 24° respectivamente (Uruguay Siglo XXI, 2021). Con respecto a las actividades ecuestres en nuestro país, la hípica es la que nuclea la mayor cantidad de animales en competencia (39%), seguido por el enduro (22%), razas funcionales (13%), raid (11%) y polo (5%) (Ferrari, Sader, Pérez, López y Recuero, 2012). Uruguay cuenta con preciados recursos naturales y humanos para el desenvolvimiento del sector, en el cual en estos últimos años, los valores monetarios de los caballos deportivos, en su mayoría los de enduro y raid, han aumentado considerablemente (Cazales, 2017).

A este aumento se lo ha asociado con un mayor interés por la genética de los caballos uruguayos que se ha generado a nivel mundial, y que de alguna forma también explica el crecimiento sostenido del área de la reproducción. Este progreso incita a los criadores a trabajar con mayor profesionalismo, necesitando de personal capacitado y de la aplicación de biotecnologías, para así poder cumplir con las demandas del mercado (Cazales, 2017). Según el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Uruguay cuenta con más de 400.000 cabezas de equinos (Iribarren y Navarro, 2020) y el agronegocio del caballo emplea de manera directa e indirecta unas 200.000 personas (Cazales, 2017).

El campo de aplicación de las biotecnologías reproductivas en equinos es similar al de humanos: reproducir individuos con barreras fisiológicas y patológicas para generar nueva descendencia (Baca Castex y Miragaya, 2015). A pesar de que existen grandes diferencias entre los caballos y los humanos, en cuanto a la anatomía reproductiva, la dinámica folicular, la mono-ovulación y la cinética del desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto, estos presentan muchas similitudes. El conocimiento recíproco de las técnicas de reproducción asistida tanto en mujeres como en yeguas, tiene la capacidad de integrarse para su posterior aplicación, siendo que algunas técnicas han sido dominadas en humanos pero no en caballos y viceversa (Benammar y col., 2021).

Con relación también a la salud humano-animal, la investigación y la importancia en la producción de equinos, vale la pena destacar el rol de estos últimos en las Terapias Asistidas con Animales. Estas tratan sobre la prevención y tratamiento de patologías humanas, tanto físicas como psíquicas; y en las Actividades Asistidas con Animales, en las que no se tienen objetivos terapéuticos definidos, pero se fundamentan en promover beneficios motivacionales, educativos y recreativos que puedan aumentar la calidad de vida de las personas (Ares, 2019).

En otro orden de cosas, las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) pueden permitir salvar especies en peligro de extinción, como lo fue en el caso de “Kurt”, el primer caballo de Przewalski clonado con éxito en el mundo. Nació en Texas, el 6 de agosto de 2020. El potro nacido de una madre subrogada, es un clon de un caballo de Przewalski macho, cuyo ADN fue criopreservado hace 40 años en un Zoológico de

San Diego, EEUU. Gracias a los científicos fue posible restaurar esa genética, que de otro modo se hubiera perdido en el tiempo, y que ha proporcionado un modelo importante para futuros esfuerzos de conservación (Revive y Restore, 2020)

2. OBJETIVOS

Objetivo General.

Exponer las biotecnologías de la reproducción que se aplican en la especie equina.

Objetivos Específicos.

Desarrollar la evolución de estas técnicas a partir de una investigación bibliográfica vasta y actualizada, principalmente de los últimos cinco años.

Evaluar su aplicabilidad tanto en Uruguay como en el resto del mundo.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3. 1 Técnicas que utilizan gametos

3. 1. 1 Inseminación Artificial (IA)

3. 1. 1. 1 Evolución y aplicabilidad

La primera mención de utilización de la Inseminación Artificial en equinos, la cual fue registrada en textos árabes, data del siglo XIV. A fines del siglo XIX y principios del XX, el caballo era utilizado en masa, principalmente en la guerra, producción agropecuaria y como medio de transporte. Luego de la introducción de los motores de combustión en el área automotriz, la población equina se redujo a nivel mundial. Al mismo tiempo, se generó falta de interés por parte de los criadores que dejaron de destinar recursos para la investigación, y las asociaciones de la mayoría de las razas, no permitieron el uso de la IA o lo hicieron con restricciones (Brass, 2001).

Luego de la Segunda Guerra Mundial, la IA continuó su aplicación pero en una población reducida de caballos. A partir de la década de los 1970, la producción equina comenzó a experimentar un auge principalmente en el empleo de caballos deportivos y actividades de placer, siendo el Stud Book del Pura Sangre Inglés (PSI), la única asociación de criadores que aún se opone a su implementación. El resto de las razas la han permitido sin restricciones, dando un puntapié para el desarrollo de nuevas TRA (Brass, 2001; Prell, McCue, Moffet y Graham, 2020); estos cambios también fueron acompañados por el uso de la ultrasonografía, la cual revolucionó la industria equina en las décadas de los 70 y 80 (Squires, 2020).

Esta técnica, que consiste en depositar el semen del padrillo en el tracto reproductor de la yegua, tiene un sin fin de cualidades que merecen ser mencionadas. Para empezar, permite un mejor aprovechamiento de los reproductores, ya que es posible aumentar las tasas de preñez de yeguas con patologías reproductivas, con temperamento difícil, o cualquier otra alteración que dificulte el servicio por monta natural, y el semen de los padrillos, puede usarse con más eficiencia para cubrir un mayor número de yeguas por eyaculado. Se evita el transporte de las yeguas, que pueden estar con potrillo al pie, hasta el lugar donde se encuentra el reproductor y viceversa; se reduce el riesgo de accidentes y se previene el contagio de enfermedades venéreas (Brass, 2001). “Quizá sea la biotecnología con mayor impacto en la producción equina, pues un padrillo puede dejar centenares de descendientes a lo largo de su vida reproductiva, si esta es usada eficientemente” (De Almeida y Oliveira, 2021).

La recolección del semen es una parte esencial para el éxito en los programas de IA. La calidad del semen recolectado depende de numerosos factores como la libido, época del año, edad, raza, actividad sexual y la higiene necesaria durante la recolección, para evitar cualquier tipo de contaminación con elementos espermicidas.

En ocasiones, puede ser necesaria la estimulación manual o química para obtener el eyaculado. Se lo puede recolectar por medio de un preservativo o con el uso de Vagina Artificial (VA), la herramienta más utilizada hoy en día. Hay varios modelos de VA disponibles comercialmente y el uso de una u otra, dependerá de las preferencias del profesional o del padrillo en particular (Álvarez, 2020).

También se puede obtener semen de la cola del epidídimo. Esto generalmente se efectúa en animales castrados, recién sacrificados, que han sufrido muerte súbita o con patologías del tracto genital que impidan la eyaculación. Sobre todo en animales de alto valor genético con enfermedades repentinas o lesiones graves (Miró et al., 2020). La calidad en cuanto a motilidad del semen extraído de la cola del epidídimo y del eyaculado por VA han sido comparadas y no se han visto grandes diferencias, tampoco en relación a defectos morfológicos, de viabilidad espermática o tasas de preñez, por lo que se la considera una herramienta muy útil en determinadas circunstancias (Álvarez, 2020).

El semen se evalúa de forma macroscópica y microscópica; los parámetros frecuentemente utilizados en IA incluyen: volumen total (sin gel), concentración espermática, motilidad total y progresiva, vigor, morfología espermática, entre otros. Algunos animales con aparente buena calidad seminal, pueden mostrar pobres tasas de fertilidad y necesitan de estudios más exhaustivos (Álvarez, 2020). En la IA, los resultados de la evaluación del semen se deben asociar al conocimiento del historial de las yeguas, que pueden afectar la fertilidad potencial del padrillo (Kowalczyk, Czerniawska-Piatkowska y Kuczaj, 2019). Hoy en día el sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analyses) es una herramienta muy eficiente para estudiar el semen, pero a pesar de la inmediatez y precisión de estos softwares, varios profesionales aún confían y hacen uso del análisis no automatizado con microscopios de buena calidad y contraste de fase, debido al alto costo de los sistemas computarizados (Giaretta et al., 2017).

El eyaculado es una suspensión líquida compuesta de espermatozoides y Plasma Seminal (PS), el cual no debe ser expuesto a daños mecánicos, luz, frío o calor y el equipo en contacto con los espermatozoides debe ser calentado de forma adecuada, estar seco, limpio y libre de residuos tóxicos (Álvarez, 2020). El plasma seminal es el componente del eyaculado que contiene secreciones de los testículos, epidídimos y de las glándulas sexuales accesorias (Neuhauser, Gösele y Handler, 2018). Participa en la maduración final del espermatozoide, estabiliza la superficie de la membrana espermática, tiene capacidad antioxidante y sirve como vehículo de los espermatozoides eyaculados, protegiéndolos en el transporte a través del aparato reproductor femenino (Álvarez, 2020; Miró et al., 2020).

Sin embargo, el PS normalmente se separa casi en su totalidad de los espermatozoides durante el proceso de criopreservación, ya que se ha demostrado que puede interferir con la congelabilidad del semen, disminuyendo el porcentaje de espermatozoides viables posdescongelación (Álvarez, 2020). En la bibliografía, mientras algunos autores destacan sus beneficios, otros remarcan sus perjuicios, por lo que existen muchas contradicciones. Esta confusión se debe a que los efectos y el rol del PS durante el almacenamiento del semen a bajas temperaturas, no están del todo claro (Al-Essawe, Johannisson, Wulf, Aurich y Morrel, 2018).

De acuerdo con Papin et al. (2021), la remoción de la mayor parte del PS, tiene un papel benéfico en la estabilización de la membrana espermática y podría reducir el daño a la cromatina al remover las fuentes de Especies Oxígeno Reactivas (ROS). Por otro lado, se ha reportado que es conveniente la sustitución de una fracción de PS (1% a 20%) de buena calidad, en padrillos malos congeladores, para mejorar la motilidad de los espermatozoides posdescongelación (Papas et al., 2019); de forma similar Sabatini, Rota, Panzani, Tesi y Camillo (2018), expresaron que la adición de PS después de la descongelación ha mostrado efectos positivos en los espermatozoides, tales como mayor viabilidad e integridad de la membrana del acrosoma. Las características del semen posdescongelación de padrillos “malos congeladores” se mejoraron con la adición de 5% a 30% de PS de padrillos con fertilidad comprobada.

La integridad de la membrana plasmática, del acrosoma y la ausencia de acumulación de ROS durante el almacenamiento del semen, son factores fundamentales para establecer una preñez viable (Al-Essawe et al., 2018). La membrana plasmática de los espermatozoides tiene un elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados, lo cual la hace ser muy sensible al estrés oxidativo (desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad antioxidante) y la subsecuente peroxidación lipídica (Papas et al., 2019). Las ROS son producidas por organismos vivos como resultado del metabolismo celular normal y juegan un papel benéfico en la protección contra el estrés celular. Sin embargo, ante un desbalance, estas pueden causar daño a componentes celulares como lípidos, proteínas o ADN (Varga, Serres, Gosálvez, Bartolomé y Crespo, 2018).

3. 1. 1. 2 Concentración, selección y sexado de semen

Existen procedimientos para concentrar y/o seleccionar los espermatozoides. De esta forma, es posible mejorar la calidad del semen previo a la IA. Algunos de ellos separan el PS de los espermatozoides únicamente y otros, además de esto, permiten seleccionar aquellos que tienen la mejor capacidad para fecundar (Morrel y Rodríguez-Martínez, 2011).

Para concentrar los espermatozoides y remover el PS, la centrifugación es el método comúnmente utilizado, pero si esta es usada de forma inadecuada, la fuerza y la duración de las rotaciones, pueden afectar la integridad de la membrana espermática y la motilidad (Simioni et al., 2019). Con el empleo de membranas hidrofílicas sintéticas como el Spermfilter® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), el semen diluido se coloca en este filtro y mediante suaves movimientos, el plasma se elimina por capilaridad y los espermatozoides quedan retenidos en la membrana. De esta manera se evitan los efectos adversos de la centrifugación, como también la necesidad de cargar con la centrífuga (Simioni et al., 2019).

Otra alternativa para reducir estos daños, es el uso de un “colchón de centrifugación”, como lo es RedCushion® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), que tiene la capacidad de amortiguar los espermatozoides y así reducir el daño durante la centrifugación. Produce pellets menos compactos, con una alta tasa de recuperación de espermatozoides, debido a la posibilidad de trabajar con intensidades y tiempos de centrifugación superiores a los utilizados en protocolos convencionales; por tener una

coloración rojiza, RedCushion®, permite una fácil visualización del sedimento y su remoción (Botupharma, 2022).

El objetivo en la selección de espermatozoides, es la mejora cuantitativa y cualitativa del semen cuando se lo compara con el eyaculado inicial (Larentis, Camozzato, Bastos, Gregory y Mattos, 2018). En la selección se obtiene un menor número de espermatozoides que la muestra inicial pero con mejores características. Estas se basan en la migración espermática, con la que se obtienen espermatozoides con mayor motilidad (Swim-Up); filtración, donde se colectan células con mejor integridad de membrana (filtros con lana de vidrio o Sephadex); y la centrifugación coloidal, cuyo resultado es la obtención de una población espermática con mayor motilidad, mayor proporción de espermatozoides morfológicamente normales y menor proporción de espermatozoides con cambios apoptóticos. A su vez, la centrifugación coloidal puede dividirse en centrifugación en una única capa y centrifugación con gradientes de densidad (Ayuso-Hernando, Gutiérrez-Cepeda, Villalva y Serres, 2011).

En el equino, las técnicas que se utilizan con mayor frecuencia son las llamadas “Swim-Up” y la centrifugación coloidal (Orsolini, Verstraete, Heule, Meyers y Pini, 2022; Vélez et al., 2018). Un ejemplo de un coloide utilizado para esta función es el Equipure™. Por medio de la centrifugación, este coloide tiene la capacidad de eliminar los espermatozoides anormales, mejorando la calidad del semen antes de la criopreservación, inseminación, sexaje o posdescongelado (Botupharma, 2022); existen otras opciones como el Androcoll y el Percoll.

Con respecto a la IA con semen sexado, esta sigue un ritmo más lento que en otras especies, a pesar del interés que existe entre los criadores (Squires, 2020). La determinación del sexo en equinos se suele realizar posconcepción, donde la mayoría de los procedimientos disponibles, no son prácticos de realizar a campo, o son factibles de realizar en etapas de la gestación ya avanzadas, donde no es posible descartar el sexo no deseado (Ramírez Castex y Lossino, 2018). La clasificación por Citometría de flujo para el sexado de semen, detecta la diferencia en el contenido de ADN de las células y es la técnica más eficiente disponible hoy en día para separar los espermatozoides portadores del cromosoma X de los Y. Aunque el sexado del semen está ampliamente incluido en los sistemas de producción ganadera, sobre todo en ganado de tambo, su uso en los programas para equinos es escaso (Herrera, 2018; Squires, 2020).

Los espermatozoides equinos sexados presentan baja viabilidad tras la criopreservación y se limita su uso con semen fresco, a centros que poseen el Citómetro de flujo en el mismo lugar donde se encuentra la hembra a ser inseminada (Herrera, 2018). Squires (2020), informó tasas de preñez con semen congelado sexado del 12%. El número de espermatozoides que pueden ser eficazmente seleccionados por hora en el equipo, ha sido el principal problema para su aplicación masiva, teniendo en cuenta que el caballo necesita de un gran número de espermatozoides para inseminar una hembra (Ramírez Castex y Lossino, 2018; Squires, 2020). Aunque una tasa de sexado lenta logra una mejor clasificación y separación de espermatozoides X de Y, logrando una mayor pureza de la muestra, la longevidad de los espermatozoides, se ve afectada negativamente. O sea, a mayor tiempo de procesado, menor calidad espermática de la muestra; en el sexado por Citometría de Flujo, en 1,5 horas se clasifican solamente 16 millones de células,

haciendo que sea necesaria la implementación de IA profunda con dosis baja (Ramírez Castex y Lossino, 2018).

La medicina y la tecnología han explorado la nano-medicina o nano-tecnología en la infertilidad masculina. Las nanopartículas magnéticas tienen la capacidad de separar espermatozoides vivos, muertos y apoptóticos (Ramírez Castex y Lossino, 2018). Herrera (2018), en asociación con su aplicación en el sexado equino, ha afirmado que la exposición del semen a nanopartículas magnéticas, no afecta los parámetros espermáticos y los espermatozoides son seleccionados eficientemente. Estos resultados son muy alentadores, ya que la técnica es aplicable incluso después de la congelación y descongelación. Las nanopartículas tienen un futuro promisorio, pero su uso aún está lejos de ser aplicable comercialmente (Herrera, 2018). Aunque se han reportado preñeces a partir de semen sexado, todo indica que este procedimiento, no se ha consolidado como una opción factible de realizar corrientemente en la práctica (Ramírez Castex y Lossino, 2018).

3. 1. 1. 3 Inseminación con semen fresco

El empleo de diferentes preparaciones de semen (fresco, refrigerado, congelado-descongelado) requiere de técnicas y protocolos adecuados para obtener resultados de preñez aceptables (Khöhne et al., 2020). La utilización de semen fresco evita los daños por choque térmico (stress osmótico y oxidativo) que generan las técnicas de conservación a bajas temperaturas, pero se conserva pocas horas. Hoy en día, el semen refrigerado es el más utilizado en la industria de IA en el caballo (Álvarez, 2020; Bazzano et al., 2022). En contraste con las prácticas actuales en rumiantes, el uso de semen congelado, no ha reemplazado al de refrigerado y fresco, debido en parte a la necesidad de poner en práctica procedimientos más costosos y complejos, para congelar e inseminar adecuadamente el semen de los padrillos (Ferrer et al., 2020).

Las tasas de preñez por ciclo con semen congelado, refrigerado o fresco se encuentran en el entorno del 38%-58%, 43%-87,5% y 55,1%-84,6%, respectivamente (Sabatini et al., 2018). Hay parámetros que determinan el éxito de estas tasas como ser el número total de espermatozoides viables por IA (dosis), número de inseminaciones por ciclo (frecuencia de IA), momento óptimo de la IA relativo a la ovulación, sitio y técnica de IA (Cazales, Estradé y Costa, 2020). Las yeguas se deben inseminar lo más cercano a la ovulación posible. La Federación Mundial de Cría de Caballos Deportivos (WBFSH) recomienda como dosis estándar, un mínimo de 250 millones de espermatozoides viables para la inseminación con los tres tipos de semen (McKinnon, Squires, Vaala y Varner, 2011).

El semen se considera fresco cuando se insemina dentro de las dos horas de la recolección. La IA se suele realizar cada 36 a 48 horas una vez detectado el celo, hasta que este deje de manifestarse (el objetivo es inseminar dentro de las 48 horas preovulación), o antes de que la ovulación sea detectada por palpación rectal y/o revisión ultrasonográfica (Sieme, Schafer, Stout, Klug y Waberski, 2003).

3. 1. 1. 4 Inseminación con semen refrigerado

El semen refrigerado se caracteriza por su capacidad de ser transportado y tolerar un mayor tiempo de almacenamiento en comparación con el semen fresco, debiendo

inseminarse idealmente, dentro de las 48 horas posteriores a la recolección (Len, Beehan, Eilts, Ebrahimie y Lyle, 2019). Se volvió popular en la década de 1990, cuando la mayoría de las asociaciones americanas habilitaron su uso (Novello, Podico, Segabinazzi, Lima y Canisso, 2020). La calidad del semen refrigerado está determinada por varios factores tales como características intrínsecas de cada padrillo, el tipo de diluyente utilizado, la curva de refrigeración y técnica aplicada para la eliminación del plasma seminal (Simioni et al., 2019).

Al refrigerar el semen, la fertilidad de los espermatozoides en algunos padrillos se ve reducida. La temperatura de enfriamiento reduce el metabolismo de los espermatozoides de forma suficiente para mantener su viabilidad, funcionalidad y fertilidad, pero cualquier efecto adverso al que se someta el espermatozoide impactará negativamente (Dutra, Graglia y Martínez, 2013). Varios estudios han determinado que la IA con semen refrigerado muestra tasas de fertilidad similares en comparación con semen fresco (Álvarez, 2020). En cambio, si se compara el uso de semen refrigerado con congelado, es superior el primero, porque se produce un menor daño celular durante el descenso de la temperatura (De Almeida y Oliveira, 2021; Prell et al., 2020).

Las tasas de preñez son mayores si se logra inseminar en la ventana de tiempo de entre 24-48 horas preovulación (Huber et al., 2019). Teniendo en cuenta que no todos los padrillos reaccionan de la misma manera a la refrigeración y se estima que en 24 horas se pierden alrededor del 50% de los espermatozoides móviles, para lograr que llegue a destino una dosis inseminante de 250 a 500 millones de espermatozoides móviles, se debería enviar entre 1000 y 2000 millones de espermatozoides móviles totales (Tirone, 2011).

Para mejorar la calidad del semen y asegurar la supervivencia celular durante el almacenamiento, se deben adicionar diluyentes (Neuhauser, Sacker y Handler, 2017). Las cualidades de un buen diluyente implican que este provea de un ambiente favorable al espermatozoide, que sea económico y que permita una evaluación del semen de forma precisa. Existen varios diluyentes comerciales en el mercado (Dutra et al., 2013). Dentro de las virtudes que presenta su empleo, se pueden mencionar su capacidad antimicrobiana, nutritiva, energética, diluyente de factores tóxicos presentes en el plasma seminal y la posibilidad de fraccionar el eyaculado. En general, estos se componen de agua desionizada y bidestilada, tampones, lipoproteínas, aminoácidos, azúcares y antibióticos (Al-Essawe et al., 2018; Neuhauser et al., 2017).

La concentración ideal para maximizar la viabilidad del semen diluido es de 25-50 millones de espermatozoides/ml (McKinnon et al, 2011). Las diluciones comúnmente son 1:3-1:4 (semen/diluyente) (Knottenbelt, Le Blanc, Lopate y Pascoe, 2003). Se debe atender la predilección individual de cada padrillo, ya que no todos responden de igual manera a los mismos diluyentes, por lo que es imperativo conocer el más adecuado para el animal con el que se está trabajando y así obtener buenos resultados (Al Essawe et al., 2018; Neuhauser et al., 2017).

A la temperatura aproximada de 5°C y en el rango de 24 a 48 horas, en ocasiones hasta 72 horas, los diluyentes tienen un rol fundamental en la conservación del semen que se encuentra con su metabolismo suspendido (Santos, Mylius, Costa, Fiala y Rechsteiner, 2020). En la década de 1970, el Dr. Robert Kenney introdujo al mercado

un diluyente a base de leche descremada en polvo para ser aplicado en el útero de la yegua después del servicio. Posteriormente comenzó a utilizarse en el semen, y hasta los años 2000, fue el diluyente más reconocido a nivel mundial, aunque surgieron otras variaciones en base a su fórmula (Novello et al., 2020).

Por otro lado, en los 90, investigadores franceses descubrieron que el fosfocaseinato nativo de la leche, tenía función crioprotectora de los espermatozoides. Esta molécula reemplazó la leche descremada de la fórmula del diluyente Francés INRA 82®, en un nuevo diluyente conocido como INRA96®, presentando resultados altamente superiores que con los diluyentes de Kenney, y convirtiéndose en el más elegido hasta la fecha (Novello et al., 2020). INRA 96® es útil para la mayoría de los sementales y se distingue por mantener la viabilidad espermática, motilidad progresiva e integridad de la cromatina (Novello et al., 2020). El desarrollo de diluyentes como INRA96®, ha permitido la preservación de la fertilidad después del almacenamiento, a temperaturas de hasta 15°C. Esto ha sido particularmente útil para aquellos padrillos que no toleran la refrigeración (Battut y Rousseau, 2018).

También se introdujo al mercado un diluyente para semen refrigerado que contiene caseínas de la leche en combinación con ciclodextrina cargada de colesterol, BotuSÊMEN® GOLD (Botupharma, 2022). Las caseínas son proteínas de la leche que pueden prevenir el daño criogénico de los espermatozoides al unirse competitivamente a las proteínas del plasma seminal involucradas en este proceso. Las caseínas también interactúan con el calcio ionizado, que juega un papel importante durante la capacitación espermática; la ciclodextrina funciona como vehículo para incorporar colesterol en la membrana plasmática (Novello et al., 2020).

Los padrillos con baja capacidad para refrigerar el semen, tienen concentraciones más bajas de colesterol en la membrana. La ciclodextrina cargada de colesterol es una alternativa para prevenir el daño de los espermatozoides durante el enfriamiento en este tipo de animales (Loomis, Squires, Skaife y Graham, 2018; Novello et al., 2020). En un experimento que compara dos de los diluyentes mencionados (INRA96® y BotuSÊMEN® GOLD), se vio que este último es una alternativa adecuada al INRA96® cuando se usa dentro de las 48 horas; a las 72 horas de almacenamiento, INRA96® ha mostrado mayores concentraciones de espermatozoides viables (Rečková et al., 2022).

La mayoría de los diluyentes para semen refrigerado, generalmente se basan en el uso de leche UHT (procesada a temperaturas ultra altas, con capacidad de conservación duradera) (Santos et al., 2020). En un experimento hecho por estos últimos autores, constataron que es posible la utilización solamente de leche UHT descremada, semidescremada o entera como diluyente de semen equino, y la manutención de la viabilidad celular durante 24 horas a 5°C, pero cuando sea necesaria la refrigeración por hasta 48 horas, los diluyentes industrializados, como el Botusêmen Special® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), son más eficientes (Santos et al., 2020).

Se está evaluando la posibilidad de conservar el semen refrigerado en un medio sintético químicamente definido por más de 72 horas sin criopreservación. Esto podría ser útil para aquellos padrillos que no toleran el enfriamiento o la congelación, pero que su semen debe necesariamente ser transportado. Esto disminuiría los problemas

de bioseguridad asociados con el uso de diluyentes con productos derivados de animales, tales como leche descremada y yema de huevo en el caso del semen congelado, y se flexibilizarían los protocolos de inseminación (Gibb, Clulow, Aitken y Swegen, 2018).

En un trabajo escrito por Bradecamp (2021), el autor hace énfasis en la aplicación de técnicas de conservación estrictas para garantizar que el semen refrigerado transportado, cuente con la más alta calidad después de haber sido recibido. El semen puede envasarse en condiciones anaeróbicas, en variados recipientes como bolsas de plástico ej. Whirl-Pak® (eNasco, Fort Atkinson, WI, USA), jeringas de plástico sin émbolos de goma, recipientes de plástico como tubos de centrífuga cónicos, entre otros. Para el transporte del semen existen sistemas pasivos y activos, se diferencian en las tasas de refrigeración, costos de equipamiento, temperatura final y tiempo máximo de almacenamiento. Los “containers” pasivos son los más utilizados a nivel mundial. Estos son de menor valor y las tasas de refrigeración dependen de la temperatura ambiente e inicial de la muestra. Los activos son más caros y presentan tasas de refrigeración predeterminadas y lineares (Bradecamp, 2021).

En las cajas de refrigeración pasiva isotérmicas el contenido se ubica próximo a la fuente de frío (hielo reciclable), que de acuerdo con el sistema, puede estabilizar a 15°C-20°C, o 4°C-6°C (Novello et al., 2020). Generalmente, para que sean alcanzados los 15°C, se debe colocar solo un bloque de hielo reciclable. En cambio para los 5°C, son necesarios dos bloques; se debe tener en cuenta que el semen no se debe colocar con el recipiente ya frío. Para cada temperatura final existe un período máximo de mantenimiento de 24 a 48, algunos hasta 72 horas, dependiendo de la temperatura ambiental (Novello et al., 2020).

Dentro de los dispositivos pasivos, algunos son reutilizables y otros desechables. Las cajas pueden ser de poliestireno como el BotuFLEX® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) y el Equine Express® II (Minitube, USA), o de fibra como el Equitainer® (Hamilton Research, USA), Botu-Box® (Botupharma, Botucatu, Brasil) o Botutainer® (Botupharma, Botucatu, Brasil) (Bradecamp, 2021; Novello et al., 2020).

El Equitainer® es el dispositivo reutilizable más reconocido a nivel mundial, tiene la capacidad de mantener el semen a 5°C por hasta 48 horas sin pérdida de su viabilidad (Knottenbelt et al., 2003). BotuFLEX® presumiblemente puede permitir una curva de enfriamiento similar al Equitainer®. El fabricante de BotuFLEX® (dispositivo desechable), describe en su sitio web oficial (www.botupharma.com) que este permite que las muestras lleguen al destino final con la temperatura adecuada, aunque existan condiciones adversas de temperaturas externas, como sucede en el transporte aéreo, rodoviário o con “motoboy”, teniendo en cuenta que no todos los dispositivos desechables tienen la capacidad de tolerar temperaturas extremas (Novello et al., 2020).

En el contenedor de envío se debe incluir toda información necesaria: nombre del padrillo, número de registro, fecha y hora de recolección del semen, % motilidad total y progresiva, número de dosis enviadas, volumen de inseminación, nombre de la yegua a ser inseminada y su número de registro de raza, como todos los datos que se consideren relevantes. Pueden ocurrir variaciones en el empaque con diferentes tipos de sistemas de transporte de semen, por lo que se tiene que seguir las

recomendaciones del fabricante. Los contenedores reutilizables deben examinarse periódicamente para detectar cualquier interrupción en el mecanismo de sellado, que podría resultar en calentamiento prematuro de la muestra de semen (Bradecamp, 2021).

Mientras que la disminución de la temperatura puede favorecer la longevidad de los espermatozoides, su disminución drástica, puede provocar cambios en la estabilidad de la membrana plasmática, causado por la reorganización de los lípidos desde estado líquido a gel. Por este motivo, es necesario mantener rangos de descenso de temperatura apropiados para evitar daños funcionales y estructurales irreversibles al espermatozoide (Monteiro y Fabres, 2018; Gonzalez-Castro, Trentín, Carnevale y Graham, 2019). Por lo general, se parte de una temperatura de 37°C donde ocurre una muerte extensa de espermatozoides. El pasaje de 19°C a 8°C-5°C es más crítico para el daño por choque de frío que las velocidades de enfriamiento de 37°C a 20°C. Esta última fase se da en forma más rápida que la primera (Knottenbelt et al., 2003).

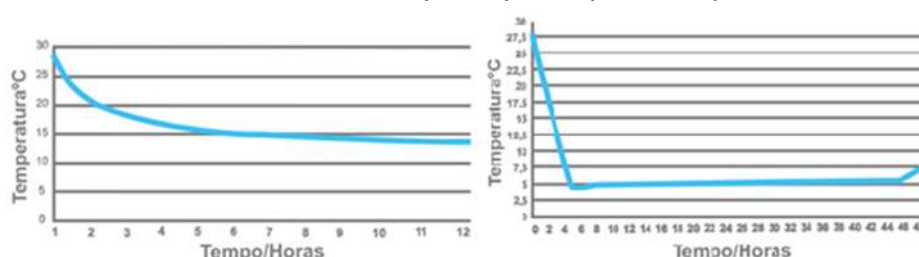


Figura 1. Curvas de refrigeración de BotuFlex con uno (foto izquierda) y dos hielos (foto derecha) (Botupharma, 2022).

3. 3. 3. 5 Inseminación con semen congelado

En el año 1957, Barker y Gandier, reportaron el primer nacimiento a través de IA con semen congelado (García, 2018). Las primeras asociaciones que permitieron este tipo de inseminación, fueron la Asociación Americana de Cuarto de Milla y la Asociación Americana de Paint Horse en el año 2001. Actualmente la mayoría de las razas la permiten. En Uruguay algunas de las asociaciones que lo han hecho, son la Sociedad de Criadores de Caballos Criollos (SCCC), Árabes (SCCA) y Cuarto de Milla (SCCM) (Lazcano y Pereyra, 2020).

La capacidad de conservación del semen congelado por tiempo indefinido hace que su uso tenga dos ventajas principales: permite estar disponible en cualquier momento sin la presencia del padrillo, incluso después de muerto, y brinda la posibilidad de ser transportado sin deteriorarse, por distancias más grandes que lo que permite el semen refrigerado (Al-Essawe et al., 2018).

En la cría equina, los padrillos son seleccionados de acuerdo a sus performances deportivas o a sus aptitudes fenotípicas, dejando un poco de lado su calidad seminal, fertilidad o habilidad de sus espermatozoides de soportar el proceso de criopreservación. Uno de los principales problemas en el uso del semen congelado, al igual que el semen refrigerado, es la gran variabilidad individual que existe entre los reproductores para tolerar la congelación, influyendo en su capacidad de participar en

programas de IA con semen congelado, o hacerlo de forma eficiente (Al Essawe et al., 2018).

Los protocolos actuales de congelación generalmente implican un procedimiento de dilución de dos pasos en el que el semen se diluye primero con un diluyente primario (para centrifugación), seguido por la centrifugación, y luego una nueva dilución con un segundo diluyente (para congelación) que contiene un crioprotector. La primera dilución emplea diluyentes a base de leche utilizados para diluir semen fresco/refrigerado. Después de realizadas las dos diluciones, el semen suele empaquetarse en pajuelas de 0,5ml; generalmente se lo concentra con 100 a 400 millones de espermatozoides/ml, aunque es más frecuente encontrar la concentración de 200 millones de espermatozoides/ml (pajuelas con 100 millones de espermatozoides totales) (McKinnon et al., 2011).

En cuanto a los crioprotectores, el glicerol es el de uso corriente. Sin embargo, este puede llegar a ser tóxico para los espermatozoides, debido a su peso molecular y lenta permeabilidad de membrana, ocasionando un mayor estrés osmótico y no siendo tolerado por algunos padrillos (Andrlová, Mrácková y Sedlinská, 2020; Vafaei, Kohram, Zareh-Shane, Ahmda y Seifi-Hamadi, 2019). La toxicidad osmótica e intrínseca del glicerol, ha llevado a los investigadores a buscar nuevas alternativas para proteger a los espermatozoides criopreservados. Particularmente, se ha puesto énfasis en el estudio de los compuestos conocidos como amidas. Estos agentes son menos viscosos, tienen menor tamaño molecular que el glicerol, y pueden acelerar el transporte a través de la membrana plasmática, disminuyendo los efectos tóxicos en el espermatozoide (Vafaei et al., 2019).

Las cualidades de las amidas promovieron la producción del diluyente comercial “BotuCrio®” (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil). Este diluyente tiene una concentración relativa menor de glicerol (1%), en comparación con otros diluyentes; metilformamidina (4%), aminoácidos y yema de huevo (10%) y es comercializado como un diluyente apropiado para contrarrestar los efectos indeseados de la congelación. Los diluyentes EZ Mixin Cryomax MFR y EDTA- EZ Mixin Cryomax LE, también han reemplazado parcialmente el glicerol por amidas (Ferrer et al., 2020).

La corta vida media de los espermatozoides posterior a la descongelación continúa generando la necesidad de seguir de cerca el celo de la yegua e inseminar cercano a la ovulación, encareciendo el procedimiento de la IA (Al-Essawe et al., 2018). El momento, la técnica y la frecuencia recomendados para inseminar con semen congelado-descongelado, varían ampliamente entre los estudios y principalmente dependiendo de la preferencia del Veterinario. Influye también el número de dosis disponibles por yegua y por temporada, y su costo (Immonen y Cuervo Arango, 2019).

A veces hay poca disponibilidad de semen, de modo que esto impone una gran presión a los clínicos a la hora de decidir cuándo inseminar la yegua (Hollinshead y Hanlon, 2018). Generalmente se recomienda que el semen sea depositado en el tracto reproductor, idealmente, dentro de las 12 horas preovulación o hasta 6 horas posovulación (McKinnon et al., 2011). Los protocolos de IA descritos varían con la bibliografía, pero los más frecuentes incluyen: i) IA a tiempo fijo (IATF) inseminando antes y después de la ovulación; ii) IA única dentro de las 6 a 12 horas posovulación (Hollinshead y Hanlon, 2018).

En la práctica clínica, esta última opción, es el régimen frecuentemente utilizado para la IA. Consiste en examinar la yegua por ultrasonido cada 6 horas después de administrar un agente inductor de la ovulación, y luego inseminar inmediatamente después de que la misma sea detectada, no más de las 12 horas posteriores a la misma y preferentemente dentro de las primeras 6 a ella (Hollinshead y Hanlon, 2018). Se ha concluido que las tasas de preñez y de pérdidas embrionarias, no parecerían verse afectadas por la variación entre las revisiones ecográficas ya sea cada 3, 6, 9 o 12 horas (Larentis y Bastos, 2020). Cuando se dispone de una sola dosis inseminante, el Veterinario suele preferir la inseminación única posovulación para tener más seguridad, en caso de que la yegua no ovule dentro del tiempo esperado (Immonen y Cuervo Arango, 2019).

La Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) a menudo se realiza cuando hay disponibilidad de más de una dosis inseminante. Para este protocolo, después de la inducción de la ovulación, se realiza una inseminación preovulatoria en un tiempo fijo, con la mitad de la dosis, y con la parte restante una vez detectada la ovulación, también a un tiempo fijo (Immonen y Cuervo Arango, 2019). La mayoría de las yeguas ovulan entre las 36 a 42 horas después de la inducción de la ovulación con Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG) o Deslorelina (Kowalczyk et al., 2019). Algunos autores recomiendan la inseminación de las yeguas a las 24 y 40 horas después de la inducción, mientras que otros recomiendan hacerlo a las 36 y 42-44 horas posinducción (Kowalczyk et al., 2019).

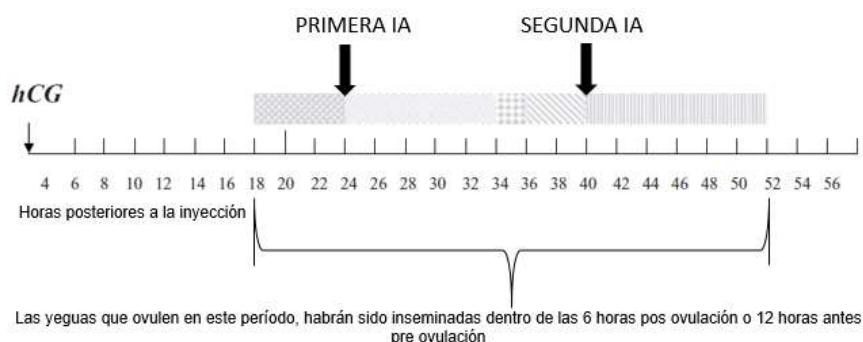


Figura 2. Protocolo de inseminación artificial a tiempo fijo con semen congelado e inducción de la ovulación con Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) (McKinnon et al., 2011).

El protocolo de IATF requiere menos mano de obra, ya que el número de exámenes por yegua se reduce, en comparación con el protocolo de una inseminación única posovulatoria. No se han detectado grandes diferencias en las tasas de preñez entre ambos (Immonen y Cuervo Arango, 2019). Es decir, no hay un incremento en las tasas de preñez por inseminar más de una vez en el mismo estro, en comparación con una única inseminación, siempre y cuando la última o la única inseminación, se haga durante la ventana de tiempo de 12 horas antes y 12 horas después de la ovulación, y la dosis tenga un número adecuado de espermatozoides móviles (Immonen y Cuervo Arango, 2019). A medida que ese intervalo decrece, las tasas de preñez aumentan (Lazcano y Pereyra, 2020).

Luego de diluir, centrifugar, rediluir y empaquetar en pajuelas a temperatura ambiente, el semen se debe refrigerar a 5°C, antes de colocar estas últimas en nitrógeno líquido

(-196°C). Cuando se utiliza para Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides, el semen congelado tiene capacidad de maximización de las dosis. Una vez congelado, este puede ser descongelado y vuelto a congelar a una concentración más baja, ya que es posible poder seccionar una pajuela y solo esa sección ser descongelada para su uso (Gonzalez-Castro et al., 2019; Squires, 2020). Potencialmente de una sola pajuela de 0,5ml, se pueden obtener de 10 a 15 secciones dependiendo del volumen de la pajuela, de la concentración y calidad espermática; las tasas de producción de blastocistos son similares, lo que indica que descongelar y congelar nuevamente el semen para un uso posterior, es viable (Gonzalez-Castro et al., 2019).

Neuhauser et al. (2018) han enunciado que los padrillos son clasificados como "buenos congeladores" si la motilidad espermática después de la descongelación superó el 40%. Sin embargo, solo el 20% de los sementales pertenecen a esta categoría, y la mayoría (60%), han sido clasificados como "regulares" (20-40% de motilidad posterior al descongelamiento) y 20% como "pobres" congeladores (<20 % de motilidad posterior a la descongelación).

A partir de un trabajo realizado por Kowalczyk et al. (2019) sobre la popularidad de la IA en yeguas en Europa, en las siguientes gráficas se puede observar el predominio de la IA con semen refrigerado sobre IA con semen congelado en la mayoría de los años. En los últimos tres años de este estudio (2015, 2016, 2017), este predominio fue más marcado en yeguas deportivas (Figura 3) que en yeguas madres (Figura 4) y particularmente en este último grupo, se puede apreciar el aumento marcado en el uso de semen congelado.

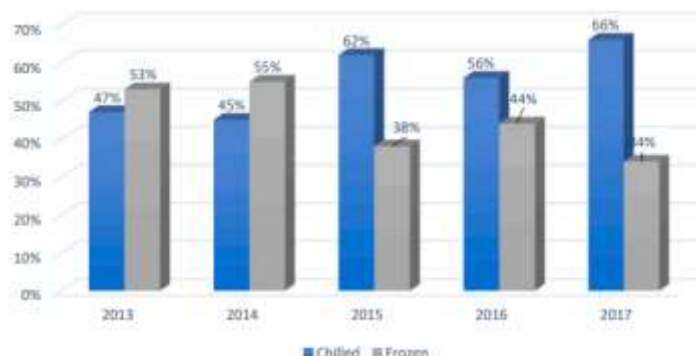


Figura 3. Estructura de la inseminación artificial en yeguas deportivas en Europa, incluyendo la división por tipo de semen (refrigerado o congelado) en base a reportes de centros de inseminación artificial Europeos (Kowalczyk et al., 2019).

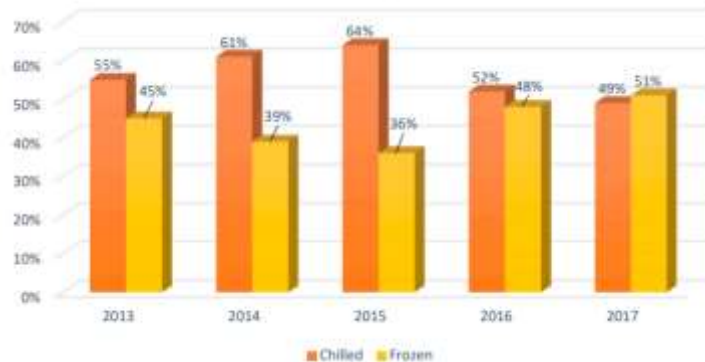


Figura 4. Estructura de la inseminación artificial en yeguas madres en Europa, incluyendo la división por tipo de semen (refrigerado o congelado) en base a reportes de centros de inseminación artificial Europeos (Kowalczyk et al., 2019).

En los últimos 25 años, la implementación del catéter flexible para la IA profunda, la utilización de análogos de GnRH para la inducción de la ovulación, las mejoras en los métodos de concentración y selección espermática, y medios de congelamiento, entre otros, han logrado avances en los programas de inseminación con semen congelado en caballos de deporte (Cazales et al., 2020).

Entre otras cosas, falta conocer con mayor precisión el efecto del PS en el semen congelado, ya que además de todo lo mencionado anteriormente, también se lo ha asociado a una mayor prevalencia de endometritis postservicio (Papin et al., 2021). Esta es una condición fisiológica de las yeguas, donde se produce una inflamación temporal del endometrio como respuesta a la presencia de los espermatozoides. Más allá de las diferencias individuales de las yeguas en su susceptibilidad a presentarla, se ha observado clínicamente una reacción más pronunciada en yeguas sometidas a IA con semen congelado-descongelado (Sabatini et al., 2018).

La congelación de semen equino tiene un gran potencial a pesar de sus falencias y su aplicación va en aumento. Se deben buscar nuevos procedimientos de congelación que permitan mejorar la fertilidad de los padrillos que no responden bien, pero que son de gran valor genético y necesitan de este procedimiento (Al Essawe et al., 2018).

3. 1. 1. 6 Inseminación profunda con dosis baja de espermatozoides

Un elemento innovador de estos últimos años en cuanto al uso del semen equino fresco, refrigerado y congelado, ha sido la implementación de la “Inseminación con dosis baja de espermatozoides”. Varias situaciones promovieron su estudio y posterior aplicación, como contar en ocasiones, con escasas y costosas dosis inseminantes (Cazales et al., 2020). Además, la reducción de la dosis espermática puede ser una alternativa para disminuir la respuesta inflamatoria endometrial posinseminación en yeguas, acelerando el transporte espermático y permitiendo un lavado uterino más temprano, sobre todo en aquellas que son susceptibles a endometritis postservicio (Gómes et al., 2018). Entre otros factores, el uso de un número suficiente de espermatozoides fértiles por dosis inseminante y la ausencia de

una endometritis excesiva, son de importancia crítica para el establecimiento exitoso de una preñez viable (Khöne et al., 2020).

Existen dos métodos para este tipo de inseminación: i) inseminación profunda histeroscópica; ii) inseminación profunda en la punta del cuerno uterino utilizando una pipeta flexible guiada transrectalmente. Estos procedimientos se basan en que si los espermatozoides son depositados más cerca de la unión útero tubárica, la pérdida de los mismos durante el transporte desde el cuerpo uterino al oviducto contralateral se ve minimizada (Larentis y Bastos, 2020). La inseminación con dosis baja en la punta del cuerno guiada transrectalmente, es la técnica de elección en condiciones de campo debido a su simplicidad y bajo costo (Cazales et al., 2020).

En el procedimiento histeroscópico, la insuflación de aire se considera una posible amenaza para la salud uterina. Se la suele implementar cuando el número de espermatozoides es realmente bajo ($1-25 \times 10^6$ espermatozoides) y un volumen aproximado de 1ml (Larentis y Bastos, 2020); no se realiza como un procedimiento estándar. En animales subfértiles, se ha visto que las tasas de preñez incluso se reducen cuando se aplica esta técnica, en comparación con la IA estándar (Khone et al., 2020) y según Gómes et al. (2018) tampoco está demostrada fehacientemente la reducción de la respuesta inflamatoria endometrial.

No existe ninguna ventaja en inseminar en la punta del cuerno cuando se utiliza una dosis de $>400 \times 10^6$ espermatozoides, pero si cuando se aplica una dosis baja de $<50 \times 10^6$ de espermatozoides totales por inseminación, ya que no se ven diferencias en utilizar una u otra dosis, si no que el transporte espermático se acelera debido al sitio de inseminación (Cazales et al., 2020). De acuerdo con Larentis y Bastos (2020), en un estudio se vió que con una dosis de 500×10^6 espermatozoides en el cuerpo del útero, 54% de los espermatozoides alcanzaron el oviducto del ovario ipsilateral a la ovulación, y con una inseminación en la punta del cuerno, lo hizo un 77% (Larentis y Bastos, 2020).

Como conclusión, el transporte espermático y la reacción inflamatoria posinseminación dependen de la dosis inseminante y del tipo de técnica que se utilice. Esto lo demostraron Cazales et al. (2020), afirmando que el número de espermatozoides que logran alcanzar la trompa uterina cuando se implementa la IA profunda con una pipeta flexible guiada transrectalmente, acelera el transporte espermático sin que exista una excesiva reacción inflamatoria, en comparación con la IA en el cuerpo del útero, haciendo de esta técnica una alternativa conveniente para algunas situaciones (Cazales et al., 2020).

De esta forma es posible reducir los costos y conseguir buenos índices de preñez, teniendo en cuenta el elevado valor monetario de las dosis inseminantes de algunos padrillos, los costos de importación y exportación del semen, y la imposibilidad de algunos animales para cubrir la alta demanda de semen fresco. Los dueños de yeguas tratarán de optimizar el dinero invertido en una dosis de semen, sobre todo cuando se trata de semen congelado (Lazcano y Pereyra, 2020).

3. 1. 2 Aspiración folicular “Ovum Pick-Up” (OPU)

3. 1. 2. 1 Evolución y aplicabilidad

La Aspiración Folicular (AF), conocida también en inglés como Ovum Pick-Up (OPU), es una técnica de reproducción asistida que permite obtener ovocitos de yeguas vivas o con pocas horas de muertas (Cortez, Hardwicke, Cuervo-Arango y Grupen, 2022). Desde que la Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) se convirtió en una importante herramienta clínica y de investigación para la producción de embriones, la AF ha ganado gran interés ya que las mismas se usan en combinación (OPU-ICSI) (Hinrichs, 2020; Rodríguez et al., 2016). La producción de embriones equinos por Transferencia Nuclear de Células Somáticas (SCNT), está también condicionada por la disponibilidad de ovocitos. La principal fuente de ovocitos para clonación proviene de ovarios de yeguas de mataderos, pero estos últimos no se encuentran presentes en algunos países o su número es limitado, por lo que la AF es de gran utilidad (Cortez et al., 2022).

La recuperación pobre de embriones de yeguas viejas y subfértiles, fue otro de los motivos para incursionar en esta técnica (Squires, 2020). La OPU comenzó aplicándose en folículos preovulatorios, utilizando diversos procedimientos que incluyeron la laparotomía exploratoria bajo anestesia general o la aspiración a través de la fosa paralumbar con el animal en estación (Baca Castex y Miragaya, 2015). Para mejorar la manipulación del ovario y evitar la cirugía, la misma evolucionó finalmente a la Aspiración por Vía Transvaginal (AFTV) guiada por ecografía. La primera AFTV exitosa en la yegua fue reportada por Brück en el año 1992 y en este momento es la más usada en el mundo (Pérez, 2015; Sansisena, 2020). El procedimiento se basa en la visualización de los folículos ováricos por medio de la ultrasonografía, punción de los mismos con una aguja adaptada a una guía, y aplicación de presión negativa dentro del folículo perforado para aspirar el líquido folicular y finalmente extraer el ovocito (Sansisena, 2020).

Las características histológicas únicas de la pared folicular de la yegua en relación con la unión del Complejo Cúmulo Ovocito (COC) requirieron algunas adaptaciones de las técnicas originales descritas para humanos y ganado en los que los COC se adhieren pobremente a la teca del ovario y la aplicación de vacío es suficiente para su remoción. En la yegua, existe una conexión firme y persistente del COC con la pared tecal. Después de numerosos intentos fracasados, se hizo evidente que la presión negativa por sí sola no era suficiente para la extracción del ovocito equino, pero luego se logró que los folículos fueran colapsados y perfundidos de forma alternada con un medio isotónico. De esta manera, masajeando suavemente el folículo por el recto, repitiendo el ciclo de aspiración/perfusión y raspando la pared folicular con la aguja de aspiración, se logra que el ovocito se desprenda de la pared folicular y resulte en la recuperación (Sansisena, 2020).

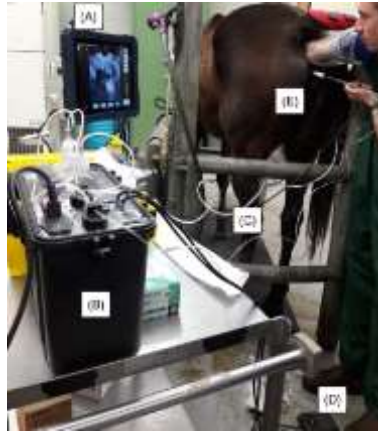


Figura 5. Componentes del sistema OPU: A) equipo de ultrasonido; B) bomba de aspiración; C) líneas de aspiración; D) pedal; E) guía de aguja del transductor (Sansisena, 2020).



Figura 6. Aguja de aspiración insertada en la guía del transductor (Sansisena, 2020).

El perfil de las yeguas donadoras de ovocitos es amplio (Pérez, 2015). Estas pueden ser sometidas a recolecciones repetidas sin graves consecuencias, estando en entrenamiento, lactando, anéstricas, cíclicas, preñadas o siendo yeguas viejas, y es particularmente útil en aquellas con patologías oviductales en las que se debe implementar la técnica de Transferencia Ovocitaria (TO) o la ICSI (Baca Castex y Miragaya, 2015). Existen dos opciones para la recolección: i) aspiración de ovocitos inmaduros de pequeño tamaño que luego se maduran *in vitro*; ii) aspiración del folículo preovulatorio estimulado por gonadotropinas, para recuperar un ovocito maduro de gran tamaño *in vivo*; ambas se realizan en condiciones de sedación y analgesia (Baca Castex y Miragaya, 2015; Sansisena, 2020).

La aspiración del folículo dominante estimulado (FDE) en comparación con los folículos inmaduros, es más sencilla de realizar debido a su gran tamaño y a que el cúmulo se encuentra expandido por los efectos de las gonadotropinas, lo que hace que el ovocito no esté tan adherido a la pared del folículo (Hinrichs, 2018). Los ovocitos

del FDE tienen mayor competencia de desarrollo (habilidad de desarrollar un embrión viable) y presentan una alta tasa de recuperación asociada (>70%) (Bols y Stout, 2018; Hinrichs, 2018). Como contrapartida, se requiere de un monitoreo frecuente del crecimiento folicular y la sincronización con hCG/GnRH. Generalmente hay disponible solo un FDE por cada procedimiento de aspiración, aunque en ocasiones puede haber 2 o 3 (Bols y Stout, 2018).

Una vez aspirados y extraídos de la yegua, los FDE suelen ser más exigentes que los inmaduros en cuanto a su conservación. Teniendo en cuenta que estos están por alcanzar su madurez nuclear, deben ser conservados a temperatura corporal (37°C) hasta ser utilizados, y ser transportados en incubadoras portátiles. Cuando se usa en combinación con ICSI, esta debe llevarse a cabo enseguida a la aspiración por este mismo motivo (Sansisena, 2020). El ovocito metabólicamente activo, necesita de medios de mantenimiento apropiados para mantener su viabilidad (ej: M199) y no para cultivo de embriones, como se usan para ovocitos inmaduros (Hinrichs, 2018).

Si los ovocitos se recuperan de folículos inmaduros, la aspiración se puede realizar aunque la yegua no esté ciclando y se puede extraer un mayor número de ovocitos que con el FDE. Se han descrito tasas de recuperación de entre 50-70% y la tasa de maduración *in vitro* a partir de los mismos es de >65% (Bols y Stout, 2018). Estos se pueden mantener a temperatura ambiente (~22°C) en un medio para mantenimiento de embriones, por un día, sin pérdida de su viabilidad. Cuando la temperatura es demasiado alta (30°C) o excesivamente baja (4-7°C), los ovocitos pierden viabilidad y las tasas de maduración y producción de blastocistos decrecen (Hinrichs, 2018). Los dispositivos para enfriamiento pasivo como el Equitainer® (Hamilton Biovet, MA, USA) u otros contenedores como el EquOocyte® (Hamilton Biovet, MA, USA) son recomendables para su transporte (Hinrichs, 2018).

La aspiración de ovocitos posmortem puede ser la única opción para rescatar la genética de una yegua que muere inesperadamente. En este caso, los ovarios pueden extraerse de la yegua muerta y enviarse al laboratorio donde se procesan. Cuando los ovarios tienen que ser transportados, deben dejarse enfriar lentamente a temperatura ambiente y no menos de ~12°C (Hinrichs, 2018). El período de tiempo entre la muerte de la yegua y la llegada de los ovarios a las instalaciones de procesamiento es crítico para el éxito (Sansisena, 2020). Los mejores resultados son alcanzados si los ovarios se reciben dentro de las 6 horas posteriores a la muerte de la yegua (Hinrichs, 2018).

3. 1. 2. 2 Actualidad

La posibilidad de usar AFTV en laboratorios no especializados, es decir en condiciones de campo, aumentaría la capacidad de los profesionales para resolver problemas de infertilidad en los establecimientos. Esta técnica ha sido poco utilizada en estos lugares, probablemente debido a la falta de profesionales entrenados y a la escasez de datos sobre su eficiencia. Se ha demostrado que repetidas sesiones de AFTV no afectan la actividad ovárica ni comprometen la fertilidad futura de las yeguas (Rodríguez et al., 2020), a pesar de ser un procedimiento más invasivo si se la compara con otras TRA (Claes y Stout, 2022).

Se sabe que la edad materna avanzada afecta negativamente la fertilidad. Esto se ha relacionado principalmente con la reducción de la calidad de los ovocitos más que con

el deterioro de la función uterina (Cuervo-Arango, Claes y Stout, 2019). Con asociación a esto, se han documentado numerosas similitudes en el envejecimiento reproductivo entre la yegua y la mujer. Las diferencias asociadas con la edad en los ovocitos incluyen alteración en la morfología, expresión génica y potencial de desarrollo. La realidad es que se imponen amplias restricciones para la investigación de los gametos y embriones humanos, haciendo que los modelos animales sean importantes para futuros descubrimientos. Las similitudes en la fisiología y el envejecimiento reproductivo pueden hacer que la yegua sea un modelo único y práctico para estudiar el efecto de la maternidad, envejecimiento ovocitario y desarrollo del embrión temprano (Carnevale, Catandi y Fresa, 2020).

La OPU equina se ha convertido en una propuesta viable, como resultado de mejoras significativas en la recuperación del ovocito inmaduro y producción de blastocistos *in vitro* cuando se usa en combinación con ICSI; esta última está demostrando ser competitiva en relación a la Inseminación Artificial y la Transferencia Embrionaria en cuanto a número de embriones generados por unidad de tiempo. Además, OPU-ICSI puede ser utilizada tanto en casos de hembras como también de machos infértiles. OPU está atrayendo un interés creciente de los propietarios de yeguas en competencia debido a su flexibilidad, disponibilidad como tratamiento ambulatorio y falta de requisitos para la manipulación hormonal del ciclo estral (Bols y Stout, 2018).

3. 1. 3 Maduración Ovocitaria (MO)

3. 1. 3. 1 Aplicabilidad

El éxito de la fecundación es dependiente de la presencia de un ovocito maduro en metafase II (MII) con la cromatina íntegra, en sincronía con un citoplasma adecuadamente maduro (Morris, 2018). En la especie equina, las yeguas ovulan una vez completada la primera división meiótica (en MII) y formado el primer cuerpo polar. Aquellos ovocitos que han sido recuperados de folículos inmaduros, no fueron estimulados con gonadotropinas y se encuentran en la etapa de vesícula germinal. Cuando se realiza OPU a partir de estos últimos, los ovocitos recuperados deben someterse a un proceso de Maduración *In Vitro* (MIV) para adquirir competencia tanto nuclear como citoplasmática (Sansisena, 2020). La población de ovocitos recuperados suele ser heterogénea y se ha constatado que requieren tiempos diferentes para su maduración (Abdoon et al., 2018; Galli, Colleoni, Turini, Crotti y Lazzari, 2018). Se han reportado tasas variables de maduración *in vitro* de ovocitos de entre 19% y 88% (Tscharke, Kind, Kelly, Kleeman y Lee, 2020).

Existen dos poblaciones: ovocitos con cúmulo compacto (Cp) y con cúmulo expandido (Ex). Las células del cúmulo juegan un papel crítico durante la maduración. La expresión de sus genes contiene información clave con respecto a los procesos celulares asociados con el desarrollo ovocitario. Los ovocitos Cp, en general tienen menor competencia de desarrollo y requieren más horas para madurar que aquellos con cúmulo expandido (De la Fuente et al., 2022); se ha establecido un rango de tiempos de maduración de ~ 26 a 36 horas (Sansisena, 2020). El líquido folicular (LF) equino proporciona factores autocrinos y paracrinos de la teca, granulosa y células del cúmulo, que reflejan e impactan en la maduración de los ovocitos (Spacek y Carnevale, 2018; Tscharke et al., 2020), por lo que la etapa de la onda folicular en la que se recuperan, influye en su morfología y potencial de desarrollo (Morris, 2018).

Los Cp requieren de una maduración de 30 a 36 horas para alcanzar la MII, mientras que aquellos con cúmulo expandido requieren un período de maduración *in vitro* más corto, de ~24 horas (Morris, 2018). Cuando los folículos preovulatorios son recuperados por OPU después del tratamiento con gonadotropinas, la mayor parte del proceso de maduración ya se ha completado y la duración del cultivo necesaria a veces, para que el ovocito madure antes de ICSI, es de solo ~12 horas con el 91% de los ovocitos alcanzando la metafase II (Morris, 2018). De acuerdo con este mismo autor, se considera que un tiempo de maduración de 30 horas es viable tanto para ovocitos Cp como Ex, lo que elimina la necesidad de diferenciarlos por las células del cúmulo y manipularlos de forma separada.

3. 1. 3. 2 Medios de maduración de ovocitos

Generalmente después de la recolección, los ovocitos inmaduros suelen ser acondicionados en medios de mantenimiento para embriones a temperatura ambiente, seguido por la maduración con incubación con CO₂ (ejemplo 6% CO₂ y 38.2°C) (Campos-Chillón, Owen y Altermatt, 2018). Los ovocitos equinos inmaduros pueden mantenerse viables a 15°C-23°C por hasta dos noches antes de ser sometidos a la MIV (Hinrichs, 2020). La mayoría de los laboratorios comerciales de FIV confían en el envío de ovocitos en medios de maduración que han sido pre equilibrados con CO₂ (bicarbonato alto) o tamponados con HEPES (bajo bicarbonato) (Campos-Chillón et al., 2018).

Los medios más utilizados para la maduración *in vitro* de ovocitos equinos, son el medio de cultivo de tejidos TCM-199 o el medio DMEM/F-12, que generalmente se eligen según las preferencias del laboratorio donde se realiza la maduración (Hernández et al., 2020). Ninguno ha sido desarrollado específicamente para equinos sino para cultivo celular de otras especies, sin embargo, los complejos cúmulo-ovocito de las yeguas, son capaces de madurar en estos medios (Morris, 2018). En un estudio de Hernández et al. (2020), la utilización de DMEM/F12 se asoció con aumentos en las tasas de división y producción de blastocistos, en comparación con el TCM-199. Las concentraciones de glucosa en el líquido folicular de yegua oscilan entre 3,24 y 4,7 mmol/L, con tendencia a niveles más altos durante la fase folicular. La concentración de glucosa en M199 es de 5,5 mmol/L y en DMEM/F12 es de 17,5 mmol/L. Se cree que estas diferencias de concentración durante la maduración, podrían responder al aumento de las tasas por parte de DMEM/F12 (Hernández et al., 2020).

Metabolite	Follicular fluid (mM)	TCM-199 (mM)	DMEM/F-12 (mM)
Acetate	1.5	0.01	-
Acetylcholine	0.07	-	-
Alanine	1.1	0.20	0.05
Aspartate	2.7	0.22	0.05
Carnitine	0.06	-	-
Citrate	0.4	-	-
Creatine	0.36	-	-
Creatine phosphate	0.36	-	-
Choline	0.05	0.005	0.064
Formate	0.05	-	-
Glucose (d-Glucose)	4.3	5.5	17.5
Glucose-1-phosphate	0.9	-	-
Glycerol	3.1	0.67	0.25
Glutamine	0.25	-	-
Histidine	0.05	0.1	0.12
Isoleucine	0.6	0.3	0.41
Lactate	27.3	-	-
Leucine	0.5	0.40	0.45
Pyruvate + Succinate	0.16	-	0.5
Threonine	0.58	0.25	0.45
Valine	0.13	0.35	0.45

Tabla 1. Presencia y concentración de los metabolitos encontrados en el líquido folicular y en los medios TCM-199 y DMEM/F-12 (Hernández et al., 2020).

Entre los metabolitos identificados en el líquido folicular, nueve de ellos no están presentes en TCM-199 o DMEM/F-12. Algunos de ellos son: acetilcarnitina, carnitina, citrato, creatina, histamina y lactato. También ocurre que hay metabolitos presentes en el LF y en TCM-199, pero no en DMEM/F-12 y de igual forma, otros están presentes en el LF y en DMEM/F-12, pero no en TCM-199 (Hernández et al., 2020). La optimización de la composición de estos medios es un proceso continuo. La fuente de proteína comúnmente reportada es el Suero Fetal Bovino (FBS) al 10%. Esta sigue siendo la elegida por su efecto benéfico sobre la competencia meiótica; también se han agregado una variedad de factores de crecimiento, antibióticos y hormonas como la Folículo Estimulante (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH). Los estrógenos y la prolactina se han utilizado históricamente, pero no aparecen en los protocolos más recientes (Hernández et al., 2020).

Las formulaciones comerciales específicas para los requerimientos del equino se están desarrollando, y aunque de forma lenta, están comenzando a estar disponibles en el mercado (Sansisena, 2020). El laboratorio ivf bioscience ofrece en su sitio web (www.ivfbioscience.com), un medio de maduración de ovocitos específico para equinos. Este es libre de suero, suplementado con hormonas gonadotropicas específicas para equinos y gentamicina. El fabricante ofrece un protocolo para tener conocimiento del correcto uso del medio de maduración, y según información brindada por el laboratorio, el costo del mismo es de 75 US\$ (frasco de 10 ml).

3. 1. 3. 3 Criopreservación de ovocitos

En caso de extraer los ovocitos y optar por madurarlos en otro momento, estos pueden ser congelados. Sorprendentemente, mientras esta técnica es común y eficaz en los espermatozoides, en los ovocitos, no lo es. Este gameto ha demostrado ser una de las células más difíciles de criopreservar (Canesin et al., 2018; Clérico et al., 2021; Sansisena, 2020). La congelación de ovocitos aún se considera una técnica experimental debido al bajo éxito que ha tenido (Clérico et al., 2020); no es lo suficientemente eficiente como para que su uso sea recomendado en la práctica de manera comercial (Hinrichs, 2018).

La vitrificación es actualmente el procedimiento de elección para criopreservar ovocitos. Estos deben someterse a velocidades de enfriamiento extremadamente rápidas (Pereira et al., 2020; Sansisena, 2020) y ser expuestos a altas concentraciones de crioprotectores permeables (DMSO, etilenglicol, propanodiol, etc.) y no permeables (sacarosa, trehalosa, galactosa), que reducen el punto de congelación del citoplasma y causan la deshidratación celular (Canesin et al., 2018; Sansisena, 2020). Aunque los ovocitos vitrificados y calentados son capaces de madurar, el posterior desarrollo embrionario se ve comprometido (Ortiz-Escribano et al., 2017). La existencia de tasas altas de desarrollo embrionario, aún no se han establecido (Hinrichs, 2020). La vitrificación de ovocitos inmaduros, seguida del calentamiento, maduración e ICSI, ha dado como resultado tasas de maduración y producción de embriones del 1% al 15% de blastocistos por ovocito inyectado (Hinrichs, 2018).

3. 3. 3. 5 Actualidad de la MO

La clave para una mayor producción de embriones, es destrabar el potencial de desarrollo que tienen los ovocitos. En general, los principales factores que parecen influir en esto son la edad de la yegua, la etapa de desarrollo del folículo, el almacenamiento de los ovocitos y la adaptación del protocolo de maduración *in vitro* (Morris, 2018). Se ha llegado a la conclusión, de que los enfoques actuales para la maduración *in vitro* de ovocitos equinos, no logran satisfacer completamente las necesidades metabólicas del ovocito. Los medios utilizados para la maduración difieren mucho de las condiciones fisiológicas requeridas para el correcto desarrollo nuclear y citoplasmático, disminuyendo el potencial de desarrollo de los mismos (Hernández et al., 2020). Si bien los protocolos actuales han tenido éxito en términos de la capacidad de generar potros vivos, existe una necesidad urgente de diseñar mejores medios y técnicas de cultivo para satisfacer mejor las demandas del mercado (Hinrichs, 2018).

3. 1. 4 Transferencia Ovocitaria y Transferencia Intrafalopiana de Gametos

Un método alternativo para la producción de potros a partir de ovocitos recuperados de yeguas donantes es la Transferencia Ovocitaria (TO). Es decir, la transferencia de ovocitos maduros a los oviductos de yeguas receptoras previamente inseminadas. En este procedimiento, el ovocito es fertilizado en el oviducto de la yegua receptora (Hinrichs, 2018). Los principales inconvenientes que presenta esta técnica implican la necesidad de realizar cirugía en la yegua receptora para exponer el oviducto; se requiere de una dosis inseminante de buena calidad y si hay múltiples ovocitos disponibles, entonces se debe tomar la decisión de realizar varias cirugías o transferir múltiples ovocitos a los oviductos de una única receptora. La última opción requiere la reducción de vesículas embrionarias o el lavado posterior del útero de la yegua receptora para recuperar embriones. Cuando la TO se realiza utilizando ovocitos de yeguas fértiles, la tasa de preñez es típicamente >70%. Sin embargo, estas son notablemente más bajas cuando el procedimiento se aplica a yeguas con menor fertilidad (Hinrichs, 2018).

Para una Transferencia Ovocitaria exitosa, el ovocito tiene que haber alcanzado la MII. Luego de la TO e inseminación, la yegua receptora debe presentar un cuerpo lúteo funcional, para asegurar el normal desarrollo del embrión. Por lo general, se eligen yeguas receptoras con folículos preovulatorios, el cual es aspirado para remover el ovocito y evitar la concepción, o yeguas en anestro o estro incipiente tratadas con estrógenos antes de la TO por laparotomía exploratoria y posterior tratamiento con progesterona para mantener la gestación (Hinrichs, 2018).

La técnica de Transferencia Intrafalopiana de Gametos, por sus siglas en inglés (GIFT), se conoce como la transferencia no solo de ovocitos en el oviducto, sino también de espermatozoides. Es otra variación de la TO que se utilizó durante mucho tiempo para tratar la infertilidad en mujeres. En caballos, la TO y la GIFT se utilizaron como alternativa para la Transferencia de embriones en yeguas y padrillos con antecedentes de problemas reproductivos. Sin embargo, como en los humanos, con el progreso realizado en la ICSI, tanto la TO como la GIFT ya no se utilizan con asiduidad, aunque esta técnica aún es de interés para la investigación (Benammar et al., 2021). Aunque la aplicación de la TO y la GIFT es eficiente, el desarrollo de ICSI y del cultivo de embriones y su criopreservación, promovieron el interés por la

recolección de ovocitos inmaduros mediante OPU, lo que resultó en un mayor número de embriones producidos por sesión de OPU que la TO (Lazzari et al., 2020).

3. 1. 5 Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI).

3. 1. 5. 1 Evolución y aplicabilidad

Los primeros informes de producción de embriones *in vitro* en caballos por medio de Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), datan de hace poco más de 25 años (Stout, 2020). El primer potro producido mediante ICSI nació en la Universidad de Colorado, EE.UU en 1996 y fue reportado por Squires (Ángel y Bran, 2010). En contraste con el hombre y otras especies de mamíferos, la Fertilización *in vitro* (FIV) convencional con gametos de equino, no logra traspasar los obstáculos que la hacen ineficiente; la incapacidad de los espermatozoides para penetrar la zona pelúcida en condiciones *in vitro*, se cree que es debido a una activación incompleta de los espermatozoides (capacitación) (Squires, 2020), causada por medios de cultivo inadecuados. *In vivo*, el oviducto y sus secreciones proporcionan un microambiente que apoya y regula de forma fiable la interacción entre los gametos (Leemans et al., 2016).

Con la implementación de ICSI, se eluden muchos de los fenómenos básicos requeridos para la fertilización. La ICSI implica realizar en condiciones de laboratorio, la inyección de un espermatozoide viable dentro del citoplasma de un ovocito maduro, sin la necesidad que el espermatozoide se capacite. Las fallas en la superovulación de las yeguas y la FIV convencional, han sido el principal motivo de desarrollo de esta tecnología en la producción equina (Briski y Salamone, 2022).

El hecho de que la recuperación de ovocitos se realice como un procedimiento ambulatorio, durante todo el año y sin manipulación hormonal, lo hace atractivo para los propietarios de equinos en competición (Claes et al., 2016). Después de la recolección de los ovocitos mediante OPU, estos se pueden fertilizar por medio de ICSI, usando semen de buena y mala calidad, incluso con espermatozoides inmóviles, siempre y cuando estos conserven su ADN intacto (Baca Castex y Miragaya, 2015; Lazzari et al., 2020). Esto beneficia a padrillos viejos, con oligospermia, mala calidad seminal, o padrillos que han muerto y hay una cantidad limitada de semen disponible (Claes y Stout, 2022; Squires, 2020).

Los espermatozoides difieren en su capacidad para activar ovocitos, como se pone en evidencia en las variadas tasas de escisión y producción de blastocistos. Aquellos con poca habilidad de activación, pueden resultar en una baja producción de embriones para ser comercialmente factible, como así también si los espermatozoides son de buena calidad, los embriones resultantes pueden lograr altas tasas de preñez luego de transferidos (Baca Castex y Miragaya, 2015; Foss, Ortis y Loncar, 2018).

ICSI es considerablemente útil en yeguas que no responden a los programas convencionales de colecta de embriones a causa de patologías en sus oviductos, útero o cérvix, o aquellas que desarrollan onda folicular pero no logran ovular (*In vitro* clonagem animal, 2022); también se evita la realización de la cirugía que implica la fertilización por TO (Baca Castex y Miragaya, 2015). Sin embargo, ICSI es una técnica reproductiva compleja y costosa. Requiere de equipos de alto costo como

micromanipuladores, microscopios de buena calidad, incubadoras de CO₂ y personal experimentado (Vélez y Hinrichs, 2011). Hasta el momento continúa siendo la única técnica de fertilización *in vitro* exitosa en la especie equina (Lazzari et al., 2020).

La demanda de producción de embriones equinos *in vitro* por ICSI ha aumentado en la última década, pero su eficiencia continúa siendo variable (Carnevale y Metcalf, 2019). El desarrollo y viabilidad del embrión dependen del método ICSI utilizado para la fertilización. Los dos métodos que se utilizan con mayor frecuencia son por medio del uso de aguja convencional o de taladro piezoeléctrico (Salgado, Brom-de-Luna, Resende, Canesin y Hinrichs, 2018). Desafortunadamente, la primera opción puede provocarle daño mecánico al ovocito, causando la deformación de su zona pelúcida. En la década de los 2000, la incorporación del taladro piezoeléctrico o “Piezo Drill”, resultó en un gran incremento de las tasas de activación y división celular. Este dispositivo es un accesorio del sistema de micromanipulación que genera mínimas vibraciones en la aguja de inyección (Carnevale y Metcalf, 2019).

Las principales ventajas que se obtienen realizando la inyección con este accesorio, son una mayor facilidad de penetración de la zona pelúcida, mejor ruptura de la membrana del espermatozoide y menor lesión de la membrana plasmática del ovocito al ser atravesada. Las tasas de división celular con el empleo de dicho instrumento se han elevado al 80-85% (Carnevale y Metcalf, 2019; Salgado et al., 2018), pero su uso no siempre es inocuo y se ha asociado con posibles daños en el ADN. Esto llevó a los investigadores, a explorar un método alternativo que evite el daño de los ovocitos: ICSI asistida por láser. La misma consiste en crear por medio del láser, un orificio en la zona pelúcida previo a la inyección y de esta manera reducir el trauma. Esta técnica no ha sustituido las anteriores (Carnevale y Metcalf, 2019; Smits, Govaere, Hoogewijs, Piepers y Van Soom, 2012).

3. 1. 5. 2 Actualidad

Establecer las técnicas de laboratorio para producir blastocistos equinos *in vitro* es un proceso extremadamente trabajoso, que requiere de mucha preparación y experiencia. Pueden pasar meses o años antes de que un laboratorio alcance tasas de producción de blastocistos comercialmente aceptables. Esto explica por qué todavía hay muy pocos laboratorios en el mundo que produzcan cantidades significativas de embriones por medio de esta técnica (Stout, 2020); se estima que hay 13 instalaciones en todo el mundo que lo realizan (Squires, 2020).

“Avantea” es uno de ellos. Se localiza en Cremona, Italia y se dedica a la reproducción animal e investigación biotecnológica. La actividad del laboratorio comenzó en 1991 con Cesare Galli y Giovanna Lazzari. Es la clínica líder en Europa y en el mundo en OPU-ICSI; cobra por aspiración E\$800 (36.000 pesos uruguayos), E\$500 (22,500 pesos uruguayos) la ICSI y E\$1.000 (45.000 pesos uruguayos) el embrión producido. Además, brinda el servicio de vitrificación a través de su banco de genes cobrando en el entorno de E\$10 (450 pesos uruguayos) por embrión por mes (Avantea, 2022; Hiriart, 2021). También en Marbella, Málaga, se encuentra “Ovohorse” que además de ofrecer el servicio OPU-ICSI, realiza cursos para que los Veterinarios puedan formarse en la técnica de OPU (Ovohorse, 2022).

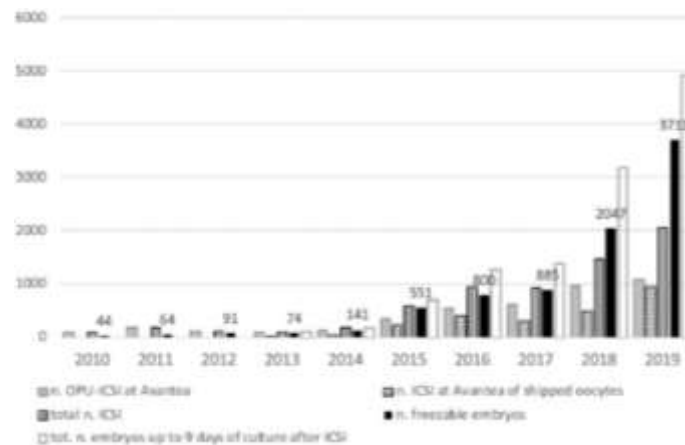


Figura 7. Número de procedimientos OPU-ICSI realizados en Avantea y en clínicas externas; número de embriones obtenidos en los últimos diez años que muestran un aumento progresivo de la aplicación de esta técnica sobre todo desde 2017 a 2019 (Lazzari et al., 2020).

En EE. UU existen cinco laboratorios (Squires, 2020). Equine Medical Services es uno de ellos. Se estableció en Columbia, Missouri en 1986 y ofrece el servicio ICSI por medio de dos opciones. El cliente puede llevar su yegua a las instalaciones de la empresa para el manejo durante todo el proceso de recuperación de ovocitos, o puede realizar la OPU en otra instalación y enviar los ovocitos al laboratorio para ICSI (Equine Medical Services, 2022).

En Argentina, en Octubre de 2018, el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, anunció el nacimiento del primer potrillo nacido por ICSI, “Palenque Brillito”, hijo de un reconocido caballo de polo (Hiriart, 2021). La empresa brasilera, In Vitro Brasil Clonagem Animal SA (Mogi Mirim, SP, Brasil) fundada en 2005, desde entonces se dedica a los trabajos de almacenamiento celular de grandes y pequeños animales, clonaje de bovinos y equinos, además de ICSI (*In vitro* clonagem animal, 2022).

A pesar de los numerosos intentos por establecer métodos para FIV convencional, los resultados no son repetibles e incluso cuando la fertilización es lograda, la eficiencia es pobre (Félix, Turner, Dobbie y Hinrichs, 2022). En este mismo año, se registró la primera Fertilización *in vitro* convencional exitosa en el equino con producción de blastocistos y potros nacidos vivos. Según lo que informaron estos investigadores, estos son los únicos potros que se han producido hasta la fecha a partir de FIV estándar, además de dos potros informados por el laboratorio de Eric Palmer en 1991 y 1992, los cuales fueron originados a partir de ovocitos madurados *in vivo* y transferencia quirúrgica de los embriones directamente al oviducto. Félix et al. (2022), utilizaron ovocitos madurados *in vitro*, recuperados por AFTV y ovocitos recuperados post-mortem.

OPU-ICSI está generando un fuerte impulso en la aplicación de tecnologías embrionarias (Lazzari et al., 2020). En Europa por ejemplo, su uso se ha expandido a yeguas y padrillos reproductivamente sanos de tal forma, que actualmente se la usa como una alternativa de la TE (Squires, 2020). Se logran producir más embriones de animales considerados genéticamente importantes, aumentando así el valor genético

de la población y el nivel de rendimiento deportivo. La posibilidad de producir embriones en cualquier época del año brinda flexibilidad de planificación, especialmente para yeguas que están en competencia, pero también para los programas de cría (Lazzari et al., 2020); las yeguas no tienen que ser inseminadas y no requieren el monitoreo que si tienen las donantes y receptoras (Squires, 2020). Según Lazzari et al. (2020), se puede lograr una producción promedio de 1.7 a 2 embriones por procedimiento OPU-ICSI, que es más de lo que se informó con embriones obtenidos *in vivo*, con una tasa de preñez del 70 % y una tasa de parto superior al 50%; Squires (2020), reportó un promedio de embriones producidos por sesión de OPU entre 0,8 y 1.2, pero puede llegar a ser 3. Por lo tanto, no sorprende que la industria esté respaldando esta tecnología (Lazzari et al., 2020).

3. 2 Técnicas que utilizan embriones

3. 2. 1 Transferencia de Embriones (TE)

3. 1. 1. 1 Evolución y aplicabilidad

La Transferencia de Embriones (TE) es el procedimiento por el cual se colectan uno o más embriones a través de un lavaje uterino transcervical de una yegua donante inseminada o servida por monta natural, y se transfiere uno de ellos, al útero de una yegua receptora previamente sincronizada (Torres, 2017). Lo que comenzó en los años 1970 en Inglaterra y Japón, como un método novedoso para producir potrillos de hembras en edad no reproductiva, se convirtió luego en un procedimiento de elección aplicable a todas las yeguas (Allen y Wilsher, 2020).

En los inicios, la recuperación de embriones o “flushings” se realizaban únicamente en el cuerno ipsilateral a la ovulación, pero teniendo en cuenta que desde el día 6 al 16 el embrión puede movilizarse, posteriormente se procedió a lavar todo el útero y las tasas de recuperación de embriones aumentaron notablemente. A su vez, en un principio la transferencia de los embriones a las receptoras se realizaba de forma quirúrgica por medio de laparoscopia. Esto después se modificó, y la misma comenzó a efectuarse de manera no quirúrgica a través del cérvix (Allen y Wilsher, 2020).

Los primeros intentos de esta última no fueron exitosos y se lo asoció a una excesiva manipulación del cérvix y útero, y subsecuente contaminación y/o liberación de factores de la inflamación como prostaglandinas (Cuervo-Arango, Claes y Stout, 2018). Sin embargo, la técnica se fue perfeccionando y desde ese entonces ha ganado gran popularidad alcanzando tasas de preñez de entre 75-90% (Allen y Wilsher, 2020).

En el año 2004, se implementó la técnica de Wilsher, que consiste en la TE por medio de la utilización de un espéculo vaginal y una pinza cervical llamada “Pinza de Wilsher”, para facilitar el ingreso de la pistola de transferencia a través del cérvix, con mínima manipulación y sin contactar el instrumental con la vagina de la yegua (Lossino y Pietrani, 2018).

En un estudio hecho por Cuervo Arango et al. (2018), se comparó las tasas de preñez obtenidas mediante transferencia convencional y transferencia con pinza de Wilsher, observándose en promedio una tasa de preñez mayor con esta última (92,3% vs 70,9%). Dos operarios con gran experiencia en TE con el método convencional

obtuvieron tasas de preñez de 78.8% y 79.7% respectivamente versus tres operarios con poca o ninguna experiencia con el método de Wilsher, que obtuvieron 93.4%, 91.2% y 90.9% de preñez respectivamente (Lossino y Pietrani, 2018).

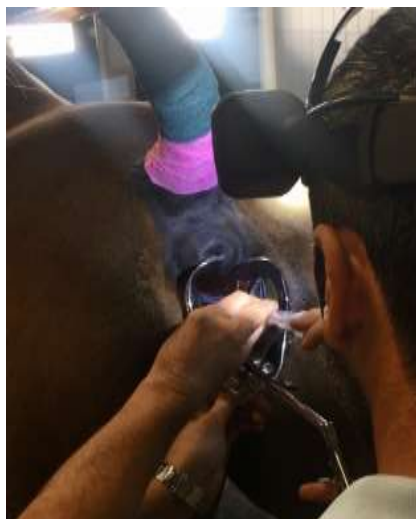


Figura 8. TE con método de Wilsher, donde se ve un ayudante sosteniendo el espéculo y la pinza de Wilsher mientras el operador introduce la pistola de transferencia (Cuervo Arango et al., 2018).

La TE hoy en día brinda la posibilidad de poder generar potrillos de madres que se encuentran en competencia, entrenamiento, o yeguas subfértiles que no pueden llevar una preñez a término. También permite obtener muchas crías de una misma madre en un mismo año (Oliveira Neto et al., 2018; Silva Rua, Quirino, Christo, Rodriguez y Barreto, 2018). A pesar de estas ventajas, una limitación todavía existente es el bajo porcentaje relativo de recuperación de embriones de las donantes tratadas con gonadotropinas, a las cuales, a diferencia de las hembras bovinas, no se les ha podido estimular la superovulación de forma eficiente (Allen y Wilsher, 2020).

Algunos de los compuestos exógenos utilizados para inducir la ovulación son: i) hormona liberadora de gonadotropina nativa (GnRH); ii) agonistas de GnRH (buserelina, deslorelina); iii) Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG) y iv) prostaglandinas. Su administración presenta ciertas desventajas como la necesidad de aplicar múltiples inyecciones, implantes y la existencia de folículos de más de 20-25 mm de diámetro para su acción con el uso de algunas de ellas. Sin embargo, para estimular la superovulación no hay fármacos disponibles en el mercado (Mutto et al., 2021).

Se han descrito por ejemplo en yeguas Warmblood, ovulaciones dobles o triples con una probabilidad del entorno al 15%, pero lo típico es que la yegua ovule solo un folículo por ciclo (Allen y Wilsher, 2020; Sieme et al., 2018). Esto es debido a la dureza de la túnica albugínea ovariana, que fuerza la ovulación a través de la fosa de ovulación, donde la túnica no está presente. La fosa se encuentra situada ventromedial al ovario y múltiples folículos compiten entre sí, pero se luteinizan antes de que puedan ovular, con excepción del folículo preovulatorio dominante que ovulará 12-24 horas antes de que finalice el estro (Allen y Wilsher, 2020).



Figura 9. Ovario de yegua seccionado, donde se puede ver la ubicación del folículo preovulatorio adyacente a la fosa de ovulación por donde ovulará (Allen y Wilsher, 2020).

La estimulación hormonal de más de dos o tres folículos, no resulta en un aumento de las tasas de recuperación debido a que estos se aglutinan en la fosa, y por ende carecen de espacio para poder ovular. Es por esto que el éxito de la superovulación es eficiente si se logran ovulaciones dobles (Bertoldi, Segabinazzi, de Paula Freitas, Dell'Aqua y Alvarenga, 2018; Sieme et al., 2018).

Aunque todavía no existe una hormona folículo estimulante disponible comercialmente para inducir la superovulación en yeguas, hay numerosos reportes de incrementos en las tasas de recuperación embrionaria con la administración de extracto de pituitaria equina rica en FSH o FSH recombinante (Squires, 2020). Se ha demostrado que tanto la FSH recombinante equina (reFSH) como la LH recombinante equina (reLH), son de gran ayuda para inducir múltiples ovulaciones en yeguas cíclicas, en anestro profundo, fértiles o subfértiles (Roser y Meyers-Brown, 2019). A partir de un estudio realizado por Mutto et al. (2021) para evaluar la efectividad de reFSH, estos concluyeron que su uso en yeguas en anestro profundo da como resultado el desarrollo folicular, la ovulación de ovocitos fértiles y la producción de embriones que logran establecer preñeces viables después de la transferencia. La reFSH permite simplificar el tratamiento por medio de la administración de una monodosis y podría estar disponible comercialmente en un futuro (Mutto et al., 2021).

Sólo puede esperarse una tasa de recogida de embriones satisfactoria en yeguas sanas sin problemas reproductivos en su historial. Las tasas bajan drásticamente si la yegua tiene más de 13-15 años, momento en que empieza a disminuir la fertilidad y la calidad embrionaria (Lossino y Pietrani, 2018; Sieme et al., 2018; Torres, 2017). En yeguas jóvenes reproductivamente sanas e inseminadas con semen de buena calidad, las tasas de recolección de embriones alcanzan el 70-75%, mientras que solo el 20-30% de los intentos de recolección son exitosos en yeguas que han tenido problemas (Nieto Olmedo et al., 2020; Sieme et al., 2018).

Lossino y Pietrani (2018), expusieron tasas de recuperación de embriones del 31% para yeguas subfértiles. Además, manifestaron que estas producen una alta proporción de embriones anormales (Lossino y Pietrani, 2018; Sieme et al., 2018). La variabilidad entre las tasas se debe, entre otras cosas, al tipo de semen utilizado, a su calidad y dosis, la edad y estado reproductivo de la donante, el día posovulación en el que se realice el lavado uterino, el número de ovulaciones, la técnica de lavaje utilizada y el entrenamiento del operador (Lossino y Pietrani, 2018).

El blastocisto equino es robusto y relativamente poco demandante en cuanto a sus requerimientos. Se lo puede recolectar sin grandes dificultades y logra sobrevivir si es transferido correctamente (Allen y Wilsher, 2020). La calidad del embrión a transferir tiene una influencia muy significativa en las tasas de preñez y de pérdidas embrionarias tempranas. La mayoría de los embriones colectados son clasificados en distintos grados para estimar las chances de éxito postransferencia (Sieme et al., 2018).

Generalmente los embriones llegan al útero luego del transporte a través del oviducto al día 5,5-6 posovulación (PO). Es por esto que la recolección se suele realizar entre los días 6,5 y 9 (Sieme et al., 2018). Los intentos para recuperar los embriones en el día 6 resultan en tasas de recuperación más bajas comparadas con las de día 7, 8 o 9. Los embriones de día 10 son más difíciles de manejar y requieren de entrenamiento y materiales apropiados, de lo contrario resultan en menores tasas de éxito. Teniendo en cuenta esto, el día de preferencia de recuperación de embriones es el día 7 PO. El día 8 es la segunda alternativa. También hay que considerar que en las yeguas viejas y/o inseminadas con semen congelado, puede ser recomendable realizar el lavaje el día 9 o 10 PO, debido a que el tiempo de tránsito tubárico puede ser mayor y la tasa de crecimiento del embrión menor (Lossino y Pietrani, 2018).

La incidencia de muerte embrionaria temprana en la preñez sigue siendo una de las principales causas de pérdidas económicas para la industria equina, y hasta la fecha, la disponibilidad de técnicas para su detección ha sido limitada, debido a que no es posible detectar el embrión antes del día 11-12 posovulación con ultrasonografía convencional. En este último tiempo, se ha experimentado el uso de la Ultrasonografía Doppler para detectar preñeces tempranas antes del día 10 (días 7-8 posovulación) y los resultados son esperanzadores (Nieto Olmedo et al., 2020).

Uno de los elementos indispensables para el éxito de la TE, es la sincronicidad de las yeguas donante y receptora para lograr la transferencia del embrión en el momento adecuado. Se han logrado tasas de preñez similares, si la yegua receptora ovula 1 día antes o hasta 5 días después de la yegua donante. La ovulación fuera de este rango de tiempo conduce a una caída dramática en las tasas de preñez. Idealmente, la yegua receptora ovula 24 a 48 horas después de la donante (Sieme et al., 2018).

Las yeguas que se seleccionan como receptoras deberían, en lo posible, ser jóvenes (3-12 años), no ser primerizas, contar con buen estado de salud, poseer buena condición corporal 3/5 (no obesas), tener buena aptitud reproductiva y ser mansas. El resultado de biopsias endometriales también es un factor importante a considerar, teniendo en cuenta que la diferencia en tasas de pérdida embrionaria en yeguas receptoras seleccionadas utilizando este estudio, es significativamente menor (Lossino y Pietrani, 2018). La variabilidad en la duración de los ciclos estrales y especialmente las diferencias en la respuesta a los tratamientos hormonales, dificulta el trabajo con una sola receptora. Es por esto, que el uso de dos o tres yeguas, asegura tener al menos una en sincronía con la donante, y así poder realizar la transferencia (Sieme et al., 2018).

3. 2. 1. 2 Actualidad

En nuestra región, las razas Polo Argentino y Manga Larga Marchador en Brasil, fueron las pioneras en aplicar la técnica de TE en la década de los 90. Se comenzaron a ver resultados positivos rápidamente, apareciendo en forma creciente y exponencial, mayores cantidades de productos nacidos por TE en las principales competencias de polo: los Abiertos de Tortugas, Hurlingham, y Palermo y los torneos más importantes en el exterior: en EE.UU la Gold Cup, y en UK la Queen's Cup, como en los principales torneos de España, Francia y Dubai, donde usualmente son premiados los caballos raza Polo Argentino que allí juegan. En el 2020 el 91% de los animales en competencia eran productos de TE (Ballester, 2021).

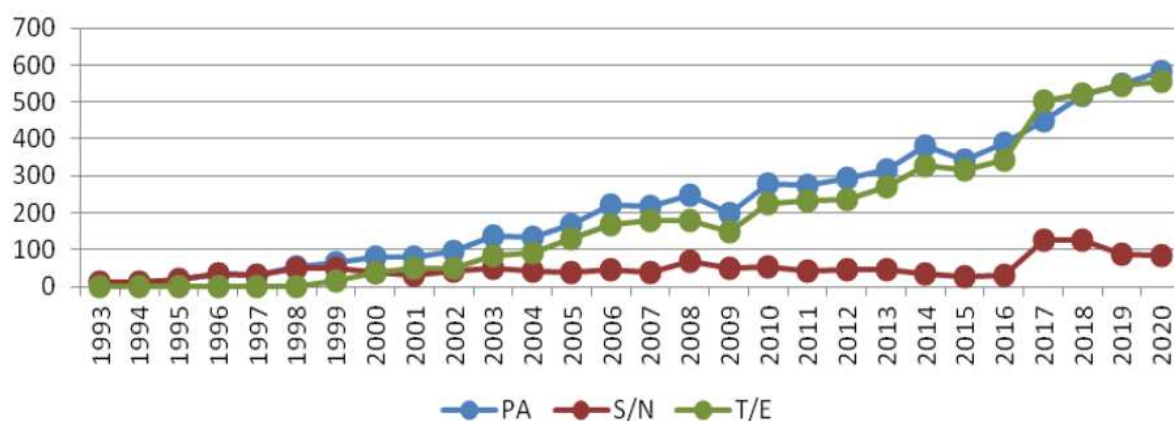


Figura 10. Evolución de los productos raza Polo Argentino en el Abierto de Polo Argentino desde 1993 hasta 2020; aumento de caballos nacidos por servicio natural (S/N) y por Transferencia Embrionaria (T/E) (Ballester, 2021).

Actualmente Brasil y Argentina son los países líderes en su aplicación seguidos por EE. UU (Squires, 2020). En un primer comienzo, muchas de las razas requerían que la yegua fuera mayor de 16 años y virgen antes de que se le permitiera realizar la TE y sólo podía ser registrado un potro por año (Squires, 2019). No pasó mucho tiempo antes de que se levantaran estas restricciones, y la técnica empezó a ser utilizada por razones distintas a la infertilidad, incluso hasta en yeguas jóvenes de 2 años. América del Sur también tuvo una gran influencia por parte de la asociación de criadores de caballos Cuarto de Milla que habilitó su uso en el año 2002 y es una de las asociaciones que registran más potros por TE al año (Hinrichs, 2013; Squires, 2020). En nuestro país lo hizo primeramente la raza Criolla en el año 2013.

Según la IETS (International Embryo Technology Society), en su informe anual de Diciembre 2020, se registró un total de 33860 embriones equinos (producidos *in vitro* e *in vivo*) a nivel mundial, de los cuales 24276 fueron generados en Sud América, 7607 en Europa y 1977 en América del Norte. Si se lo compara con el 2019, hubo un aumento de un 13,6% para la producción de embriones equinos producidos *in vivo* y un aumento de un 37,1% para la producción de embriones producidos *in vitro* (IETS, 2020).

A fines de diciembre de 2019 se produjo el brote del virus Covid19 que luego se expandió y declaró como pandemia mundial. No fue solo una importante crisis sanitaria y social, si no que tuvo un gran impacto en la economía. En este escenario, cabría esperarse una depresión en la industria mundial de embriones, como se ha observado anteriormente en países que han experimentado crisis políticas o

económicas. Sin embargo, las cifras de 2020 demuestran lo contrario (IETS, 2020). El número de potros obtenidos por medio de TE viene en aumento sostenido año tras año (Sieme et al., 2018).

En Uruguay se encuentra habilitado por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, el Laboratorio de Reproducción Equina “Equus”. Allí se realiza inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado; producción y transferencia de embriones (tiene la habilitación para la exportación e importación de los mismos), diagnóstico y tratamiento de yeguas y padrillos subfértiles, además de otros servicios. En la temporada 2018/2019 obtuvieron 34 embriones, en la 2019/2020, 2020/2021 y 2021/2022 50, 36 y 54 respectivamente. Cuando comenzaron con la producción en el 2013 en promedio obtenían 10 embriones por temporada. Las razas con las cuales trabajan en mayor medida son la Árabe, Angloárabe, Cuarto de Milla, Criollo, Appaloosa y caballos de Hipismo. Allí también se está incursionando en la maduración ovocitaria (Comunicación personal Nicolás Cazales, 2022).

En programas comerciales de TE es considerada aceptable una eficiencia global igual o superior a 50%, o sea, una tasa de recuperación (TR) por ciclo superior a 70% (con semen fresco/refrigerado) y una tasa de preñez postransferencia (TP) superior a 70%, (Eficiencia= $TR \times TP = 0,7 \times 0,7 = 0,49$) (Lossino y Pietrani, 2018). Considerando esto, promedialmente, el 30% de los ciclos en que se inseminan las donantes y preparan las receptoras (semen, insumos, alimento, tiempo, trabajo) son improductivos y los costos deben ser “absorbidos” por los ciclos productivos de la misma yegua (o por algo o alguien más). Si además se considera una tasa de preñez promedio de 70%, se asume que 30% de los embriones que se recuperan y transfieren a receptoras, no generan una preñez. Las tasas reportadas de pérdidas embrionarias promedio en programas de TE hasta el día 60 son del 10%. Una de cada 10 preñeces que se ven ecográficamente en los chequeos entre día 12-14 y 60, estadísticamente se pierden (Lossino y Pietrani, 2018).

Los programas de TE son realmente complejos. Por este motivo se suele registrar las actividades (datos de los ciclos de cada yegua, inseminaciones, tratamientos, flushings, transferencias, etc.) que se llevan a cabo. Es difícil intentar analizar la eficiencia de un sistema de este tipo, si no se cuenta con datos objetivos, numéricos, y en cambio solo se tiene intuiciones, opiniones, que si bien tienen su importancia relativa, no resultan suficientes como para realizar diagnósticos certeros y sacar conclusiones de posibles fallas y puntos críticos a mejorar (Lossino y Pietrani, 2018).

Afortunadamente hoy existen herramientas tecnológicas que facilitan el ordenamiento y procesamiento de los datos en tiempo real. Toda esta información es de vital importancia para posicionarse en el sistema y determinar los puntos sobre los cuales se debería trabajar para comenzar a mejorar la eficiencia. A pesar de esta última haberse incrementado lentamente desde los años 80, son todavía muy grandes las pérdidas en términos económicos, de tiempo, genética, ciclos de las donantes, semen, expectativas de los clientes, etc. (Lossino y Pietrani, 2018).

Los costos de realizar la técnica se han mantenido relativamente constantes durante los inicios y el desarrollo de la TE. Será interesante ver como en un futuro, la posibilidad de inducir la superovulación de forma eficiente, podría generar un gran cambio a nivel económico. Las nuevas tendencias se inclinan a la mayor producción

y venta de embriones criopreservados entre países o la comercialización de yeguas receptoras en subastas públicas (Squires, 2020). El uso de técnicas de reproducción asistida como la TE, no ha sido asociado hasta el momento con alteraciones significativas en las yeguas o el futuro potro, apoyando el uso de estas herramientas en reproducción equina (Valenzuela et al., 2018).

3. 2. 2 Refrigeración y congelación de embriones

3. 2. 2. 1 Evolución y aplicabilidad

Uno de los descubrimientos más importantes en la TE, fue el comprobar que los embriones pueden ser mantenidos a 5°C por 24 horas, sin pérdida de su viabilidad. El mantenimiento de embriones a temperaturas de refrigeración permite su traslado, reduciendo los problemas asociados con la disponibilidad de receptoras (Sieme et al., 2018). De esta forma, los embriones pueden ser transportados desde el lugar donde se encuentra la yegua donante, a centros donde hay disponibilidad de receptoras sincronizadas, sin tener que hacer la transferencia en el mismo establecimiento (Hinrichs, 2020; Squires, 2019).

Uno de los primeros medios reportados para mantenimiento de embriones equinos, fue el Ham's F-10 gasificado. Con este medio, los embriones transportados en dispositivos de enfriamiento pasivo como el Equitainer®, a 5°C por hasta 24 horas, presentaron tasas de preñez semejantes a las de embriones frescos (Hinrichs, 2020; Sieme et al., 2018). El posterior desarrollo de otros medios, eliminó la necesidad del gas, y estos últimos también alcanzaron tasas de preñez aceptables. Un ejemplo de ellos, es el BotuEmbryo® (Botupharma, 2022); pocos estudios han reportado resultados sobre mantenimiento de embriones a temperaturas que no sean en el entorno a los 5°C (Hinrichs, 2020).

En cuanto a embriones congelados, mientras la yegua donante esté ciclando, estos se pueden recolectar y almacenar a bajas temperaturas para poder ser transferidos cuando sea conveniente (Canesin et al., 2020; Sieme et al., 2018). Esto ha potenciado de sobremana el uso de la TE, ya que los embriones se pueden recolectar fuera de temporada y transferirse tempranamente al siguiente año (Squires y McCue, 2016).

Si se obtiene más de un embrión en una sola colección a raíz de una ovulación múltiple, pero una sola yegua está disponible como receptora, los otros embriones se pueden almacenar (Sieme et al., 2018). Además, la disponibilidad de embriones congelados permite planificar con anticipación la producción de potros, comercializar esa genética a través de subastas y eliminar el riesgo de lesiones que implica el transporte de animales vivos (Lazzari et al., 2020; Squires y McCue, 2016). Para razas en peligro de extinción, la criopreservación de embriones permite el establecimiento de bancos de genes y por ende el mantenimiento de la biodiversidad (Canesin et al., 2020; Sieme et al., 2018).

Para la congelación de embriones equinos ya sea recolectados *in vivo* o producidos *in vitro*, se han implementado dos técnicas: congelación lenta convencional y vitrificación (Canesin et al., 2020). Para la primera, la reducción de la temperatura es más lenta y debe controlarse estrictamente, lo que solo es posible mediante el uso de

equipos de congelación controlada. Es por esto que la vitrificación, al igual que en los ovocitos, se ha vuelto más común en la práctica a campo (Sieme et al., 2018).

Las soluciones de vitrificación contienen concentraciones altas de crioprotectores (glicerol, etilenglicol, entre otros) que permiten una rápida eliminación del agua de las células. Después de la exposición a estas soluciones, el embrión se sumerge en nitrógeno líquido a una velocidad de enfriamiento ultrarrápida. Con esta tecnología, el embrión y los medios que lo rodean, pasan a un estado vítreo donde se evita la formación de cristales de hielo. Los kits de vitrificación están disponibles comercialmente y se pueden realizar protocolos sin un equipo especial (Sieme et al., 2018). Un ejemplo de ellos es el que ofrece la empresa Minitube en su sitio web: (<https://www.minitube.com>), donde se detalla lo que incluye el kit: medio de vitrificación, medio de dilución, placas de cultivo, pajuelas estériles, jeringas con puntas, goblets y varillas para goblets.

Los embriones recolectados *in vivo* <300 μm pueden criopreservarse con éxito mediante congelación lenta o vitrificación, lo que ha dado como resultado tasas de preñez del 45 % al 67 % después del calentamiento y la transferencia (Hinrichs, 2020). Los embriones producidos por ICSI (embriones producidos *in vitro*) en estadio de mórula o blastocistos tempranos (<300 μm de diámetro), también pueden ser criopreservados mediante las dos técnicas, dando como resultado tasas de preñez similares a las de embriones frescos <300 μm (Hinrichs, 2020). El mayor inconveniente para obtener embriones pequeños (<300 μm) *in vivo*, es que los flushings deben realizarse en el día 6 posovulación, pero esto ha resultado en tasas de recuperación embrionaria menores a las de día 7, 8 o 9 (Hinrichs, 2018; Sieme et al., 2018).

La mayoría de los embriones de día 7-8, se encuentran en el estadio de blastocisto expandido, presentan un diámetro de entre 300 μm y 1200 μm y poseen una cápsula glicoproteica que los rodea y es impermeable a los crioprotectores (Herrera, Fanelli, Panzani, Bollwein y Camillo, 2021; Hinrichs, 2020; Sieme et al., 2018). La presencia y correlación del grosor de la cápsula acelular para la congelabilidad, junto con el líquido contenido en la cavidad blastocélica, impide que estos embriones puedan ser criopreservados con éxito utilizando técnicas convencionales de congelación (Hinrichs, 2020; Pérez Marín, Vizuguete, Vazquez-Martínez y Galisteo, 2017; Squires y McCue, 2016); y han resultado en tasas de preñez de 0% a 38% (Díaz et al., 2018).

Muchos autores informaron que el colapso del blastocelo (total o parcial) es imprescindible para la criopreservación de embriones >300 μm (Hinrichs, 2020; Pérez Marín et al., 2017). Para lograr el colapso, los mismos se perforan utilizando una unidad de micromanipulación y una micropipeta. Se aspira el líquido del blastocelo y los embriones se vitrifican inmediatamente (Díaz et al., 2018; Sieme et al., 2018). Este procedimiento tiene como desventaja, que en ocasiones, los embriones producidos *in vivo* deben ser transportados hasta las instalaciones que cuentan con el micromanipulador, y luego nuevamente ser transportados vitrificados/congelados hasta el lugar donde se encuentra la receptora; se han estudiado otras formas para realizar el colapso sin tener que contar con el micromanipulador, pero no han tenido éxito (Squires, 2020).

Varios estudios han reportado un incremento en las Tasas de Preñez Post Vitricación (TPPV) como resultado de este procedimiento. Hasta hace unos años, las TPPV en las yeguas usando embriones >300 µm eran inferiores al 40%, pero luego de la punción de la cápsula y la reducción del líquido del blastocelo, las TPPV aumentaron entre el 60% y 80% (Urías Castro y Boeta, 2020). La eliminación del líquido es crítica para el éxito (Clérico, Rodríguez, Taminelli y Sansisena, 2019; Hinrichs, 2020; Umair y col., 2022) pero a pesar de este descubrimiento, las tasas de preñez no siempre son tan altas (Sansisena, 2020).

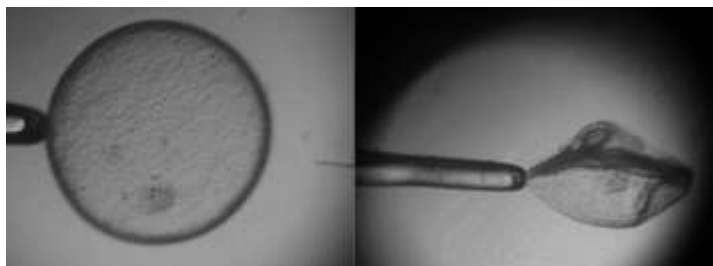


Figura 11. Colapso artificial de un blastocisto expandido (Sansisena, 2020).

La mayoría de los estudios publicados hasta la fecha sobre tasas de preñez de embriones equinos criopreservados han sido en universidades y en base a un pequeño número de transferencias, a diferencia de los datos disponibles para embriones frescos y refrigerados. Además, muchos de los embriones equinos congelados no han sido transferidos y aún permanecen almacenados en nitrógeno líquido (Squires y McCue, 2016).

Los embriones producidos *in vitro*, son tolerantes a la criopreservación y tienen la particularidad de que pueden ser esperados en el laboratorio, hasta que alcancen el tamaño ideal para ser criopreservados con mayor probabilidad de éxito (Squires y McCue, 2016).

3. 2. 2. 2 Actualidad

El alto costo del equipo de micromanipulación, es una limitante para el mayor uso de la vitricación de embriones >300 µm (Sansisena, 2020). Aunque esta tecnología sea relativamente sencilla y rápida, es necesario el desarrollo de un dispositivo que pueda colapsar el blastocelo de forma segura, sin la necesidad de contar con el equipo de micromanipulación y permitir de esa forma, que la vitricación sea más accesible en la práctica veterinaria (Hinrichs, 2018).

En un futuro, la criopreservación de embriones de gran tamaño probablemente hará que las transferencias se vuelvan menos costosas, ya que no será necesaria la sincronización de tantas receptoras, y por otro lado más accesibles, porque la recolección podrá hacerse de forma más tardía (Sieme et al., 2018). Si estos factores, sumado a la ineficiencia en la superovulación de la yegua, pueden ser mejorados y potenciados en los próximos años, la criopreservación de embriones probablemente aumentará de forma exponencial (Squires y McCue, 2016).

3. 3. 3 Exámenes preimplantacionales en embriones

Desde hace muchos años los exámenes para detectar alteraciones genéticas posnatales forman parte de la clínica en muchos países, mientras que las pruebas para embriones, se informaron por primera vez en el año 2010, y desde hace poco se encuentran disponibles como un servicio comercial (Campbell y McNamee, 2020a). Estas pruebas han progresado a un ritmo más lento en comparación con otras especies como la bovina y humana (Herrera, 2016).

Los análisis genéticos preimplantacionales en equinos consisten en la extracción de algunas células del embrión, que luego son analizadas por medio de técnicas de biología molecular como la prueba de PCR (Herrera, 2018). Esto implica recolectar los embriones y hacer biopsias *in vitro* para detectar posibles enfermedades genéticas (Campbell y McNamee, 2020a). La biopsia en el estadio de mórula tardía o blastocisto expandido es un procedimiento bastante complejo, esencialmente debido a la presencia de la cápsula embrionaria, la cual es muy difícil de penetrar con los métodos convencionales de micromanipulación. La implementación de la micropipeta piezoeléctrica, la cual fue mencionada previamente para el colapso del blastocelo, también hizo que la micromanipulación piezo-asistida sea un método valioso para realizar este tipo de exámenes, reduciendo la pérdida de viabilidad de los embriones (Costa-Borges, Sanchez Arbouin, Blanco y Schockemöhle Stud Lewitz, 2018).

Similar a lo que se ha logrado en la selección genómica en bovinos, si la selección de los mejores embriones ocurre antes de la transferencia, los tiempos generacionales se acortan significativamente y los costos de producción de un caballo de élite se reducen. Esto permite la identificación de rasgos no deseados, como también importantes “loci” asociados con características valiosas (Herrera, 2016).

Cuando se trata de esto último, el objetivo es identificar embriones con genes que codifiquen rasgos que los criadores encuentren deseables. Esto incluye la identificación del sexo y genes que codifican el color del pelaje o las marcas blancas. El sexo de los embriones es de interés para aquellos criadores que consideran que un sexo se desempeña mejor que el otro en la disciplina deportiva en que participan (Campbell y McNamee, 2020a). Un ejemplo claro es el polo, en el cual la gran mayoría de los caballos jugando competencias de alto hándicap son hembras (Riera et al., 2019). Los centros de TE que trabajan con este tipo de animales, han sufrido la presión del mercado para producir únicamente hembras. Si bien existieron intentos de trabajar con semen sexado mediante Citometría de Flujo o Nanopartículas magnéticas, estos no fueron exitosos desde el punto de vista comercial o técnico/logístico (Riera, 2021).

La identificación del color del pelaje a menudo se lleva a cabo por razones comerciales, pero en algunas razas existen enfermedades genéticas relacionadas con el color, por lo que las pruebas de color y enfermedad son combinables. Por ejemplo, en el American Paint Horse, se produce una mutación genética de la raza (Lethal White Overo Syndrome), que causa un color de capa blanco completo, piel rosada, y una falta anormal de células ganglionares en el intestino (Campbell y McNamee, 2020a).

Esto da como resultado anomalías graves del tracto intestinal y muerte prematura. Dado que la enfermedad es autosómica recesiva, los animales se ven afectados si heredan dos copias del gen defectuoso. Por lo tanto, las pruebas genéticas tienen el

doble propósito de identificar el color del pelaje e identificar a los animales que portan el gen para evitar cruzarlos (Campbell y McNamee, 2020a).

Los exámenes preimplantacionales solo se pueden utilizar en aquellas razas cuyos libros genealógicos permitan el registro de potros resultantes de la transferencia de embriones u otro tipo de TRA. Solo aquellos embriones que no portan genes anormales, se seleccionan para transferirlos a una yegua y así llevar la preñez a término. La transferencia debe ser inmediata o los embriones pueden ser vitrificados mientras se esperan los resultados del análisis genético (Campbell y McNamee, 2020a).

La aplicación de esta tecnología en caballos presenta algunas limitaciones. A diferencia de la producción de leche o la terneza de la carne en el ganado, el rendimiento atlético en el caballo no se puede medir tan fácilmente y por lo tanto, la correlación entre un cierto perfil de genes y su fenotipo correspondiente, pueden no determinarse con precisión. Para poder correlacionar esto, los rasgos atléticos de miles de individuos y sus crías deberían ser registrados, pero en la mayoría de las razas equinas, este dato se encuentra ausente (Herrera, 2016).

3. 2. 4 Edición Génica (EG) en embriones

3. 2. 4. 1 Evolución y aplicabilidad

Las tecnologías genéticas dentro de la industria equina se volvieron más conocidas desde que se publicó el genoma del caballo en el año 2009 (Campbell y McNamee, 2020a). El principal interés en los caballos genéticamente modificados se centra en la reversión y resistencia a patologías, y la mejora en el rendimiento deportivo (Moro et al., 2020; Suvá et al., 2021); la herramienta de edición génica CRISPR/Cas9 es la más conocida hoy en día para llevar a cabo la edición. Es práctica y económica en comparación con otros sistemas. Permite realizar intervenciones específicas introduciendo o eliminando genes. Este sistema utiliza cadenas guía de ARN para identificar secuencias de ADN predeterminadas, y junto con una Endonucleasa que se une a esta cadena guía de ARN, cortan el ADN en el sitio objetivo (Campbell y McNamee, 2020a).

CRISPR/Cas9 también se puede usar para realizar funciones distintas de cortar o agregar genes, por ejemplo, para activarlos o desactivarlos. Estos refinamientos permiten alterar su expresión en los individuos, sin hacer un cambio hereditario en el genoma (Campbell y McNamee, 2020a). Sin embargo, todavía existe cierta incertidumbre sobre la seguridad en su uso. La secuencia de reconocimiento de CRISPR/Cas9 es tan corta, que hay probabilidades de que el sistema reconozca, enlace y edite secuencias que no son 100% idénticas a la que se desea editar. Estas ediciones indeseadas se conocen como "efectos fuera del objetivo" y son una preocupación en la terapia génica. Si la edición de genes fuera a ser usada para clonar genéticamente a un atleta saludable, también podría representar un riesgo potencial para la salud debido a estos efectos (Tozaki y Hamilton, 2021).

El mosaicismo es otro problema que se puede presentar con el uso de CRISPR/Cas9, pero lo ventajoso de su uso en embriones, a diferencia de los adultos, es que la edición se puede aplicar antes del primer evento de escisión, por lo que es más probable que

la mutación esté presente en todas las células del individuo (Hissey et al., 2021). La edición de un embrión unicelular debería resultar en que todas las células del animal adulto contengan esa edición. Por el contrario, si la edición de genes se lleva a cabo una vez que nace el animal, no todas las células de ese animal contendrán la edición, haciendo que el animal sea “mosaico” (Tozaki y Hamilton, 2021).

Las opiniones sobre el uso de la edición génica en equinos están divididas. Los principales reguladores internacionales de competencias equinas (exceptuando el polo) no permiten la edición génica con fines de corrección de enfermedades o mejora del rendimiento. La Federación Ecuestre Internacional (FEI) es una de ellas, pero si autoriza realizar testeos. En cambio, la Federación Internacional de Autoridades Hípicas (IFHA) prohíbe rotundamente tanto la edición como la realización de exámenes genéticos (Campbell y McNamee, 2020a). Esto está en línea con el deporte humano, donde la Agencia Mundial Antidopaje (AMA), prohíbe el uso de la edición de genes para cualquier propósito. Sin embargo, la aplicación de estas prohibiciones depende de la capacidad de poder detectar la edición, y tal trabajo está en marcha en el dopaje equino (Campbell y McNamee, 2020b).

Algunas asociaciones como la Asociación Mundial del Caballo Árabe (WAHO) y la Asociación Americana de Caballos Cuarto de Milla (AQHA) recomiendan el uso de test genéticos. Esta última, exige el testeo para cinco enfermedades genéticas: parálisis periódica hipercalémica; hipertermia maligna; deficiencia de la enzima ramificadora del glucógeno; desorden hereditario de astenia dérmica regional (HERDA) y miopatía por almacenamiento de polisacáridos. Esta asociación no permite el registro de potros con estas condiciones hereditarias (Campbell y McNamee, 2020a).

En el año 2017 se publicó en Argentina el primer informe de edición genética no terapéutica de embriones equinos, destinado a mejorar el rendimiento en ausencia de lesión o enfermedad (Campbell y McNamee, 2020a). Este trabajo evaluó la posibilidad de eliminar el gen de la miostatina (MSTN), un regulador negativo del desarrollo de la masa muscular, y generar embriones clonados con este genotipo modificado (Vichera et al., 2018). La MSTN ha sido estudiada y editada en diferentes especies de mamíferos, principalmente con el propósito de aumentar la producción de carne en bovinos, caprinos, ovinos y cerdos y para mejorar el rendimiento deportivo en perros. En caballos, se ha demostrado que los niveles de expresión de MSTN influyen en la capacidad de rendimiento, dando caballos más rápidos para distancias más cortas con menor expresión de MSTN (Moro et al., 2020).

Históricamente, la mejora del ganado mediante la cría selectiva fue la principal fuerza de selección en la producción y el bienestar animal. CRISPR/Cas9 permite superar estos límites y mejorar la calidad de vida de los animales (Vichera et al., 2018). La evidencia que existe de la variabilidad genética para sufrir riesgo de fractura y la heredabilidad de las lesiones de los tendones en los caballos, es otro motivo para que la edición genética pueda usarse para reducir la incidencia de lesiones en atletas equinos (Campbell y McNamee, 2020a).

3. 2. 4. 2 Actualidad

El uso de la edición genética va más allá de la corrección de trastornos y por el contrario, tiene como objetivo mejorar los límites fisiológicos más allá de lo 'normal' (Campbell y McNamee, 2020a). Con su relativa facilidad de implementación, el dispositivo CRISPR/Cas9 puede alterar el ADN con mayor eficiencia que otras tecnologías, ya que se evita la producción de organismos genéticamente modificados o sea, aquellos en los que se introdujo material genético de otra especie (transgénesis). Dentro de sus ventajas también se encuentra la capacidad de permitir el rápido desarrollo y prueba de diferentes estrategias farmacológicas, lo que resulta en tiempos de producción más cortos frente a otros métodos de ingeniería genética, para su aplicación no solo en equinos, si no en ganado para producción de alimentos y demás especies domésticas (Singh y Ali, 2021).

Aunque la edición génica ha despertado mucho interés, las preocupaciones éticas se centran en la desigualdad económica entre los propietarios para acceder a esta herramienta; ausencia de consentimiento por parte del animal; oposición al uso de embriones basada en su estatus moral, teniendo en cuenta que la seguridad en la edición de embriones no está totalmente probada. Los efectos indeseados en su salud y bienestar pueden ocurrir y transmitirse a las generaciones futuras (Campbell y McNamee, 2020a).

Según la opinión de Campbell y McNamee (2020b), debido a estos efectos impredecibles, la edición de genes solo se justifica con el propósito de corregir/prevenir enfermedades. A medida que la ciencia se desarrolle y pueda asegurar que no existan estos efectos adversos, la edición genética en caballos para mejorar su rendimiento, podría convertirse en éticamente aceptable, basándose en un análisis de daño: beneficio. Mientras tanto, el bienestar de los atletas equinos debe ser protegido por la regulación internacional (Campbell y McNamee, 2020a).

3. 3 Producción de individuos genéticamente idénticos

3. 3. 1 Clonación por Transferencia Nuclear de Células Somáticas (TNCS)

3. 3. 1. 1 Evolución y aplicabilidad

El primer équido clonado nació en EE.UU en el año 2003. Esta fue una mula llamada “Idaho Gem” resultante de la Transferencia Nuclear de Células Somáticas (TNCS). También en ese año, una potra de nombre “Prometea”, fue producida por el laboratorio del Dr. Cesare Galli en Italia, y resultó de la TNCS a partir de células de la propia yegua que la gestó. Esta potra se creó utilizando ovocitos madurados *in vitro* y posterior cultivo del embrión resultante hasta la etapa de blastocisto, el cual fue transferido a la yegua receptora (Gambini y Maserati, 2018; Hinrichs, 2006). En 2010, el equipo de Daniel Salamone en Argentina produjo el primer potro saludable clonado en América del Sur, un caballo criollo argentino llamado “Ñandubay Bicentenario” y en 2012, Brasil (*In vitro* clonagem animal) reportó el primer clon de un caballo Mangalarga Marchador al cual llamaron “Turbante” (Gambini y Maserati, 2018).

La clonación es el proceso biotecnológico que permite generar un organismo genéticamente idéntico a otro. No existe un único método para llevarla a cabo, pero en el equino, la transferencia nuclear de células somáticas, es el que se utiliza, y al cual se hará referencia (Lossino, 2010). Esta técnica, consiste en fusionar mediante

un pulso eléctrico, la información genética de una célula somática (generalmente estas células son fibroblastos obtenidos a partir de muestras de piel), con un óvulo al que previamente se le extrajo el núcleo y que por ende carece de información genética nuclear. En otras palabras, el ovocito enucleado, incorpora el núcleo de la célula del individuo a clonar (célula donante). Después de la activación, el núcleo adquiere la capacidad de reprogramarse y comenzar a dividirse, generando un embrión que es transferido a una hembra receptora que lo gesta y da origen al clon (Lossino, 2010).

La clonación tiene algo en particular que la hace diferenciarse de las demás técnicas de reproducción asistida, y es que esta tiene como objetivo reproducir un animal existente, mientras que todas las demás TRA se aplican para producir un animal “nuevo” (Campbell, 2018); se apunta a superar las limitaciones que impone la biología por un doble camino: se elimina la incertidumbre de la variabilidad genética (este factor es el que queda por fuera del control en los procesos biológicos de la cría de animales) y se libera de los tiempos biológicos, acortándolos al servicio de la productividad (Córdoba et al., 2019).

La producción de un clon es un servicio por el cual se paga un valor en el entorno a los 100 mil dólares americanos, independientemente del valor que posea el animal del cual se origina el clon. Generalmente se trata de animales que pueden llegar a valer muchísimo más que el propio servicio. No obstante, existe una minoría de clientes con la posibilidad de brindarse un lujo afectivo. Ellos desean perpetuar en un clon, las características de un animal por el cual se tiene cariño, aun cuando ese animal no posea ningún valor en el mercado. El costo de la clonación es el mismo, dado que la técnica ha alcanzado un grado de estandarización suficiente como para ser ofrecida como un servicio, no importando a qué y para qué sea aplicada (Córdoba et al., 2019).

Incluso más que el ganado vacuno, los caballos individualmente pueden tener un valor de mercado extremadamente alto, lo que justifica los costos involucrados en la clonación. Los machos castrados pueden tener mucho éxito en su campaña deportiva, pero no pueden generar descendencia, por lo tanto, los clones pueden reemplazar al original en su carrera como padrillos. Lesiones, enfermedades, muerte, son otras razones para hacerlo. Sin embargo, la TNSC se caracteriza por su baja eficiencia, altas pérdidas de preñez y tasas de muerte fetal más altas de lo normal, lo que la convierte en una técnica costosa y bastante compleja para producir animales (Galli y Lazzari, 2021).

De acuerdo a investigaciones hechas por Gambini y Maserati (2018), la clonación suele presentar tasas de preñez bastante variables que pueden ir desde el 9% hasta el 100%. Estos mismos autores manifestaron, que en ocasiones son necesarias tres a cuatro preñeces para lograr el nacimiento de un clon viable. También agregaron que a partir de información brindada por empresas que producen clones en Argentina, Brasil y Colombia, las mismas obtuvieron tasas de producción de blastocistos de entre 18% a 40%, tasas de preñez de 20% a 40% y tasas de parto de 50% a 95% (Gambini y Maserati, 2018).

En la clonación de mamíferos se detectan con frecuencia problemas de bienestar durante la gestación y las crías recién nacidas, observados con mayor frecuencia en rumiantes y con menor frecuencia en cerdos y caballos. Esta es una de las razones por la cual la técnica se encuentra prohibida en algunos países. Se ha evidenciado,

que esto es causado por alteraciones de naturaleza epigenética asociadas a una reprogramación genómica inadecuada (Galli y Lazzari, 2021). Estas perturbaciones durante el proceso de reprogramación se han descrito como la causa principal de la baja eficiencia, debido a que este fenómeno es necesario para restaurar la totipotencialidad de la célula somática donante (Damasceno Teixeira et al., 2019).

En investigaciones realizadas por Hisey et al. (2021), se determinó que aproximadamente el 50% de los potros nacidos a partir de fibroblastos de animales adultos son potros sanos y normales. El otro 50%, tienden a presentar Síndrome de maladaptación neonatal, remanentes umbilicales agrandados y deformidades angulares de las extremidades (Gambini y Maserati, 2018; Hisey et al., 2021). En el ganado vacuno por ejemplo, la mortalidad perinatal es el doble que en partos normales (Galli y Lazzari, 2021).

Para optimizar la supervivencia de la descendencia derivada de TNCS, se debe prestar especial atención al preparto, parto y periparto tanto de las yeguas como las crías, lo que sin dudas incrementa los costos, teniendo en cuenta sobre todo, lo que implica la terapia de sostén en potrillos. Una vez que han pasado los primeros días o semanas, los animales clonados pueden tener una vida normal, son fértiles, y lo más importante, las anomalías observadas no se transmiten a su descendencia (Galli y Lazzari, 2021).

Entre las especies ganaderas, la equina es la más accesible de clonar a pesar de que producir embriones preimplantacionales es más exigente a consecuencia de la escasez de ovocitos disponibles, en comparación con otras especies. En la preñez, las pérdidas suelen ser bastante tempranas y pasar desapercibidas. El tipo y grado de anomalías que se ven en bovinos, no se reportan en el caballo (Galli y Lazzari, 2021).

Es interesante destacar que las células madre mesenquimales (Msc) son células que han demostrado su multipotencia tanto *in vitro* como *in vivo*. En un estudio realizado por Suvá et al. (2021) se evaluó la eficacia de Msc derivadas de médula ósea (MO-Msc) como donantes de núcleo y se comparó el desarrollo *in vivo* y la presencia de anomalías anatómicas de los nacidos, respecto a clones generados con fibroblastos adultos (FA). Como grupo control, se utilizaron preñeces generadas por inseminación artificial y posterior TE. Este estudio demostró que las Mo-Msc pueden ser utilizadas de forma eficiente y que los animales obtenidos son tan sanos como los producidos por IA, ya que se minimizan las anomalías relacionadas con alteraciones en la reprogramación nuclear (Suvá et al., 2021).

3. 3. 1. 2 Actualidad

La clonación de caballos está comercialmente disponible en América del Norte (EE. UU.), América del Sur (Argentina, Brasil y Colombia), Europa (Italia) y Oceanía (Australia). Un número mínimo estimado de 375 caballos han sido clonados en todo el mundo (Gambini y Maserati, 2018). La producción estimada de caballos clonados por país hasta el año 2016 es la siguiente: EE.UU (220), Argentina (126), Brasil (15), Italia (20), Colombia (1) y Corea del Sur (1). El número total real de clones de caballos podría ser superior, teniendo en cuenta que los nacimientos de algunos equinos

clonados no han sido anunciados por empresas privadas y que el registro presentado es hasta el año 2016 (Gambini y Maserati, 2018).

La aplicación de la clonación, al igual que el resto de las técnicas de reproducción asistida, no están permitidas por los “stud book” internacionales que registran caballos Pura Sangre de Carrera. La asociación de criadores de caballos Cuarto de Milla de Estados Unidos, es otro ejemplo de asociación que no permite el registro de clones. En contraste, la AACCP (Asociación Argentina de Criadores de Caballos de Polo) si lo permite. Es más, promueve la investigación y aplicación de la IA, TE y cualquier otra biotecnología para mejorar la crianza (Gambini y Maserati, 2018).

Es interesante hacer notar que Argentina se ha transformado en uno de los países que produce el mayor número de clones equinos, los que se han destacado principalmente jugando en el Campeonato Argentino Abierto de Polo en Buenos Aires (Gambini y Maserati, 2018). Recientemente, la FEI (Federación Ecuestre Internacional), reconoció que la clonación no afecta el “fair play” y autorizó la participación de clones y su descendencia en competencias oficiales (Gambini y Maserati, 2018); En el Uruguay no se han reportado casos de clonación equina.

Las nuevas investigaciones se orientan al estudio de la TNCS heteroespecífica, la cual consiste en utilizar especies filogenéticamente relacionadas (intragénero) o distantes (intergénero); se ha experimentado en numerosas especies de mamíferos, incluidos aquellos en peligro de extinción, exhibiendo resultados variables (Gambini et al., 2020). Gambini et al. (2020) demostraron por primera vez que el ovocito del caballo doméstico soporta el desarrollo *in vitro* de embriones de cebra hasta la etapa de blastocisto. A partir de lo que reportaron estos últimos autores, las células de los caballos domésticos podrían servir para su futura aplicación en programas de conservación de équidos salvajes.

Entre los seres humanos se percibe una gran ambigüedad en considerar la clonación como un procedimiento ético. Para algunos individuos, la clonación de caballos y otras especies no es ética porque va más allá de los límites en los que el hombre debe interferir con la naturaleza y la consideran moralmente inaceptable. En cambio, otros la apoyan (Campbell, 2018). La mayoría de las TRA “exceden” la naturaleza, pero el público parece solo realmente objetar la clonación. La IA, TE, y la FIV no inspiran una respuesta visceral similar. Se piensa que esto se debe a que aunque el concepto de naturalidad deja muchas preguntas para ser respondidas, es sin duda, contradicha por el carácter asexual de la reproducción por clonación (Campbell, 2018).

A pesar de toda la problemática sobre la ética, la clonación de caballos es la mejor tecnología disponible para conservar la genética individual de animales deportivos excepcionalmente dotados. En general, parece que la legislación y la sociedad siguen el ritmo de la tecnología de la clonación equina y continúa su avance con aceptación mundial lenta pero constante de animales clonados en el deporte (Campbell, 2018).

La TNCS es una técnica costosa debido a la baja eficiencia asociada a los problemas de bienestar y la producción *in vitro*, pero ofrece soluciones únicas para la conservación de especies. Se necesita más investigación para entender cómo funciona la reprogramación celular. Desentrañar sus mecanismos, resolvería gran

parte de los problemas y generaría un uso más extendido de la técnica (Galli y Lazzari, 2021)

4. CONCLUSIÓN

Las TRA se han introducido en la producción equina de forma notable en las últimas décadas. Su aceptación por parte de los criadores, propietarios y diferentes autoridades como las asociaciones de razas, se ve condicionada por los resultados obtenidos, las necesidades del momento y los costos; aún se sigue debatiendo sobre cómo las TRA influyen en el mercado ecuestre. Algunos criadores consideran que el uso indiscriminado de las TRA en caballos con poco valor genético, aumenta la oferta en el mercado causando la baja en los precios, mientras que otros ven ventajas en su aplicación y consideran que estas no son las causantes del aumento o disminución de los valores de los caballos. Teniendo en cuenta la importancia de la raza Pura Sangre Inglés en nuestro país y a nivel mundial, si sus autoridades permitieran su implementación, el uso de estas biotecnologías sería considerablemente mayor. El desarrollo de las TRA ha permitido mitigar muchos de los problemas de subfertilidad existentes, además de haber potenciado la cría y la investigación, y cada vez son más las asociaciones de criadores que aceptan y hacen uso de las mismas. Uruguay tiene grandes oportunidades a su alcance. Para empezar, se ubica geográficamente contiguo a dos de los países mundialmente más reconocidos por aplicar biotecnologías equinas como lo son Argentina y Brasil. Esto le permite a los Veterinarios poder formarse cerca del país y estar a la vanguardia de las tecnologías más modernas, para luego en la medida de lo posible poder aplicarlas. Además, nuestro país ha demostrado tener excelentes recursos humanos y equinos atletas que han logrado resultados competitivos del más alto nivel. Estos logros lo han catapultado como un país con gran prestigio en la industria equina mundial y le ha abierto las puertas para poder comercializar sus caballos a innumerables mercados. Esto indica que la industria continuará su desarrollo, y aunque de forma más lenta que otros países, acompañará la aplicación de las tecnologías más avanzadas. Finalmente, el debate sobre la ética debería ponerse siempre sobre la mesa, ya que es difícil discernir hasta qué punto el hombre puede decidir sobre la vida animal y con qué derecho lo hace sobre el resto de los individuos que no comparten ciertas convicciones como la de llevar a cabo la clonación.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abdoon, A. S., Fathalla, S I., Shawky, S. M., Kandil, O. M., Kishta, A. A., y Masoud, S. W. (2018). In Vitro Maturation and Fertilization of Donkey Oocytes. *Journal of Equine Veterinary Science*, 65, 118-122. doi:10.1016/j.jevs.2018.04.007
- Al-Essawe, E. M., Johannisson, A., Wulf, M., Aurich, C., y Morrell, J. M. (2018). Improved cryosurvival of stallion spermatozoa after colloid centrifugation is independent of the addition of seminal plasma. *Criobiology*, 81, 145-152. doi:10.1016/j.cryobiol.2018.01.00
- Allen, W. R. T., y Wilsher, S. (2020). Historical Aspects of Equine Embryo Transfer. *Journal of Equine Veterinary Science*, 89, 102987. doi:10.1016/j.jevs.2020.102987
- Álvarez, C. (2020). *Nuevas estrategias para mejorar la calidad espermática en la criopreservación de la especie equina* (Tesis doctoral), Universidad de Zaragoza.
- Andrlová, P., Mrácková, M., y Sedlinská, M. (2020). Cryopreservation of stallion spermatozoa with different glycerol concentrations. *Journal of Equine Veterinary Science*, 89, 103045. doi:10.1016/j.jevs.2020.103045
- Ángel, D., y Bran, J. A. (2010). Reproducción asistida en equinos: aportes desde la teoría. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 5(1), 56-69. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321428103005>.
- Ares, A. (2019). *Importancia y beneficios de la terapia asistida con animales, y estudio comparativo de la equinoterapia en las islas de Ibiza y Mallorca* (Trabajo final de grado), Universidad Biliarica, Palma.
- Avantea. (2022). *Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides*. Recuperado de <https://www.avantea.it/en/>
- Ayuso-Hernando, M., Gutierrez-Cepeda, L., Villalva, M., y Serres, C. (2011). Aumento de la fertilidad mediante técnicas de procesamiento avanzado de semen: caso

- clínico. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 5(2), 36-48. doi: 10.5209/rev_RCCV.2011.v5.n2.37331
- Baca Castex, C., y Miragaya, M. (2015). Biotecnologías reproductivas en equinos. *Spermova*, 5(2), 189-198. doi:10.18548/aspe/0002.38
- Ballester, S. (2021). Impacto de la Biotecnología de los caballos de polo. En *IV Jornadas de Biotecnologías Reproductivas en Equinos SATE*. Buenos Aires. Recuperado de https://www.sateweb.org/_files/ugd/8f7fa6_bab4100fc6d54ff893eac776742db96a.pdf
- Battut, I. B., y Rousseau, C. (2018). Sperm Motility and Mitochondrial Activity can be maintained for 24 h at room temperature in INRA96® Extender. *Journal of Equine Veterinary Science*, 66, 47-49. doi:10.1016/j.jevs.2018.05.023
- Bazzano, M., Fanelli, D., Scollo, C., Maineti, C., Laus, F., Rota, A., y Camillo, F. (2022). Temperature-processing effect on equine semen cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 113, 103965. doi:10.1016/j.jevs.2022.103965
- Benammar, A., Derisoud, E., Vialard, F., Palmer, E., Ayoubi, J. M., Poulain, M., y Chavatte-Palmer, P. (2021). The mare: a pertinent model for human assisted reproductive technologies?. *Animals*, 11(8), 2304. doi:10.3390/ani11082304
- Bertoldi, A., Segabinazzi, L. G., de Paula Freitas Dell'Aqua, C., Dell'Aqua, J. A., y Alvarenga, M. A. (2018). Association Of Deslorelin And Sulpiride For Double Ovulations Induction In Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*. doi:10.1016/j.jevs.2018.07.002
- Bols, P. E., y Stout, A. E. (2018). Transvaginal Ultrasound-Guided oocyte retrieval (OPU: Ovum Pick-Up) in cows and mares. *Animal Biotechnology*, 1, 209-233 doi:10.1007/978-3-319-92327-7_10
- Botupharma. (s.f). *Reproducción en equinos*. Recuperado de <https://botupharma.com/home/>
- Bradecamp, E. A. (2021). Packing Semen for Cooled Transport. En J. Dascanio y P. McCue, *Equine Reproductive Procedures*. Hoboken: Wiley doi:10.1002/9781119556015.ch146.
- Brass, K. (2001). Inseminación Artificial en la especie Equina. En G. A. Palma, *Biotecnología de la reproducción* (pp.525- 562). Buenos Aires: Hemisferio Sur.
- Briski, O., y Salamone, D. F. (2022). Past, present and future of ICSI in livestock species. *Animal Reproduction Science*, 106925. doi:10.1016/j.anireprosci.2022.106925
- Campbell, M. L. (2018). Is cloning horses ethical? *Equine Veterinary Education*, 30(5), 268-273. doi:10.1111/eve.12566

- Campbell, M. L., y McNamee, M. J. (2020a). Ethics, Genetic Technologies and Equine sports: The prospect of regulation of a modified therapeutic use exemption policy. *Sports, Ethics and Philosophy*, 15(2), 227-250. doi:10.1080/17511321.2020.1737204
- Campbell, M. L., y McNamee, M. J. (2020b). Is genetic editing of equine embryos ethical? *Journal of Equine Veterinary Science*, 89, 103064. doi:10.1016/j.jevs.2020.103064
- Campos-Chillon, L. F., Owen, C. M., y Altermatt, J. L. (2018). Equine Oocyte Maturation in a Novel Medium Without CO₂ Gas Phase. *Journal of Equine Veterinary Science*, 66. doi:10.1016/j.jevs.2018.05.080
- Canesin, H. S., Brom-de-Luna, J. G., Choi, Y. H., Pereira, A. M., Macedo, G. G., y Hinrichs, K. (2018). Vitrification of germinal-vesicle stage equine oocytes: Effect of cryoprotectant exposure time on in-vitro embryo production. *Cryobiology*, 81, 185–191. doi:10.1016/j.cryobiol.2018.01.00
- Canesin, H. S., Ortiz, I., Rocha Filho, A. N., Salgado, R. M., Brom-de-Luna, J. G., y Hinrichs, K. (2020). Effect of warming method on embryo quality in a simplified equine embryo vitrification system. *Theriogenology*, 151, 151–158. doi:10.1016/j.theriogenology.2020.04.026
- Carnevale, E. M., Catandi, G. D., y Fresa, K. (2020). Equine Aging and the Oocyte: A potential model for reproductive aging in women. *Journal of Equine Veterinary Science*, 89, 103022. doi:10.1016/j.jevs.2020.103022
- Carnevale, E. M., y Metcalf, E. S. (2019). Morphology, developmental stages and quality parameters of in vitro-produced equine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(12), 1758–1770. doi:10.1071/RD19257
- Cazales, N. (2017). Biotecnologías aplicadas a la reproducción equina en Uruguay. *Opción Veterinaria*, 2(6), 24-27.
- Cazales, N., Estradé, M. J., y Costa, R. (2020). Inseminación artificial con semen congelado equino: reacción inflamatoria, transporte espermático y técnica de inseminación. *Veterinaria (Montevideo)*, 56(214) e20205621402. doi:10.29155/VET.56.214.2
- Claes, A., Galli, C., Colleoni, S., Necchi, D., Lazzari, G., Deelen, C., ... Stout, T. A. (2016). Factors influencing oocyte recovery and in-vitro production of equine embryos in a commercial OPU/ICSI program. *Journal of Equine Veterinary Science*, 41, 68-69. doi:10.1016/j.jevs.2016.04.055
- Claes, A., y Stout, T. A. (2022). Success rate in a clinical equine in vitro embryo production program. *Theriogenology*, 187, 215-218. doi:10.1016/j.theriogenology.2022.04.019
- Clérico, G., Rodríguez, M. B., Taminelli, G., y Sansisena, M. (2019). Establecimiento de preñeces equinas mediante colapso y vitrificación de blastocistos

- expandidos (>900 µm) con un sistema novedoso de punción con microaguja en micropocillos. *Investigación, ciencia y universidad (ICU)*, 3(4), 56.
- Clérico, G., Taminelli, G., Veronesi, J. C., Polola, J., Pagura, N., Pinto, C. R., y Sansinena, M. (2020). Melatonin improves ICSI embryo production and results in pregnancy from vitrified/warmed equine oocytes. *Journal of Equine Veterinary Science*, 89, 103029. doi:10.1016/j.jevs.2020.103029
- Clérico, G., Taminelli, G., Veronesi, J. C., Polola, J., Pagura, N., Pinto, C. R., y Sansinena, M. (2021). Avances en criopreservación de ovocitos equinos: nacen en Argentina los primeros potrillos a partir de ICSI de ovocitos vitrificados. En *IV Jornadas de Biotecnologías Reproductivas en Equinos*, Buenos Aires.
- Córdoba, M. S., Buccellato, M., Bilański, G., Smal, C., Guzzo, D., y Azcurra, K. (2019). Sobre mercancías, redes e imaginarios. Reflexiones a partir de un diálogo interdisciplinario en torno al quehacer científico local. *Etnografías Contemporáneas*, 4(6), 77-107.
- Cortez, J. V., Hardwicke, K., Cuervo-Arango, J., y Grupen, C. G. (2022). Oocytes obtained by ovum pick-up from live mares as an alternative to abattoir-derived oocytes for the development of equine embryos produced by somatic cell nuclear transfer. *Journal of Equine Veterinary Science*, 113, 103971. doi:10.1016/j.jevs.2022.103971
- Costa-Borges, N., Sanchez Arbouin, R., Blanco, M., y Schockemöhle Stud Lewitz, P. (2018). Biopsy of Equine Embryos with the Eppendorf PiezoXpert® for Preimplantation Genetic Diagnosis. *Userguide*, (47). Recuperado de https://www.eppendorf.com/product-media/doc/en/163988_Userguide/CellTechnology_Userguide_047_PiezoXpert_Biopsy-Equine-Embryos-Eppendorf-PiezoXpert-Preimplantation-Genetic-Diagnosis.pdf
- Cuervo-Arango, J., Claes, A. N., y Stout, T. A. (2018). Effect of embryo transfer technique on the likelihood of pregnancy in the mare: a comparison of conventional and Wilsher's forceps-assisted transfer. *Veterinary Record*, 183(10). doi:10.1136/vr.104808
- Cuervo-Arango, J., Claes, A. N., y Stout, T. A. (2019). A retrospective comparison of the efficiency of different assisted reproductive techniques in the horse, emphasizing the impact of maternal age. *Theriogenology*, 132, 36-44. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.04.010
- Damasceno Teixeira, T. V., Fry, R. C., Mckinnon, A., Fry, K., Kelly, J. M., Verma P. J., ... Gambini, A. (2019). Targeting epigenetic nuclear reprogramming in aggregated cloned equine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(12), 1885-1893. doi:10.1071/RD19239
- De Almeida, R. W., y Oliveira, J. C. (2021). Congelamento de sêmen equino após 24 horas de resfriamento. *Research, Society and Development*, 10(1), e1831019939. doi:10.33448/rsd-v10i1.9939

- De la fuente, A. E., Kato, M., Catandi, G. D., Foss, R., Holyoak, R. G., Carnevale, E. M., ... Dini, P. (2022). Gene expression of equine cumulus cells during *in vitro* and *in vivo* oocyte maturation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 113, 103963. doi:10.1016/j.jevs.2022.103963
- Díaz, F. A., Gutierrez, E. J., Cramer, E., Paccamonti, D. L., Gentry, G. T., y Bondioli, K. R. (2018). Pregnancy rates following low-temperature storage of large equine embryos before vitrification. *Journal of Equine Veterinary Science*, 64, 12–16. doi: 10.1016/j.jevs.2018.01.009
- Dutra C., Graglia, F., y Martínez, M. N. (2013). *Diluyentes de semen equino para su uso fresco y refrigerado por 14 y 48 horas. Comparación entre leche descremada UHT y un diluyente comercial (Equipro TM)* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo.
- Equine Medical Services. (2022). *Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides*. Recuperado de <https://equmed.com/>
- Félix, M. R., Turner, R. M., Dobbie, T., y Hinrichs, K. (2022). Successful *in vitro* fertilization in the horse: production of blastocysts and birth of foals after prolonged sperm incubation for capacitation. *Biology of Reproduction*, ioac172. doi.org/10.1093/biolre/ioac172
- Ferrari, A., Sader, M., Pérez, F., López, D., y Recuero, M. (2012). *Caracterización y potenciales del sector ecuestre en Uruguay*. Recuperado de <https://www.uruguayxxi.gub.uy/es/noticias/articulo/el-sector-ecuestre-en-uruguay/>
- Ferrer, M. S., Canisso, I. F., Ellerbrock, R. E., Podico, G., Lister, B. N., Hurley, D. J., ... Palomares, R. A. (2020). Optimization of cryopreservation protocols for cooled-transported stallion semen. *Animal Reproduction Science*, 221, 106581. doi:10.1016/j.anireprosci.2020.106581
- Foss, R. R., Ortis, H. A., y Loncar, K. D. (2018). Effect of Artificial Activation of Equine Oocytes on Cleavage and Blastocyst Production Following ICSI. *Journal of Equine Veterinary Science*, 66, 167. doi:10.1016/j.jevs.2018.05.061
- Galli, C., Colleoni, S., Turini, P., Crotti, G., y Lazzari, G. (2018). Prolonged *in vitro* maturation time and increased intensity of Piezo pulses during ICSI enhance cleavage and embryo development in the horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, 66, 169-170. doi:10.1016/j.jevs.2018.05.063
- Galli, C., y Lazzari, G. (2021). Current applications of SCNT in advanced breeding and genome editing in livestock. *Reproduction*, 162(1), F23-F32. doi:10.1530/rep-21-0006
- Gambini, A., Duque Rodriguez, M., Rodriguez, M. B., Briski, O., Flores Bragulat, A. P., Demergassi, N., ... Salamone, F. (2020). Horse ooplasm supports *in vitro* preimplantation development of zebra ICSI and SCNT embryos without

- compromising YAP1 and SOX2 expression pattern. *PLOS ONE*, 15(9), e0238948. doi:10.1371/journal.pone.0238948
- Gambini, A., y Maserati, M. (2018). A journey through horse cloning. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(1), 8-17. doi:10.1071/RD17374
- García, MdP. (2018). *Transporte espermático en yeguas 2, 4 y 12 horas luego de la inseminación artificial con semen congelado* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo.
- Giaretta, E., Munerato, M., Yeste, M., Galeati, G., Spinaci, M., Tamanini, C., y Bucci, D. (2017). Implementing an open-access CASA software for the assessment of stallion sperm motility: Relationship with other sperm quality parameters. *Animal Reproduction Science*, 176, 11–19. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.11
- Gibb, Z., Clulow, J. R., Aitken, R. J., y Swegen, A. (2018). First publication to describe a protocol for the liquid storage of stallion spermatozoa for 7 days. *Journal of Equine Veterinary Science*, 66, 37-40. doi:10.1016/j.jevs.2018.05.016
- Gomes, G. M., Crespilho, A. M., Leão, K. M., Jacobc, J. C. F., Gomes, L. P, Segabinazzi, L. G., ... Alvarenga, M. A. (2018). Can sperm selection, inseminating dose and artificial insemination technique influence endometrial inflammatory response in mares?. *Journal of Equine Veterinary Science*, 73, 43-47. doi:10.1016/j.jevs.2018.09.010
- González-Castro, R. A., Trentin, J. M., Carnevale, E. M., y Graham, J. K. (2019). Effects of extender, cryoprotectants and thawing protocol on motility of frozen-thawed stallion sperm that were refrozen for intracytoplasmic sperm injection doses. *Theriogenology*, 136, 36-42. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.06.030
- Hernández, P., Sánchez, M.J., García, L.J., Bragado, M.J., Gutiérrez, A., Millet, O., ... Macías, B. (2020). Study of the Metabolomics of Equine Preovulatory Follicular Fluid: A Way to Improve Current In Vitro Maturation Media. *Animals*, 10, 883.
- Herrera, C. (2016). Clinical applications of preimplantation genetic testing in equine, bovine and human embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, 41, 29-34. doi:10.1016/j.jevs.2016.04.002
- Herrera, C. (2018). Assisted reproduction techniques in horses – clinical application by different programs around the world. *Pferdeheilkunde–Equine Medicine*, 34(1), 47-50. doi:10.21836/PEM20180108
- Herrera, C., Fanelli, D., Panzani, D., Bolwein, H., y Camillo, F. (2021). Criopreservación y sexado de embriones equinos y asnos. *InVet*, 23 (2). En *VI Jornadas Internacionales Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal*. INITRA, Buenos Aires.
- Herrera, C., Jeannerat, E., Sanchez, R., Burger, D., Wyck, S., Janett, F., y Bollwein, H. (2018). Blastocoele Fluid vs. Embryonic Cells for Sex Determination in

- Equine Embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, 66, 197. doi:10.1016/j.jevs.2018.05.087
- Hinrichs, K. (2006). A Review of Cloning in the Horse. *American Association of Equine Practitioners Proceedings*, 52, 398-401.
- Hinrichs, K. (2013). Assisted reproduction techniques in the horse. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(1), 80. doi:10.1071/rd12263
- Hinrichs, K. (2018). Assisted reproductive techniques in mares. *Reproduction in Domestic Animals*, 53, 4-13. doi:10.1111/rda.13259
- Hinrichs, K. (2020). Advances in Holding and Cryopreservation of Equine Oocytes and Embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, 89, 102990. doi:10.1016/j.jevs.2020.102990
- Hiriart, M. A. (2021). *Ico laboratorio de fecundación in vitro de embriones equinos mediante la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)* (Tesis de maestría). Escuela de negocios, Universidad de San Andrés.
- Hisey, E. A., Ross, P. J., y Meyers, S. (2021). Genetic manipulation of the equine oocyte and embryo. *Journal of Equine Veterinary Science*, 99, 103394. doi:10.1016/j.jevs.2021.103394
- Hollinshead, F. K., y Hanlon, D. W. (2018). A single fixed-time insemination prior to ovulation results in higher pregnancy rates than post-ovulation insemination when using frozen-thawed semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 66, 198. doi:10.1016/j.jevs.2018.05.088
- Huber, D., Amsler, E., Vidondo, B., Kaeser, R., Wespi, B., Sieme, H., y Burger, D. (2019). Increase of pregnancy rate after multiple periovulatory inseminations in mares. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere / Nutztiere*, 47(01), 18–24. doi:10.1055/a-0803-1211
- Immonen, I., y Cuervo Arango, J. (2019). Effect of timing of post-ovulatory insemination relative to hCG/Buserelin treatment with 1 straw of frozen-thawed semen on mare fertility. *Journal of Equine Veterinary Science*, 87, 102900. doi:10.1016/j.jevs.2019.102900
- In vitro. Clonagem animal. (s.f). *Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides y clonación*. Recuperado de <https://invitroclonagem.com.br/icsi/>
- International Embryo Technology Society. (2020). *Equine Embryo Transfer*. Recuperado de <https://www.iets.org/Committees/Data-Retrieval-Committee>.
- Iribarren, C. A., y Navarro, L. M. (2020). *Descripción de la semana criolla tomando en cuenta “indicadores de bienestar animal”* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo.

- Knottenbelt, D. C., Le Blanc, M., Lopate, C., y Pascoe, R. R. (2003). *Equine Stud farm medicine and surgery*. Londres: Saunders.
- Köhne, M., Mönnig, F., Papin, J., Schöniger, S., Tönissen, A., Rohn, K., y Sieme H. (2020). Effects of hysteroscopic and uterine body insemination on the presence of selected immune cells in the equine endometrium. *Journal of Equine Veterinary Science*, 90, 103023. doi:10.1016/j.jevs.2020.103023
- Kowalczyk, A., Czerniawska-Piatkowska, E. C., y Kuczaj, M. (2019). Factors Influencing the Popularity of Artificial Insemination of Mares in Europe. *Animals*, 9(7), 460. doi:10.3390/ani9070460
- Larentis, G., Camozzato, G. C., Bastos, H. B., Gregory, R. M., y Mattos, R. C. (2018). Equine Sperm Selection by Synthetic Membrane Filter. *Journal of Equine Veterinary Medicine*, 63, 69-73.
- Larentis, G. R., y Bastos, H. B. (2020). Equine semen biotechnology. *Advances in Medicine and Biology. Nova Medicine and Health*, 161, 24-43.
- Lazcano, S., y Pereyra, F. (2020). *Semen congelado en equinos: influencia del sitio y la dosis de inseminación sobre el transporte espermático y la reacción inflamatoria* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo.
- Lazzari, G., Colleoni, S., Crotti, G., Turini, P., Fiorini, G., Barandalla, M., y Galli, C. (2020). Laboratory production of equine embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, 89, 103097. doi:10.1016/j.jevs.2020.103097
- Leemans, B., Gadella, B., Stout, T. A., De Schauwer, C., Nelis, H., Hoogewijs, M, y Van Soom, A. (2016). Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization. *Reproduction*, 152(6), 233-245.
- Len, J., Beehan, D., Eilts, B., Ebrahimie, E., y Lyle, S. (2019). Stallion sperm integrity following centrifugation to reduce seminal plasma concentration and cool storage for 4 days. *Journal of Equine Veterinary Science*, 102819. doi:10.1016/j.jevs.2019.102819
- Loomis, P. R., Squires, E. L., Skaife, J., y Graham, J. K. (2018). The relationship between cholesterol level in stallion sperm and their cryosurvival rate. *Journal of Equine Veterinary Science*, 66. doi:10.1016/j.jevs.2018.05.020
- Lossino, L. (2010). Clonación en equinos. *Prisma Dossiervet, UNRC (Río Cuarto)*, (2), 6-7.
- Lossino, L., y Pietrani, M. (2018). Programas comerciales de transferencia embrionaria: consideraciones para mejorar la eficiencia. En *III Seminario Tronador de Reproducción Equina*, Santiago.

- McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., y Varner, D. D. (2011). *Equine Reproduction* (2ª ed), Chichester: Wiley-Blackwell.
- Miró, J., Morató, R., Vilagran, I., Taberner, E., Bonet, S., y Yeste, M. (2020). Preservation of Epididymal Stallion Sperm in Liquid and Frozen States: Effects of Seminal Plasma on Sperm Function and Fertility. *Journal of Equine Veterinary Science*, 88, 102940. doi:10.1016/j.jevs.2020.102940
- Monteiro, G. A., y Fabres, Y. (2018). Biotecnología del semen equino. *Reproduction Biotechnology in Farm Animals*, 9, 223.
- Moro, L. N., Viale, D. L., Bastón, J. I., Arnold, V., Suvá, M., Wiedenmann, E., ... Vichera, G. (2020). Generation of myostatin edited horse embryos using CRISPR/ Cas9 technology and somatic cell nuclear transfer. *Science Reproduction*, 10, 15587. doi:10.1038/s41598-020-72040-4
- Morrell, J. M., y Rodriguez-Martinez, H. (2011). Practical Applications of Sperm Selection Techniques as a Tool for Improving Reproductive Efficiency. *Veterinary Medicine International*, 1-9. doi:10.4061/2011/894767
- Morris, L. H. (2018). The development of in vitro embryo production in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 50(6), 712-720. doi:10.1111/evj.12839
- Mutto, A., Roser, J. F., Etcharren, M. V., Miragaya, M. H., Colgin, M., Lossino, L., y Ross, P. J. (2021). Superovulación, recuperación embrionaria, y preñez de yeguas anovulatorias tratadas con FSH equina recombinante (reFSH). En *IV Jornadas de Biotecnologías Reproductivas en Equinos*. SATE, Buenos Aires.
- Neuhauser, S., Gösele, P., y Handler, J. (2018). Combined single-straw packaging of cryopreserved stallion epididymal sperm and separated homologous seminal plasma. *Journal of Equine Veterinary Science*, 71, 57-63. doi:10.1016/j.jevs.2018.09.008
- Neuhauser, S., Sacker, J., y Handler, J. (2017). Effects of the addition of autologous seminal plasma to highly concentrated stallion semen after 48 hours of cooled storage. *Journal of Equine Veterinary Science*, 49, 25-30. doi:10.1016/j.jevs.2016.09.008
- Nieto-Olmedo, P., Cano, F. E., Gaitskell-Phillips, G., Ortiz-Rodríguez, J. M., Peña, F. J., y Ortega-Ferrusola, C. (2020). Power Doppler can detect the presence of 7–8 day conceptuses prior to flushing in an equine embryo transfer program. *Theriogenology*, 145,1-9. doi:10.1016/j.theriogenology.2020
- Novello, G., Podico, G., Segabinazzi, L. G., Lima, F. S., y Canisso, I. (2020). Stallion semen cooling using native Phosphocaseinate-based extender and sodium caseinate cholesterol-loaded cyclodextrin based extender. *Journal of Equine Veterinary Science*, 92, 103104. doi:10.1016/j.jevs.2020
- Oliveira Neto, I. V., Canisso, I. F., Segabinazzi, L. G., Dell'Aqua, C. P., Alvarenga, M. A., Papa, F. O., y Dell'Aqua, J. A. (2018). Synchronization of cyclic and acyclic

- embryo recipient mares with donor mares. *Animal Reproduction Science*, 190, 1-9. doi:10.1016/j.anireprosci.2017.12.016
- Orsolini, M. F., Verstraete, M. H., Heule, M., Meyers, S.A., y Dini, P. (2022). Efficacy of the novel microfluidic chip as a sperm selection method for equine ICSI. *Journal of Equine Veterinary Science*, 113, 103966. doi:10.1016/j.jevs.2022.103966
- Ortiz-Escribano, N., Bogado Pascottini, O., Woelders, H., Vandenberghe, L., De Schauwer, C., Govaere, J., ... Smits, K. (2017). An improved vitrification protocol for equine immature oocytes, resulting in a first live foal. *Equine Veterinary Journal*, 50(3), 391-397. doi:10.1111/evj.12747
- Ovohorse. (2022). *Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides*. Recuperado de <https://ovohorse.com/tecnicas-de-reproduccion-asistida-equina-pick-up-icsi/>
- Papas, M., Catalán, J., Fernandez-Fuertes, B., Arroyo, L., Bassols, A., Miró, J., y Yeste, M. (2019). Specific Activity of Superoxide Dismutase in Stallion Seminal Plasma Is Related to Sperm Cryotolerance. *Antioxidants*, 8(11), 539. doi:10.3390/antiox8110539
- Papin, J., Stuhmann, G., Martinsson, G., Sieme, H., Lundeheim, N., Ntallaris, T., y Morrell, J. M. (2021). Stored Stallion Sperm Quality Depends on Sperm Preparation Method in INRA82 or INRA96. *Journal of Equine Veterinary Science*, 98, 103367. doi:10.1016/j.jevs.2020.103367
- Pereira, B., Ortiz, I., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Consuegra, C., Demyda-Peyras, S., y Hidalgo, M. (2020). The effect of different vitrification and staining protocols on the visibility of the nuclear maturation stage of equine oocytes. *Journal of Equine Veterinary Science*, 103021. doi:10.1016/j.jevs.2020.103021
- Pérez, J. N. (2015). *Evaluación de la capacidad de maduración de ovocitos obtenidos en diferentes etapas del desarrollo folicular por medio de aspiración folicular en yeguas* (Tesis de maestría). Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Pérez-Marín, C. C., Vizuite, G., Vazquez-Martinez, R., y Galisteo, J. J. (2017). Comparison of different cryopreservation methods for horse and donkey embryos. *Equine Veterinary Journal*, 50(3), 398-404. doi:10.1111/evj.12777
- Prell, M. J., McCue, P. M., Moffett, P. D., y Graham, J. K. (2020). Motility and fertility evaluation of thawed frozen stallion semen after 24 hours of cooled storage. *Journal of Equine Veterinary Science*, 90, 102983. doi:10.1016/j.jevs.2020.102983
- Ramírez Castex, H., y Lossino, L. (2018). Nanopartículas magnéticas para separación de espermatozoides x en semen equino. Resultados de campo y comerciales. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 13(2), 268-276.

- Rečková, Z., Filipčík, R., Soušková, K., Kopec, T., Hošek, M., y Pešan, V. (2022). The efficiency of different types of extenders for semen cooling in stallions. *Animal Bioscience*, 35(5), 670–676. doi:10.5713/ab.21.0300
- Revive and Restore Communications. (2020). *Birth of cloned Przewalski's foal offers genetic diversity for this endangered species*. Recuperado de https://drive.google.com/file/d/1PtVNhi7pbVML8X8zRaUJf8Ekyuh_SGR-/view
- Riera, F. L. (2021). Aplicación de la biopsia de embriones y la determinación del sexo mediante PCR en un programa comercial de transferencia de embriones en Argentina. En *IV Jornadas de Biotecnologías reproductivas en equinos*. Sociedad Argentina de Tecnologías Embrionarias (SATE), Buenos Aires.
- Riera, F. L., Roldán, J. E., Espinosa, J. M., Fernández, J. E., Ortiz, I., y 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), 1917-1925. doi:10.1071/RD19228
- Rodriguez, J., Maserati, M., Robilotta, T., Augusto, G., Alonso, M. A., Redoan, M., ... y Fleury, P. (2020). Recovery of equine oocytes in ambulatory practice and potential complications. *Journal of Equine Veterinary Science*, 98, 103324. doi:10.1016/j.jevs.2020.103324
- Rodríguez, M. B., Gambini, A., Ynsaurralde, A. E., Briski, O. L., y Salamone, D. F. (2016). Dynamics of in vitro maturation of equine oocytes recovered by transvaginal follicular aspiration. *Journal of Equine Veterinary Science*, 41, 54. doi:10.1016/j.jevs.2016.04.024
- Roser, J. F., y Meyers-Brown, G. (2019). Enhancing fertility in mares. Recombinant equine gonadotropins. *Journal of Equine Veterinary Science*, 76, 6-13. doi:10.1016/j.jevs.2019.03.004
- Sabatini, C., Rota, A., Panzani, D., Tesi, M., y Camillo, F. (2018). Postmating endometritis and pregnancy rate were not affected by the addition to frozen-thawed semen of filtered seminal plasma when mares without evidence of endometritis were artificially inseminated once 40 hours post-gonadotropin-releasing hormone treatment. *Journal of Equine Veterinary Science*, 62, 54–59. doi:10.1016/j.jevs.2017.05.011
- Salgado, R. M., Brom-de-Luna, J. G., Resende, H. L., Canesin, H. S., y Hinrichs, K. (2018). Blastocyst rates and kinetics of sperm processing after conventional vs. piezo-driven ICSI. *Journal of Equine Veterinary Science*, 66, 175. doi:10.1016/j.jevs.2018.05.067
- Sansinena, M. (2020). Assisted reproductive biotechnologies in the horse. *Reproductive Technologies in Animals*, (pp.13–30). Londres: Elsevier. doi:10.1016/b978-0-12-817107-3.00002-3

- Santos, F., Mylius, A., y Costa, R., Fiala Rechsteiner, M. da E. (2020). Utilização de leite com diferentes concentrações de gordura como diluentes para sêmen equino refrigerado. *Ciência Animal Brasileira*, 23(1), e-44262. doi:10.1590/1809-6891v21e-44262
- Sieme, H., Rau, J., Tiedemann, D., Oldenhof, H., Barros, L., Sánchez, R., y Burger, D. (2018). Equine Embryo Transfer. *Animal Biotechnology* 1, 179-192. doi:10.1007/978-3-319-92327-7_8
- Sieme, H., Schafer, T., Stout, T.A., Klug, E., y Waberski, D. (2003). The effects of different insemination regimes on fertility in mares. *Theriogenology*, 60(6), 1153-64. doi:10.1016/s0093-691x(03)00113-4
- Silva Rua, M. A., Quirino, C. R., Rodrigues, A. C. C., Christo, M. M., y Barreto, M. A. P. (2018). Evaluation of environmental effects on reproductive characteristics of Mangalarga Marchador mares in a commercial embryo transfer program. *Animal Reproduction Science*, 195, 131-138. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.05
- Simioni, L. A., Barcellos, G., Ernandes, L., Scheffer, J. F., Lampe, B., Scheffer, M. T., ... Rudiger, D. (2019). Equine semen cryopreservation comparison between centrifugation and filtration. *Pferdeheilkunde. Equine Medicine*, 35(5), 437–441. doi:10.21836/PEM20190506
- Singh, P., y Ali, S. A. (2021). Impact of CRISPR-Cas9-Based genome engineering in farm animals. *Veterinary Science*, 8(7), 122. doi:10.3390/vetsci8070122
- Smits, K., Govaere, J., Hoogewijs, M., Piepers, S., y Van Soom, A. (2012). A pilot comparison of laser-assisted vs piezo drill icsi for the in vitro production of horse embryos. *Reproduction Domestic Animals*, 47, e1–e3. doi:10.1111/j.1439-0531.2011.01814.x
- Spacek, S. G., y Carnevale, E. M. (2018). Impact of equine and bovine oocyte maturation in follicular fluid from young and old mares on embryo production *in vitro*. *Journal of Equine Veterinary Science*, 68, 94-100. doi:10.1016/j.jevs.2018.04.009
- Squires, E. (2019). Perspectives on the development and incorporation of assisted reproduction in the equine industry. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(12), 1753-1757. doi:10.1071/rd19365
- Squires, E. (2020). Current reproductive technologies impacting equine embryo production. *Journal of Equine Veterinary Science*, 89, 102981. doi:10.1016/j.jevs.2020.102981
- Squires, E. L., y McCue, P. M. (2016). Cryopreservation of Equine Embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, 41, 7-12. doi:10.1016/j.jevs.2016.03.009
- Stout, T. A. (2020). Clinical Application of in vitro embryo production in the horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, 89, 103011. doi:10.1016/j.jevs.2020.103011

- Suvá, M., Arnold, V., Wiedenman, E., Bastón, J. I., Martínez, M., Ortiz, B., ... Vichera, G. (2021). Avances en clonación, edición génica y reversión de sexo en equinos. En *IV Jornadas de Biotecnologías Reproductivas en Equinos*. Sociedad Argentina de Tecnologías Embrionarias (SATE), Buenos Aires.
- Tirone, A. (2011). Calculo de la dosis y refrigeración de semen para envío. En *Resúmenes del 3° Congreso Argentino de Reproducción Equina* (pp. 73-76). Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Torres, J. G. (2017). Puntos críticos en un programa de transferencia embrionaria. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 6(2), 108-113. Córdoba, España.
- Tozaki, T., y Hamilton, N. A. (2021). Control of gene doping in human and horse sports. *Gene Therapy*, 29, 107–112. doi:10.1038/s41434-021-00267-5
- Tscharke, M., Kind, K., Kelly, J., Kleemann, D., y Len, J. (2020). The Phosphodiesterase Inhibitor, Isobutyl-1-Methylxanthine Prevents the Sudden Drop in Cyclic Adenosine Monophosphate Concentration and Modulates Glucose Metabolism of Equine Cumulus–Oocyte Complexes Matured in Vitro. *Journal of Equine Veterinary Science*, 91, 103112. doi:10.1016/j.jevs.2020.103112
- Umair, M., Beitsma, M., Ruijter-Villani, M. D., Deelen, C., Stout, T. A., y Claes, A. (2022). Slow-freezing is more damaging than vitrification to post-thaw quality of large equine embryos collapsed by blastocoele aspiration. *Journal of Equine Veterinary Science*, 113, 103975. doi:10.1016/j.jevs.2022.103975
- Urías Castro, C., y Boeta, A. M. (2020). Tasa de preñez post vitrificación en los embriones de équidos producidos in vivo. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11(4), 1142-1149. doi:10.22319/rmcp.v11i4.5437
- Uruguay XXI. (2021). *Sector Ecuestre en Uruguay*. Recuperado de <https://www.uruguayxxi.gub.uy/es/centro-informacion/articulo/sector-ecuestre/>.
- Vafaei, F., Kohram, H., Zareh-Shahne, A., Ahmad, E., y Seifi-Jamadi, A. (2019). Influence of different combinations of permeable and nonpermeable cryoprotectants on the freezing capacity of equine sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 75, 69-73. doi:10.1016/j.jevs.2019.01.014
- Valenzuela, O. A., Couturier-Tarrade, A., Choi, Y. H., Aubrière, M. C., Ritthaler, J., Chavatte-Palmer, P., y Hinrichs, K. (2018). Impact of equine assisted reproductive technologies (standard embryo transfer or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with in vitro culture and embryo transfer on placenta and foal morphometry and placental gene expression. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(2), 371. doi:10.1071/rd16536
- Varela, E., Rey, J., Plaza, E., Muñoz, de Propios, P., Ortiz-Rodriguez, J. M., Álvarez, M., y Ortega-Ferrusola, C. (2018). How does the microbial load affect the quality

of equine cool-stored semen? *Theriogenology*, 114, 212-220. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.03.028

Varga, G., Serres, C., Gosálvez, J., Bartolomé, J., y Crespo, F. (2018). Approach to the study of the relationship between DNA damage and oxidative stress in equine semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 66, 89. doi:10.1016/j.jevs.2018.05.055

Vélez, A. M., Úsuga, A., Paredes, A., Restrepo, G., Bernardo, Camacho, C., y Pérez, J. (2018). Efecto de la centrifugación con coloide (EquiPure®) en las características espermáticas pos refrigeración, empleando sondas fluorescentes. *CES, Medicina, Veterinaria y Zootecnia*, 13(2), 283-284.

Velez, I. C., y Hinrichs, K (2011). Técnicas de Reproducción asistida en caballos. *CES, Medicina, Veterinaria y Zootecnia*, 6(2), 124-128. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/3214/321428106012.pdf>

Vichera, G., Viale, D., Olivera, R., Arnold, V., Grundnig, A., Baston, J., ...Moro, L. (2018). Generation of myostatin knockout horse embryos using clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated gene 9 and somatic cell nuclear transfer. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(1), 136-136.