

Important considerations about *in vitro* production of equine embryos*

Consideraciones importantes acerca de la producción in vitro de embriones equinos

Considerações importantes sobre a produção in vitro de embriões eqüinos

Giovanni Restrepo Betancur^{1*}, MV, Zoot, MSc; Sara Restrepo Escobar², Ing. Agrop.

* Autor para correspondencia: Giovanni Restrepo Betancur. Carrera 48 N° 7-151
Medellín - Colombia. Correo electrónico: grestrepo@elpoli.edu.co

¹ Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid; Facultad de Ciencias Agrarias; Grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA).

² Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA), Ingeniera Agropecuaria.

(Recibido: 6 de junio, 2010; aceptado: 23 de marzo, 2011)

Abstract

The *in vitro* embryo production (PIVE) in horses is a technique that generates increases in reproductive efficiency of high genetic and commercial value animals. Despite all the studies that has been made, PIVE is still a technique with limited access and success, mainly due to difficulties to achieve efficient rates of fertilization through conventional *in vitro* fertilization, as well as by the high needs in technical and economic resources for fertilization using intracytoplasmic sperm injection (ICSI), among other limitations on *in vitro* embryonic development. In the world there have been evaluated multiple alternatives for improving the PIVE in horses: from the use of different means, fluids, cells and molecules, to the use of alternative methods to improve the rates of fertilization through ICSI with the use of substances such as polyvinylalcohol. This review explores the research progress and future expectations for the application of the PIVE technique in horses.

Key words

Equine embryos, ICSI, In vitro fertilization.

*Para citar este artículo: Restrepo G, Restrepo S. 2011. Consideraciones importantes acerca de la producción *in vitro* de embriones equinos. Rev CES Med Vet Zootec. Vol 6 (1): 55-63

Resumen

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) en equinos es una técnica que genera incrementos en la eficiencia reproductiva de especímenes de alto valor genético y comercial. A pesar de todos los estudios que se han realizado, la PIVE es una técnica con acceso y un éxito limitado, debido principalmente a las dificultades para alcanzar tasas de fertilización eficientes mediante fertilización *in vitro* convencional, al igual que por las altas necesidades en recursos técnicos y económicos para la fertilización mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), entre otras limitaciones existentes para el desarrollo embrionario *in vitro*. En el mundo, se han evaluado múltiples alternativas para el mejoramiento de la PIVE en equinos, desde el uso de diferentes medios, fluidos, células, y moléculas, hasta la utilización de métodos alternativos para mejorar las tasas de fertilización como la ICSI en asociación de sustancias como el polivinilalcohol. Esta revisión explora los avances investigativos y las expectativas futuras de aplicación de la técnica de PIVE en equinos.

Palabras clave

Embriones equinos, fertilización in vitro, ICSI.

Resumo

A produção de embriões eqüinos *in vitro* (PIVE) é uma técnica que aumenta eficiência reprodutiva em espécies de alto valor genético e comercial. Apesar de todos os estudos realizados, a PIVE é uma técnica de acesso e êxito limitados, principalmente devido à dificuldade de se alcançar taxas de fertilização eficientes diante da fertilização *in vitro* convencional, grande necessidade de recursos financeiros e técnicos para a fertilização por injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), entre outras limitações para o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Em todo mundo foram avaliadas várias alternativas para a melhoria da PIVE em eqüinos, desde a utilização de diferentes meios, fluidos, células e moléculas até a utilização de métodos alternativos para melhorar as taxas de fertilização como a ICSI em associação com outras substâncias como o álcool polivinílico. Essa revisão aborda o progresso da pesquisa e as perspectivas futuras de aplicação da técnica PIVE em eqüinos.

Palavras-chave

Embriões eqüinos, fertilização in vitro, ICSI.

Introducción

La biotecnología reproductiva permite aumentar la eficiencia reproductiva de los animales mediante el aprovechamiento de sus rasgos genéticos de valor, en la búsqueda de un mayor beneficio productivo y rentable para el hombre. Hay evidencias que

demuestran que la biotecnología reproductiva no es una herramienta nueva en la relación del hombre con los animales, dado que algunos pueblos de Asia Menor alrededor del 2.500 A.C, la utilizaban de forma empírica, castrando los machos que no reunían las condiciones requeridas como reproductores ³².

Para la especie equina se han implementado

biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial, la transferencia de embriones, la producción *in vitro* de embriones (PIVE) y la clonación, sin embargo las tasas de éxito para algunas de ellas, se han visto limitadas ya sea por restricciones de tipo técnico, o por barreras de tipo fisiológico propias de dicha especie. La inseminación artificial y la transferencia de embriones han logrado un posicionamiento significativo en las prácticas reproductivas equinas en países desarrollados donde esta explotación es altamente relevante, sin embargo la difusión de estas biotecnologías en los denominados países en desarrollo es aún muy escasa para el gremio de los productores.

Para el caso de la clonación son varios los reportes de éxito desde los primeros nacimientos de equinos clonados en 2003, a pesar de esto, la técnica sigue siendo altamente ineficiente con menos de un 3% de casos exitosos⁴⁴. Para la PIVE en equinos, aunque el éxito ha sido menor comparado con la PIVE en otras especies⁸, se han logrado valiosos avances en países como Estado Unidos, Italia, Holanda y Francia, donde diversos estudios se han realizado para tratar de mejorar la eficiencia de la técnica, evaluando los diferentes factores que pueden interferir en los resultados de la misma^{17, 22, 29}. Dentro de las principales limitantes planteadas para este procedimiento, están la baja disponibilidad de oocitos, la baja competencia para el desarrollo de los oocitos usados⁸, las dificultades para alcanzar altas tasas de fertilización *in vitro*, y sobretodo en el ámbito comercial, los altos costos técnicos que involucra.

En el desarrollo *in vitro* de embriones equinos han sido evaluadas diferentes alternativas como los cocultivos celulares⁴⁰ y la suplementación de los medios con moléculas como gonadotropinas, factor de crecimiento insulinoide I (IGF-I)⁷, factor de crecimiento epidermal (EGF)³¹, hormonas esferoidales, suero fetal bovino^{7, 14}, glucosa⁹, BSA y aminoácidos²¹. A pesar de esto, la eficiencia de la técnica aún es limitada respecto a la obtención de embriones viables para los procedimientos de reproducción asistida en esta especie. El objetivo de esta revisión es estudiar algunas consideraciones importantes acerca de la producción

in vitro de embriones equinos y las perspectivas futuras de investigación y aplicación en el campo de la biotecnología.

La biotecnología y producción de embriones equinos *in vitro*

Una variedad de técnicas de reproducción asistida han sido implementadas en la reproducción equina. La fertilización *in vitro* (FIV), la transferencia de oocitos y embriones, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), y la transferencia nuclear han sido desarrolladas con gametos equinos. Sin embargo la baja eficiencia de estos procedimientos ha impedido su aplicación comercial⁴². El primer reporte de fertilización *in vitro* en equinos se dio en 1989⁴, y la mayoría de las investigaciones reportan tasas de fertilización *in vitro* de oocitos equinos entre 4 y 33%^{5, 47}.

Las técnicas de maduración *in vitro* (MIV) de oocitos, de FIV convencional, y de cultivo de cigotos hasta el estado de blastocistos han sido inadecuadas para la especie equina⁴¹. Se ha reportado escasos nacimientos de potros por FIV convencional, mientras con la implementación de ICSI^{21, 30}, múltiples nacimientos han sido logrados principalmente por transferencia de cigotos post-clivaje, y en menor medida por la transferencia de blastocistos producidos *in vitro*^{15, 35, 41}.

Un estimado adecuado de la competencia de los oocitos esta dado por su habilidad para desarrollarse en blastocistos, y luego por la capacidad de estos embriones para establecer una gestación que conduzca al nacimiento de una cría viable²⁰. La producción *in vitro* de embriones equinos ha tenido un éxito limitado, posiblemente relacionado con la baja competencia para el desarrollo de los oocitos usados⁸, la cual es influenciada no sólo por el ambiente de cultivo, sino también por las condiciones de maduración de los mismos²⁰.

Una de las dificultades en el desarrollo de estudios de PIVE para la especie equina es la limitada disponibilidad de oocitos, dado que una de las principales fuentes para su obtención son las plantas de faenado equino, las

cuales son poco comunes en muchos países respecto a aquellas dedicadas al sacrificio bovino y de otras especies. Adicionalmente la fisiología ovárica de esta especie limita el número de folículos presentes en el ovario, por lo cual se hace necesario recurrir a técnicas como aspiración folicular, la disección de folículos y el raspado de la pared folicular de los ovarios^{22, 24} con el fin de maximizar el número de estructuras recuperadas.

La maduración *in vitro* y la suplementación de los medios

Las tasas de MIV de oocitos equinos son del 50% al 75%, las cuales son menores a las obtenidas en otras especies⁴⁰. Para ganar en el entendimiento de las razones por las cuales las tasas de maduración de oocitos equinos son bajas, y para seleccionar poblaciones de oocitos capaces de madurar *in vitro*, se ha planteado el uso de la aspiración transvaginal guiada por ultrasonido. Sin embargo la colección de oocitos por este método sólo produce 0.7 oocitos por ciclo²².

Goudet *et al.* (1998)²³ realizaron aspiración folicular a un grupo de yeguas que se encontraban en diferentes etapas del ciclo estral, y evaluaron la competencia de los oocitos para la maduración; encontrando que los oocitos obtenidos de yeguas finalizando la fase folicular, tienen una tasa de maduración mayor (51%), a diferencia de las encontradas en yeguas en fase lútea (34%), y durante la fase folicular (15%).

Son múltiples los factores relacionados con las condiciones de cultivo *in vitro*, que afectan la maduración, la fertilización y el desarrollo embrionario. La duración ideal de la MIV para lograr tasas óptimas de FIV es aún un parámetro en discusión²⁷, Hinrichs *et al.* (1993)²⁸, determinaron que no existe un efecto significativo de la duración de la MIV (24 o 42h) sobre la tasa de FIV. El estado de compactación de la granulosa en oocitos inmaduros también es un aspecto importante, dado que los oocitos con un cúmulo compacto toman más tiempo en madurar que los oocitos con un cúmulo expandido^{26, 28, 45}, adicionalmente,

las tasas de maduración nuclear son superiores en oocitos expandidos respecto a los oocitos con cúmulo compacto⁹, y las tasas de FIV para los primeros han sido igualmente reportadas como superiores (30% vs. 14%)².

La composición de los medios para la MIV de oocitos equinos es en la actualidad uno de los aspectos más relevantes a analizar. Se han evaluado alternativas como la suplementación del medio de MIV con células de la granulosa, dado que existen antecedentes en el mejoramiento de las tasas de maduración para oocitos bovinos y porcinos. Sin embargo, resultados de investigaciones realizadas por Sepúlveda *et al.* (2003)⁴⁰, no arrojaron diferencias respecto a la utilización de medios de maduración libres de células de la granulosa.

Cuando los oocitos son madurados con un 20% de fluido folicular han sido incrementadas las tasas de FIV después de ICSI, mas no para el caso de la FIV tradicional¹⁸. Se reportan tasas de producción *in vivo* de blastocistos a partir de oocitos MIV del 17%⁴⁶, y tasas de preñez del 10%³⁹, por lo que se han asociado las bajas tasas de FIV con la MIV, por lo cual es necesario mejorar la competencia de los oocitos en la maduración.

Aguilar *et al.* (2007)¹ evaluaron la maduración nuclear en oocitos madurados *in vitro* en medios suplementados con TCM-199 o fluido folicular (FF), y la habilidad de desarrollo de los embriones después de ser transferidos a las yeguas. Encontrando que el porcentaje de oocitos que avanzaron en la meiosis hasta metafase II, fue significativamente superior para el medio con FF (77.3%), respecto al medio con TCM-199 (46.8%). Después de realizar la transferencia, fueron pocos los oocitos madurados en FF y fertilizados *in vivo* que desarrollaron embriones *in vivo* (4.4%, 3/68), mientras en el caso de los oocitos madurados en TCM-199, no se desarrollaron embriones (0/58). En estudios realizados por Hinrichs *et al.* (1993)²⁸, encontraron que para la MIV de oocitos equinos en 100% fluido folicular (FF) se alcanzan mayores tasas de FIV 13-24%, respecto al uso de medio de maduración con 20% de FF (0-12%).

Lydia *et al.* ³³ sugieren que la adición de suero de yegua en estro y de FF en el medio TCM-199 mejora los resultados en términos de la proporción de oocitos que alcanzan la madurez.

Otras moléculas han sido identificadas como relevantes en la composición de los medios y por ende en los resultados de la PIVE en equinos. El IGF-I ha sido demostrado como un suplemento que mejora la maduración nuclear y citoplasmática de oocitos equinos según la suplementación hormonal realizada ⁷. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) ha demostrado promover la maduración de oocitos. Al cultivar oocitos en medio TCM199 durante 36 horas y posteriormente someterlos al cultivo con EGF y dos inhibidores específicos de tirosina quinasa, se obtiene que los oocitos cultivados presentan un aumento significativo en la incidencia de la etapa de metafase II (70.4%), comparados con el tratamiento libre de EGF (22.5%) ³¹. Por otro lado se ha demostrado que la interleucina 1 (IL-1) induce la maduración de oocitos, pero reduce la tasa de preñez 14 días después de la ovulación, mientras en evaluaciones *in vitro* se encontró que la IL-1 β no tiene un efecto positivo en la maduración y que por el contrario puede interferir con la fecundación y desarrollo embrionario temprano ⁶.

Para el caso de la hormona del crecimiento (GH), se encontró que su adición al medio de MIV, aumenta la expansión de las células del cúmulo, dado que en una investigación con oocitos recolectados por aspiración folicular guiada por ultrasonido, se observaron porcentajes de expansión del cúmulo del 29% (14/48) cuando se adicionó la GH, y del 13% (6/47) cuando se realizó el proceso en ausencia de ésta ³⁴.

Factores que afectan la fertilización *in vitro* de oocitos equinos

Desde la primera fertilización *in vitro* exitosa de oocitos equinos madurados *in vitro*, reportada por Del Campo *et al.* (1990) ¹⁶, se han explorado diversas alternativas con el fin de incrementar la producción de embriones por esta vía. Hasta el desarrollo de la fertilización por ICSI, las tasas de desarrollo *in vitro*

de embriones equinos fue muy reducida, por lo cual se hizo necesaria la combinación de procesos *in vitro* e *in vivo* durante para mejorar las tasas de producción de embriones y la obtención de gestaciones a término ^{1,38}.

Con el fin de incrementar la habilidad de FIV en los oocitos equinos, se ha planteado que la maduración citoplasmática debe darse de una manera paralela a la maduración nuclear ²², para lo cual ha sido descrito como fundamental, el estímulo de la hormona luteinizante (LH), dado que en condiciones naturales, el desarrollo de los oocitos no puede continuar hasta que los folículos maduros en el estado preovulatorio son estimulados por dicha hormona, la cual induce la maduración del oocito y la ovulación ⁴³.

Al observar reacción acrosómica en espermatozoides equinos, después de tratamientos de capacitación de semen, y tras reportes de la observación de la unión espermatozoide-zona, la principal barrera para la FIV en equinos parece ser la penetración de la zona pelúcida en oocitos madurados *in vitro*, por el endurecimiento espontáneo de la misma, por una liberación prematura de los gránulos corticales demostrada para los oocitos equinos ¹⁷, por lo cual se ha experimentado con la remoción parcial o completa de la zona pelúcida ¹². Algunas alternativas como la maduración de oocitos *in vivo*, y la fertilización por ICSI han sido instauradas en la búsqueda de mejorar las tasas de FIV ^{18, 19, 24}. Choi *et al.* (2002) ¹¹ encontraron que la competencia de desarrollo *in vivo* e *in vitro* de oocitos fertilizados mediante ICSI con espermatozoides frescos, congelados-descongelados, y sin tratamiento de activación, no presenta diferencias significativas. Bedford *et al.* (2004) ³ encontraron que la implementación de ICSI resulta en la inducción de oscilaciones en la liberación de calcio requerido para la activación del oocito durante la fertilización y su posterior desarrollo embrionario.

Al igual que para la optimización de la MIV, para la FIV en equinos se ha evaluado la influencia de diversas moléculas sobre la tasa de FIV. Choi *et al.* (2003) ¹⁰ evaluaron el efecto del polivinilalcohol (PVA) y la albúmina sérica bovina (BSA) sobre la penetración

de oocitos con zona pelúcida parcialmente desnuda, encontrando que el porcentaje de oocitos fertilizados con espermatozoides tratados con PVA (54%, 23/43) fue mayor que los tratados con BSA (11%, 5/43).

Un estudio reciente demuestra la importancia de la capacitación y la hiperactivación de los espermatozoides para el logro de una FIV convencional exitosa, al realizar la inducción de estos fenómenos mediante el uso de procaína, alcanzando porcentajes de fertilización de oocitos equinos hasta del 60.7%³⁶.

Condiciones para el cultivo *in vitro* de embriones equinos

El cultivo *in vitro* (CIV) de embriones equinos ha tenido bajo éxito comparado con el logrado con embriones de otros animales domésticos⁹. Diferentes enfoques han sido explorados para el mejoramiento del CIV. El cocultivo de cigotos con células somáticas, y el cultivo de estos en medios definidos libres de células como fluido oviductal sintético (SOF) y medio Eagle Dulbecco modificado (DMEM) han producido bajos porcentajes de cigotos promedio del 15%^{9, 21}. Choi *et al.* (2000)¹³ no observaron diferencias en las tasas de desarrollo de embriones, al comparar un medio condicionado con trofoblásto con un medio químicamente definido para el cultivo de cigotos equinos. Las tasas de desarrollo fueron bajas (<5%).

Pocos trabajos han sido desarrollados sobre el efecto de factores específicos del medio para el desarrollo de embriones equinos *in vitro*. En estudios recientes una variedad de medios han permitido un buen desarrollo de embriones de 4 días (8 a 16 células), y han sido alcanzadas tasas de blastocistos del 25% al 35% usando medios de cultivo como medio DMEM/F-12 con 10% de suero fetal bovino, en una mezcla de gases de 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂, a 38.2 °C. De igual forma el desarrollo de embriones equinos en mórulas y blastocistos ha sido mayor en medio SOF modificado y suplementado con 1.5 mM de glucosa, y por el cultivo inicial en SOF modificado con la transferencia aproximadamente al día 5 a medio DMEM/F-12²⁵.

Potros obtenidos mediante las técnicas de producción *in vitro* e ICSI han sido conseguidos de la transferencia de embriones tempranos en los oviductos de receptoras³⁶. Sin embargo, es deseable el logro de un sistema completo que soporte el desarrollo de embriones equinos por producción *in vitro*, transferibles a nivel uterino antes que para transferencia oviductal. Dado que las tasas máximas de gestación (50%) han sido alcanzadas por transferencia de cigotos derivados de ICSI al oviducto de yeguas tratadas con progesterona^{21, 42}.

Conclusiones

Para lograr el nacimiento de crías vivas a partir de embriones resultantes de procedimientos de reproducción asistida para la especie equina, ha sido necesario el avance de las técnicas de producción de embriones, desde la combinación de procesos *in vivo* e *in vitro*, y la obtención hace apenas dos décadas de los primeros embriones equinos producidos totalmente *in vitro*, hasta los recientes avances en las técnicas de fertilización y cultivo embrionario.

Con el uso de diversidad de sustancias, condiciones de cultivo e instrumentos tecnológicos se ha pretendido mejorar cada vez las tasas de maduración, fertilización y desarrollo embrionario, con lo cual se ha incrementado sin duda la calidad embrionaria, los resultados de la fertilización, y por ende la eficiencia en la producción de embriones viables.

Entre los métodos para la fertilización, la técnica ICSI ha demostrado ser la alternativa más viable para mejorar las tasas de fertilización, sin embargo sus altos costos y necesidades de especialización técnica, se convierten en una restricción sobretodo para la difusión comercial de este proceso.

Los medios de desarrollo embrionario para equinos requieren aún ser lo suficientemente estudiados, dado que los componentes exitosos en la producción de embriones de otras especies animales no siempre son los óptimos para los embriones equinos, lo que sugiere que deberán ser

maximizados los esfuerzos investigativos futuros para el mejoramiento de la técnica y sus resultados.

La producción *in vitro* de embriones equinos es una biotecnología que podrá ayudar a incrementar la eficiencia reproductiva, sobretodo en los países con sectores pecuarios ávidos de crecimiento, siempre y cuando se logre maximizar la difusión y comercialización de la técnica y sus resultados, para diseminar la genética de alta calidad productiva, y preservar las características genéticas de los animales.

Referencias

1. Aguilar J, Mas C, Reyley M, Ludueña R, Mouguelar H, Lusinno L. 2007. Nuclear maturation and mitochondrial distribution in equine oocytes matured *in vitro*. *Anim Reprod*; 4 (3/4):88-97.
2. Alm H, Torner H, Blottner S, Nürnberg G, Kanitz W. 2001. Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on *in vitro* fertilization of horse oocytes. *Theriogenology*; 56: 817-829.
3. Bedford SJ, Kurokawa M, Hinrichs K, Fissore RA. 2004. Patterns of intracellular calcium oscillations in horse oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection: possible explanations for the low success of this assisted reproduction technique in the horse. *Biol of Reprod*; 70:936-944.
4. Bezard J, Magistrini M, Duchamp G, Palmer E. 1989. Chronology of equine fertilisation and embryonic development *in vivo* and *in vitro*. *Equine Vet J*; 8 (suppl):105-110.
5. Bezard J. 1992. *In vitro* fertilization in the mare. *Proc Int Sci Conf Biotech Horse Reprod*; 12.
6. Caillaud M, Dell'Aquila ME, De Santis T, Nicassio M, Lacalandra GM, et al. 2008. *In vitro* equine oocyte maturation in pure follicular fluid plus interleukin-1 and fertilization following ICSI. *Anim Reprod Sci*; 106 (3-4):431-9. Abstract.
7. Carneiro G, Lorenzo P, Pimentel C, Pegoraro L, Bertolini M, et al. 2001. Influence of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on *in vitro* maturation and parthenogenic development in equine oocytes. *Biol of Reprod*; 65:899-905.
8. Choi Y, Love L, Varner D, Hinrichs K. 2004. Factors affecting developmental competence of equine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction*; 127:187-194.
9. Choi Y, Roasa L, Love C, Varner D, Brinsko S, Hinrichs K. 2004b. Blastocyst formation rates *in vivo* and *in vitro* of *in vitro*-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Biol of Reprod*; 70:1231-1238.
10. Choi Y., Landim F, Seidel G, Squires E. 2003. Effect of capacitation of stallion sperm with polyvinylalcohol or bovine serum albumin on penetration of bovine zona-free or partially zona-removed equine oocytes. *J Anim Sci*; 81:2080-2087.
11. Choi Y, Love C, Love L, Varner D, Brinsko S, Hinrichs K. 2002. Developmental competence *in vivo* and *in vitro* of *in vitro* matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reproduction*; 123:455-465.
12. Choi Y, Okada Y, Hochi S, Braun J, Sato K, Oguri N. 1994. *In vitro* fertilization rate of horse oocytes with partially removed zonae. *Theriogenology*; 42:795-802.
13. Choi Y., Chung Y, Seidel G Jr, Squires E. 2000. Culture of equine embryos in trophoblast conditioned medium. *Theriogenology*; 53: 291, citado por Palma G.A. *Biotecnología de la reproducción*. 2001. Pág. 588.
14. Choi Y, Chung Y, Walker S, Westhusin M, Hinrichs K. 2003. *In vitro* development of equine nuclear transfer embryos: effects of oocyte maturation media and amino acid composition during embryo culture. Cambridge University Press; 11:77-86.

15. Cochran R, Meintjes M, Reggio B, Hylan D, Carter J, Pinto C, Paccamonti D, Godke RA. 1998. Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. *J Equine Vet Sci*; 18:736-741.
16. Del Campo MR, Donoso MX, Parrish JJ, Ginther OJ. 1990. *In vitro* fertilization of *in vitro*-matured equine oocytes. *J Equine Vet Sci*; 10:18-22.
17. Dell'Aquila M, De Felici M, Massari S, Maritato F, Minoia P. 1999. Effects of fetuin on zona pellucida hardening and fertilizability of equine oocytes matured *in vitro*. *Biol of Reprod*; 61:533-540.
18. Dell'Aquila ME, Cho YS, Minoia P, Traina V, Fusco S, et al. 1997. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and *in vitro*-matured equine oocytes. *Theriogenology*; 47:1139-1156.
19. Dell'Aquila ME, Cho YS, Minoia P, Traina V, Lacalandra GM, et al. 1997. Effects of follicular fluid supplementation of *in-vitro* maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after *in-vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*; 12: 2766-2772.
20. Galli C, Colleoni S, Duchi R, Lagutina I, Lazzari G. 2007. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by *in vitro* procedures ranging from *in vitro* maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci*; 98:39-55.
21. Galli C, Crotti G, Turini P, Duchi R, Mari G, et al. 2002. Frozen-thawed embryos produced by Ovum Pick Up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. *Theriogenology*; 58:705-708.
22. Goudet G, Bezard J, Duchamp G, Gerard N, Palmer E. 1997. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic *in vitro* maturation: effect of follicle size and hormonal environment. *Biol of reprod*; 57:232-245.
23. Goudet G, Bézard J, Belin F, Duchamp G, Palmer E, Gérard N. 1998. Oocyte competence for *in vitro* maturation is associated with histone h1 kinase activity and is influenced by estrous cycle stage in the mare. *Biol of Reprod*; 59:456-462.
24. Grondahl C, Host Hansen T, Hossaini A, Heinze I, Greve T, Hyttel P. 1997. Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro*-matured equine oocytes. *Biol of Reprod*; 57:1495-1501.
25. Hinrichs K. *In Vitro* Production of Equine Embryos: State of the Art. 2010. *Reprod Dom Anim*; 45 (Suppl. 2):3-8.
26. Hinrichs K y Williams K. 1997. Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. *Biol Reprod*; 57:377-384.
27. Hinrichs K, Love C, Brinsko S, Choi Y, Varner D. 2002. In vitro fertilization of *in vitro*-matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization *in vivo* after oviductal transfer. *Biol of reprod*; 67:256-262.
28. Hinrichs K, Schmidt AL, Friedman PP, Selgrath JP, Martin MG. 1993. In vitro maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. *Biol Reprod*; 48:363-370.
29. Hinrichs K, Choi Y, Walckenaer B, Varner D, Hartman D. 2007. *In vitro*-produced equine embryos: Production of foals after transfer, assessment by differential staining and effect of medium calcium concentrations during culture. *Theriogenology*; 68:521-529.
30. Li X, Morris LHA, Allen WR. 2002. *In vitro* development of horse oocytes reconstructed with the nuclei of fetal and adult cells. *Biol Reprod*; 66:1288-1292.

31. Lorenzo P, Lui I, Illera J, Picazo R, Illera M, *et al.* 2001. Influence of epidermal growth factor on mammalian oocyte maturation via tyrosine-kinase pathway. *J Physiol Biochem*; 57(1):15-22.
32. Losinno L, Aguilar J. Reproducción y biotecnologías en la producción equina. Sitio Argentino de Producción Animal. [acceso: 15 Nov. 2008]. URL: http://www.produccionbovina.com/produccion_equinos/curso_equinos_I/14-reproduccion_y_biotecnologias.pdf
33. Lydia G, Saura S, Echegaray A, Martínez F, De Blas I, *et al.* 2005. Effect of the *in vitro* maturation medium on equine oocytes: Comparison of follicular fluid and oestrous mare serum. *Acta Veterinaria Hungarica*; 53 (2):241-248.
34. Marchal R, Caillaud M, Martoriati A, Gérard N, Mermillod P, Goudet G. 2003. Effect of growth hormone (GH) on *in vitro* nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan synthases, and connexins 32 and 43 expression, and GH receptor messenger RNA expression in equine and porcine species. *Biol of Reprod*; 69:1013-1022.
35. McKinnon AO, Lacham-Kaplan O, Trounson AO. 2000. Pregnancies produced from fertile and infertile stallions by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of single frozen-thawed spermatozoa into *in vivo* matured mare oocytes. *J Reprod Fertil Suppl.*; 56:513-517.
36. McPartlin L, Suárez S, Czaya C, Hinrichs K, Bedford-Guaus S. 2009. Hyperactivation of Stallion Sperm Is Required for Successful *in vitro* Fertilization of Equine Oocytes. *Biol of Reprod.*; 81:199-206.
37. Palma G. 2001. Biotecnología de la reproducción. 1a ed. Ediciones Inta Balcarce.
38. Palmer E, Be'zard J, Magistrini M, Duchamp G. 1991. *In vitro* fertilization in the horse: a retrospective study. *J Reprod Fertil Suppl*; 44:375-384.
39. Scott TJ, Carnevale EM, Maclellan LJ, Scoggin CF, Squires E. 2001. Embryo development rates after transfer of oocytes matured *in vivo*, *in vitro*, or within oviducts of mares. *Theriogenology*; 55:705-715.
40. Sepúlveda J, Silva M, y Berland M. 2003. Efecto de la adición de células de granulosa al medio TCM-199 sobre la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos equinos. II Reunión Anual Sociedad de Andrología y Gametología de Chile: IV Jornadas Internacionales de Medicina Reproductiva y Biología de la Reproducción. *J Int Morphol*; 21(2):167-175.
41. Squires E, Wilson J, Kato H, Blaszyk A. 1996. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*; 45:306. Abstract.
42. Tremoleda J, Stout T, Lagutina I, Lazzari G, Bevers M, *et al.* 2003. Effects of *in vitro* production on horse embryo morphology, cytoskeletal characteristics, and blastocyst capsule formation. *Biol of Reprod*; 69:1895-1906.
43. Tremoleda J, Tharasanit T, Van Tol H, Stout T, Colenbrander B, *et al.* 2003. Effects of follicular cells and FSH on the resumption of meiosis in horse oocytes matured *in vitro*. Tesis Doctoral.
44. Vamderwall DK, Woods GL, Roser JF, Schlafer DH, Sellon DC *et al.* 2006. Equine cloning: applications and outcomes. *Rep Fert and Dev.*; 18:91-98.
45. Yoshimura Y, Nakamura Y, Koyama N, Iwashita M, Adachi T, Takeda Y. 1993. Effects of growth hormone on follicle growth, oocyte maturation, and ovarian steroidogenesis. *Fertil Steril*; 59:917-923.
46. Zhang JJ, Boyle MS, Allen WR, Galli C. 1989. Recent studies on *in vivo* fertilization of *in vitro* matured horse oocytes. *J Equine Vet*; 8 (suppl):101-104.
47. Zhang JJ, Muzs LZ, Boyle MS. 1990. *In vitro* fertilization of horse follicular oocytes matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev*; 26:361-365.