

Artículo de Revisión

## BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS EN EQUINOS

### Reproductive biotechnology in horses

Clara Baca Castex<sup>1,2</sup>, Marcelo Miragaya<sup>1,3</sup>

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.38>

<sup>1</sup> Cátedra de Teriogenología,  
INITRA, Facultad de Ciencias  
Veterinarias, Universidad de  
Buenos Aires, Buenos Aires,  
Argentina

<sup>2</sup> Veterinario;

<sup>3</sup> Médico Veterinario, MSc, PhD

E-mail:

marcelo.miragaya@gmail.com

#### RESUMEN

El campo de aplicación de las biotecnologías reproductivas en equinos es muy similar al de humanos: reproducir individuos con barreras fisiológicas y patológicas para reproducirse. A pesar de que la fertilización *in vitro* en equinos aún no ha dado resultados, otras biotecnologías modernas se han aplicado con éxito, como por ejemplo la aspiración folicular transvaginal para la obtención de ovocitos, la transferencia intraoviductal de ovocitos y la inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI). La clonación en equinos surge en 2003, años después del nacimiento de la oveja Dolly y luego de la clonación de varias especies domésticas. El retraso se debió al limitado desarrollo de las técnicas de reproducción asistida más clásicas, necesarias para una clonación exitosa, como ser la maduración de ovocitos y la producción *in vitro* de embriones. Cuando estas tecnologías fueron desarrolladas, la aplicación de la clonación se volvió posible y se obtuvieron crías equinas clonadas.

**Palabras clave:** Reproductive Biotechnology, oocyte, embryo, sperm, equine,

#### INTRODUCCION

En este artículo revisaremos los mayores desarrollos que han jugado un rol fundamental para transformar los ensayos experimentales en prácticas clínicas especializadas para la reproducción de animales de genética superior.

La aplicación de biotecnologías reproductivas en animales domésticos requiere la integración de técnicas de laboratorio con el manejo clínico de las hembras donantes, receptoras y nacimientos. La razón

por la que estas tecnologías se utilizan en la especie equina, son los problemas de infertilidad de machos y hembras, tal cual ocurre en la reproducción asistida en humanos.

#### REVISIÓN DEL TEMA

Muchas de las biotecnologías reproductivas requieren de la obtención de ovocitos. Los ovocitos pueden obtenerse de ovarios extraídos posmortem de yeguas que mueren repentinamente o, en el caso de yeguas vivas, de folículos preovulatorios maduros o

inmaduros. Estos ovocitos pueden tener diferentes destinos: transferencia quirúrgica al oviducto de una receptora, maduración *in vitro* o producción de embriones *in vitro* mediante la técnica de ICSI.

La recuperación de ovocitos en yeguas comenzó aplicándose a folículos preovulatorios, utilizando diversos procedimientos que incluyeron la laparotomía bajo anestesia general, colpotomía y aspiración a través de la fosa paralumbar utilizando agujas largas. Sin embargo, estos métodos resultaron invasivos y su eficacia fue limitada. La técnica más práctica, menos invasiva, eficiente y repetible, utilizada hoy en día, es la aspiración folicular transvaginal con guía ecográfica (Ovum Pick Up, OPU) (Carnevale *et al.*, 2005) (Figura 1).

La técnica consiste en aspirar uno o más folículos del ovario por vía transvaginal, para obtener los ovocitos. Las dos formas principales de recolección de ovocitos en yeguas vivas son:

- 1) Recuperación del ovocito madurado *in vivo* a partir del folículo preovulatorio luego de la aplicación de hCG o Deslorelina (Figura 2). Esta opción suele ser de elección en la técnica de transferencia de ovocitos y las tasas de recuperación de ovocitos oscilan entre un 60 a 80% (Alonso *et al.*, 2010).
- 2) Recuperación de ovocitos inmaduros a partir de todos los folículos visibles, seguido de la maduración *in vitro* en estufa. Se obtienen varios ovocitos inmaduros de un mismo grupo de folículos. Esta técnica se ha realizado en yeguas en temporada reproductiva, en etapa de transición o en el primer trimestre de su gestación, sin que esto afecte la posibilidad de llevar la preñez a término. Esta metodología tiene la ventaja de no requerir ninguna estimulación hormonal previa de la donante pero la tasa de recuperación suele ser menor (43% to 69%) (Colleoni *et al.*, 2007; Galli *et al.*, 2014; Jacobson *et al.*, 2010).

Las yeguas pueden ser sometidas a recolecciones repetidas sin efectos adversos (Bogh *et al.*, 2003; Galli *et al.*, 2002; Vanderwall *et al.*, 2007). Se han reportado programas de recolección fijos cada dos semanas (Jacobson *et al.*, 2010) en yeguas jóvenes experimentales, sin embargo, para donantes infértiles o viejas, como lo son aquellas incluidas en programas clínicos de OPU, es muy difícil establecer programas fijos y resulta preferible adaptar la recolección a las necesidades de la donante individual.

Para la producción de embriones *in vitro*, los ovocitos deben ser recolectados de la yegua donante. Incluso *postmortem* se pueden producir embriones de aquellas yeguas valiosas que mueren o deben ser sacrificadas, recuperando los ovocitos del ovario. Los ovocitos en este caso pueden recuperarse abriendo los folículos y

raspando las paredes internas con una cureta (Ribeiro *et al.*, 2008a). En este caso, los ovarios deben ser recuperados de la yegua lo más rápido posible y enviados al laboratorio a temperatura ambiente. La habilidad de producir embriones o preñeces disminuye luego de las 6 horas *postmortem* (Carnevale *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2008b). Se han obtenido preñeces y potrillos nacidos de casos clínicos *postmortem*, tanto por transferencia de ovocitos como por ICSI (Carnevale *et al.*, 2004; Hinrichs *et al.*, 2012).

La fertilidad de las yeguas generalmente va disminuyendo a partir de los 15 años. Esto se evidencia por alteraciones en la ovulación, úteros que han sufrido lesiones durante el parto o úteros incapaces de albergar embriones. Estos problemas reproductivos dificultan el establecimiento de una preñez o la donación de embriones. Para yeguas viejas y en especial durante los meses de otoño, la incidencia de problemas ovulatorios aumenta (Carnevale, 1998; Carnevale *et al.*, 1994). Es más, esta categoría de yeguas suele presentar fallas de la ovulación repetidamente. Las anomalías oviductales son difíciles de diagnosticar y su potencial como responsables de la baja en la fertilidad es desconocido (Carnevale *et al.*, 1993; Scott *et al.*, 1995). Mientras que las patologías oviductales son poco comunes y difíciles de diagnosticar, las patologías uterinas son comúnmente diagnosticadas en las yeguas. El tratamiento de las infecciones uterinas puede resultar costoso y sin éxito, resultando en el fracaso de estas yeguas como futuras donantes de embriones. Otras patologías, como las laceraciones y adherencias cervicales, afectarán también el potencial de la yegua como donante de embriones.

La transferencia intraoviductal de ovocitos se transforma de esta manera en la instancia siguiente en complejidad a la transferencia embrionaria y una alternativa posible para aquellas yeguas en las que ya no es posible recuperar embriones. En un contexto clínico, la tasa de éxito en términos de preñeces obtenidas por transferencia de ovocitos es de alrededor del 30 a 40% (Carnevale *et al.*, 2001b).

La transferencia de ovocitos (TO) consiste en aspirar uno o más ovocitos del ovario (Figura 3), por vía transvaginal, de una hembra donante cuya genética se desea reproducir, mantenerlo en cultivo de ser necesario y transferirlo al oviducto de una receptora previamente inseminada, en la que se llevará a cabo la fertilización y llevará a término la gestación del producto. Una vez obtenido el ovocito maduro (mediante maduración *in vitro* o *in vivo*) (Figura 4), se procede a la transferencia quirúrgica propiamente dicha al oviducto de la receptora, mediante una laparotomía por el flanco con la yegua en estación. El ovario es exteriorizado y el ovocito se transfiere

utilizando un catéter que permite colocarlo en la ampolla del oviducto (Figura 5), donde se producirá la fertilización. Las receptoras pueden estar exactamente sincrónicas en su ciclo con la donante o ser yeguas anovulatorias y recibir tratamiento hormonal. En ambos casos reciben progesterona hasta los 60 a 100 días de preñez. Once a catorce días luego de la transferencia es posible hacer el diagnóstico de gestación mediante ecografía.

La TO es un procedimiento clínicamente utilizado para producir crías de yeguas donantes valiosas (Baca Castex *et al.*, 2011; Carnevale *et al.*, 2001b; Hinrichs *et al.*, 1998). La técnica surge como consecuencia del fracaso de la FIV. Hasta el 2005, año en que la ICSI y el cultivo embrionario in vitro fueron desarrollados, la TO constituía el único método disponible para producir crías a partir de ovocitos recuperados. El primer reporte efectivo de la TO fue en 1995 por Carnevale y Ginther (Carnevale and Ginther, 1995). En este trabajo obtuvieron un 83% de preñez, sin embargo, en otro trabajo, Carnevale y colaboradores demostraron que estos porcentajes de preñez sólo son repetibles con yeguas y padrillos fértiles (Carnevale *et al.*, 2001a; Carnevale *et al.*, 2000). En programas comerciales, cuando las yeguas son viejas y/o subfértiles y la calidad seminal está comprometida, los porcentajes de preñez son mucho menores (9% - 18%) (Preis *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2001).

La fertilización in vitro (FIV) tradicional no ha tenido buenos resultados en esta especie, sólo se produjeron dos potrillos hace ya más de 24 años (Palmer *et al.*, 1991). La imposibilidad de realizar FIV en equinos ha sido solucionada por el desarrollo y aplicación de la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). En ésta, un único espermatozoide es inyectado directamente en el citoplasma de un ovocito maduro (Figura 6 y 7), utilizando un micromanipulador montado sobre un microscopio invertido. Los cigotos producidos son cultivados in vitro durante 7 a 9 días para permitir el desarrollo embrionario hasta estadios de mórula o blastocisto temprano, factibles de ser transferidos a receptoras previamente sincronizadas.

La técnica de ICSI ha tenido amplia aplicación dentro de la reproducción asistida en humanos para solucionar los casos de infertilidad por factor masculino. Entre las ventajas de esta técnica se incluyen, la posibilidad de utilizar espermatozoides congelados y descongelados, e incluso espermatozoides inmóviles. En los casos de infertilidad por factor masculino o de tener una muestra de semen de baja calidad y/o cantidad, es factible obtener embriones in vitro mediante ICSI. Otra ventaja de esta técnica es que se pueden utilizar muestras de semen congelado o refrigerado con un conteo espermático por debajo de lo requerido para ser utilizadas en

inseminación artificial. Al igual que en la reproducción asistida en humanos, muchos ciclos de OPU (Ovum Pick Up o aspiración de ovocitos) - ICSI se realizan por factores de infertilidad del macho, incluyendo una baja disponibilidad de semen congelado de padrillos muertos y padrillos con fertilidad reducida. Bajo estas condiciones, sólo trabajando con la técnica de ICSI se obtienen porcentajes de fertilización clínicamente aceptables (Herrera *et al.*, 2012).

El uso clínico de la OPU e ICSI en equinos está ganando impulso por diversas razones, que incluyen la posibilidad de tratar muchos casos de infertilidad de hembras y machos, la obtención de crías de yeguas jóvenes y en actividad deportiva y la producción de embriones fuera de la temporada reproductiva fisiológica, es decir, en invierno.

En la década del 2000, la incorporación del Piezo Drill para realizar la ICSI en equinos 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. Las principales ventajas que se obtienen realizando la inyección con este accesorio son: 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 % (Choi *et al.*, 2002; Galli *et al.*, 2002).

En el 2004, con la utilización del DMEM/F-12 + 10% suero fetal bovino como medio de cultivo, combinado con la inyección utilizando el Piezo Drill, la producción de blastocistos alcanzó porcentajes del 20 al 38% (Choi *et al.*, 2004; Hinrichs *et al.*, 2005).

Como dijimos anteriormente, la ICSI permite utilizar espermatozoides de diferentes orígenes. No se observaron diferencias entre la inyección de espermatozoides provenientes de semen fresco o congelado (Choi *et al.*, 2002). Tampoco se observaron diferencias en los porcentajes de división celular y desarrollo embrionario entre semen de padrillos con buena, pobre o nula fertilidad a campo, siempre y cuando se utilizaran para la inyección espermatozoides móviles (Lazzari *et al.*, 2002). En otro estudio, los ovocitos inyectados con espermatozoides inmóviles provenientes de semen sometido a dos ciclos de congelamiento y descongelamiento fueron capaces de desarrollar hasta el estadio de blastocisto. La inyección de espermatozoides equinos desecados también resultó en el desarrollo de embriones por ICSI (Alonso *et al.*, 2011) y con el uso de espermatozoides liofilizados se produjeron blastocistos, preñeces y un potrillo nacido (Choi *et al.*, 2011).

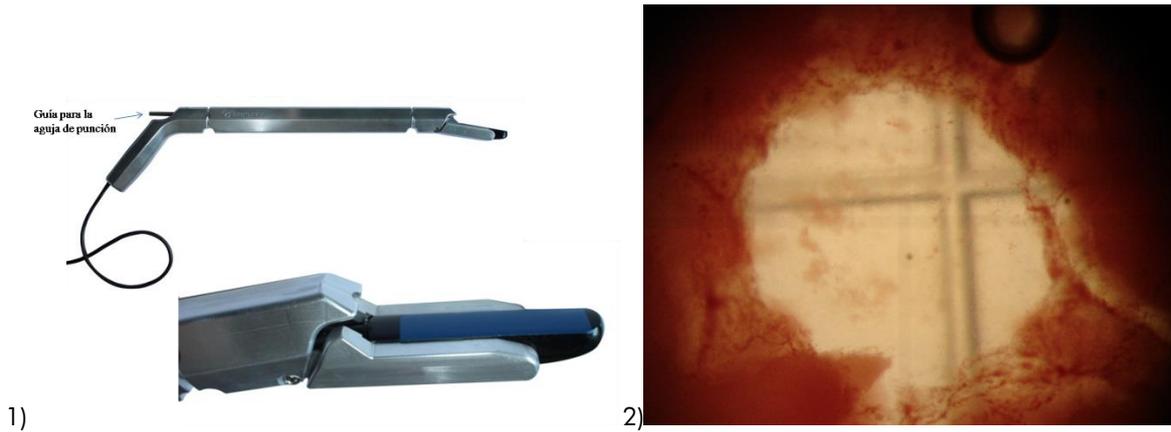


Figura 1. Dispositivo de aspiración transvaginal para la obtención de ovocitos de yeguas vivas.  
Figura 2. Complejo cumulus ovocito (COC) recuperado pos aspiración folicular transvaginal.

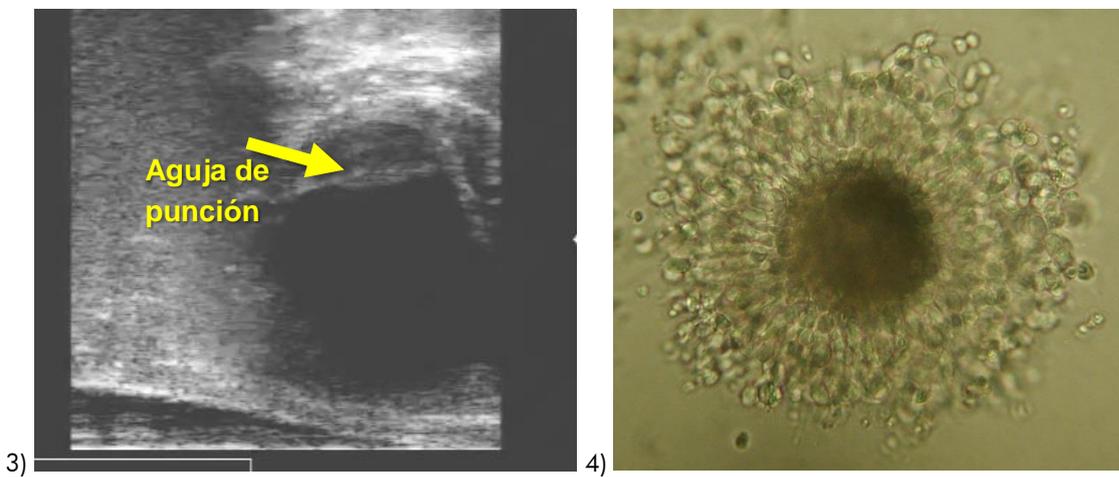


Figura 3. Imagen ecográfica de la punción folicular transvaginal de un folículo preovulatorio.  
Figura 4. Ovocito expandido recuperado por OPU.

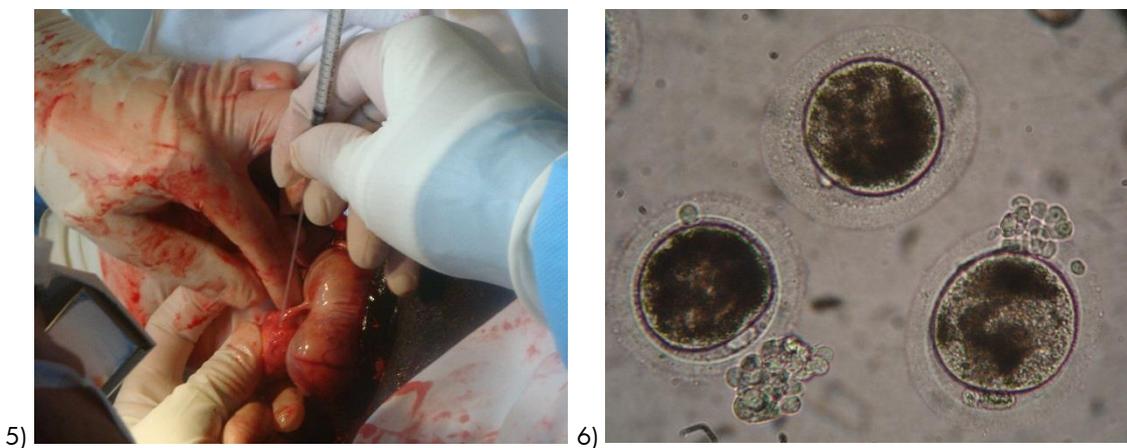


Figura 5. Transferencia intraoviductal del COC por laparotomía.  
Figura 6. Ovocitos maduros desnudos previo a la ICSI.

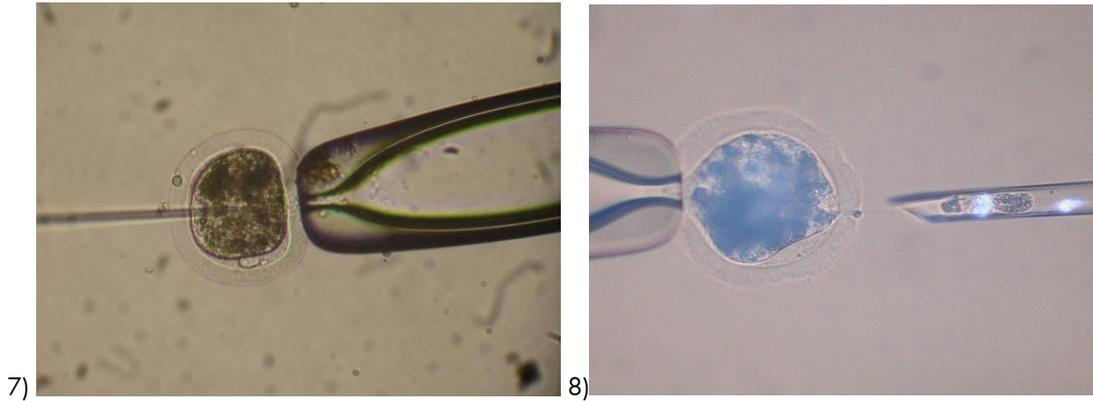


Figura 7. Inyección intracitoplasmática de un espermatozoide.  
Figura 8. Enucleación del ovocito para la obtención del ooplasto.

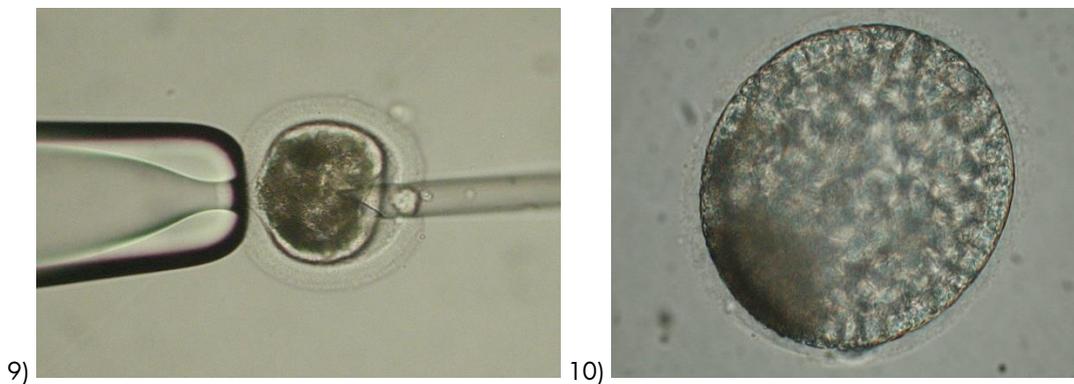


Figura 9. Inyección de un fibroblasto al citoplasto.  
Figura 10. Blastocisto obtenido por transferencia nuclear de células somáticas luego de 7 días de cultivo.

Cuando comparamos el número de células contenidas en los embriones de 7 días de desarrollo producidos in vivo respecto de los producidos in vitro, observamos que los embriones producidos in vitro poseen un número de células significativamente menor y se asemejan a embriones de día 5 (Tremoleda *et al.*, 2003). Esta diferencia debe ser tomada en cuenta a la hora de la transferencia a las receptoras sincronizadas. Los porcentajes de preñez por transferencia de embriones producidos in vitro son similares a los obtenidos con embriones recuperados in vivo.

La ventaja de obtener embriones de estadios de desarrollo temprano es que la criopreservación puede ser una herramienta a utilizar. De hecho, es notoria la dificultad para congelar embriones recuperados in vivo debido al gran tamaño que poseen. Los embriones producidos in vitro pueden ser congelados en los

estadios de mórula o blastocisto temprano para optimizar la supervivencia pos descongelado.

Las yeguas son monovulares: con la onda folicular primaria, lo común es que un solo folículo se convierta en dominante y varios folículos subordinados regresen; el folículo dominante se convierte en preovulatorio y ovula. El porcentaje de ovulaciones dobles es bajo, dependiendo de la raza. La ovulación en las yeguas sólo se produce a través de la fosa de ovulación por lo que, cuando hay más de 3 folículos preovulatorios, se produce un bloqueo físico ya que estos folículos compiten entre sí para alcanzar la fosa de ovulación. Además, la acumulación excesiva de sangre coagulada en la fosa de ovulación después de la superovulación puede interferir en el transporte de ovocitos.

El éxito de las tecnologías reproductivas de avanzada en la yegua podría optimizarse con una efectiva

superovulación que provea múltiples ovocitos y/o múltiples embriones para la transferencia de embriones, la transferencia de ovocitos y la ICSI. La superovulación incrementaría los porcentajes de preñez en yeguas normales así como en yeguas y padrillos subfértiles. Durante los últimos 38 años (Lapin and Ginther, 1977), muchos investigadores han ensayado diferentes protocolos hormonales utilizando gonadotropina coriónica equina (eCG), hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), inmunización contra la inhibina, extracto de pituitaria equina (EPE), hormona foliculo estimulante porcina (pFSH) y preparados purificados de hormona foliculo estimulante equina (eFSH) para inducir superovulación en yeguas cíclicas (Squires, 2006). Sin embargo, los porcentajes de éxito han sido limitados e inconsistentes.

Actualmente existen estudios con resultados más alentadores utilizando gonadotropinas recombinantes: hormona luteinizante equina recombinante (reLHe) y hormona foliculo estimulante equina recombinante (reFSHe). Las hormonas recombinantes son más puras, pueden estar disponibles en altas cantidades y constituyen un producto fiable libre de otras hormonas o posibles contaminantes.

El uso de gonadotropinas equinas recombinantes aumentaría la eficiencia reproductiva de muchas maneras: 1) induciendo superovulación e incrementando la cantidad de embriones disponibles en los programas de TE; 2) incrementando el número de ovocitos para la transferencia de ovocitos; 3) incrementando el número de ovocitos para la ICSI; 4) induciendo la actividad ovárica en el anestro lactacional o en yeguas viejas; 5) incrementando el número de ovulaciones favoreciendo el uso de padrillos subfértiles con baja calidad seminal u oligospermia; 6) estimulando la actividad folicular y ovulación en yeguas en anestro profundo bajo un régimen lumínico; 7) adelantando la primera ovulación del año en yeguas en transición de primavera (Roser and Meyers-Brown, 2012b).

Recientemente, el uso de reFSHe ha demostrado ser eficaz en inducir superovulación y múltiple producción in vivo de embriones en yeguas en estación reproductiva y anovulatorias (Meyers-Brown *et al.*, 2010; Roser and Meyers-Brown, 2012a; Ross *et al.*, 2012). La utilización de reFSHe en yeguas donantes ovulatorias, permite incrementar las tasas de producción de embriones y preñeces por ciclo de tratamientos acortando los periodos de trabajo e incrementando la eficiencia global por donante (Losinno *et al.*, 2013).

El Diagnóstico Genético Preimplantatorio (PGD) fue reportado en humanos en 1990 (Handyside *et al.*, 1990) y hoy en día es utilizado en clínicas de FIV

alrededor del mundo para realizar el diagnóstico de ciertas enfermedades hereditarias en parejas de riesgo.

El primer reporte de biopsia embrionaria en equinos fue publicado por Huhtinen y colaboradores en 1997 (Huhtinen *et al.*, 1997), quienes tomaron biopsias de 14 embriones de 6 días, utilizando un micromanipulador, obteniendo posteriormente tres preñeces pos transferencia. En 2009 se secuenció el genoma equino y se logró asociar con 40 enfermedades y más de 20 fenotipos (Wade *et al.*, 2009).

El PGD puede utilizarse para determinar el sexo de los embriones recuperados por lavaje uterino en programas comerciales de transferencia embrionaria antes de ser transferido a una receptora. Se realiza una biopsia del embrión mediante micromanipulación y las células extraídas son analizadas genéticamente mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para saber si el embrión producirá una cría hembra o macho. El resultado de la PCR puede obtenerse el mismo día de la recuperación embrionaria, de esta forma, se podrían transferir únicamente los embriones del sexo deseado. En razas como la Polo Argentino, los criadores prefieren a las hembras porque resultan más fáciles de entrenar y son más ágiles, es por esto que el PGD se ha implementado con éxito para satisfacer estas necesidades ligadas al ámbito deportivo (Herrera *et al.*, 2014a; Herrera *et al.*, 2014b).

El PGD convencional involucra la obtención de las blastómeras y no compromete la viabilidad del embrión siempre y cuando se realice delicadamente. La aspiración del líquido contenido en el blastocelo es una nueva técnica más simple que permite obtener ADN genómico de los blastocistos y determinar el sexo más rápidamente (Herrera *et al.*, 2015a; Herrera *et al.*, 2015b). Últimamente muchos laboratorios han reportado biopsias exitosas en embriones tempranos (6-7 días) con porcentajes de preñez entre 21 y 75% (Herrera *et al.*, 2014a; Seidel *et al.*, 2010; Troedsson *et al.*, 2010).

La clonación es el proceso que permite generar un organismo genéticamente idéntico a otro. En la actualidad, se pueden producir clones de manera artificial mediante una técnica de micromanipulación llamada Transferencia Nuclear de Células Somáticas (SCNT: Somatic Cell Nuclear Transfer). Esta técnica consiste en fusionar, mediante un pulso eléctrico, una célula somática (célula adulta del organismo) que contiene todos los cromosomas del individuo que se desea clonar, con un ovocito al que previamente se le extrajo el núcleo (Figura 8) y que, por ende, carece de información genética. A partir de aquí, el núcleo de la célula donante (Figura 9), en su nuevo ambiente

citoplasmático, adquiere la capacidad de reprogramarse y comenzar a dividirse generando un embrión (Figura 10) que es transferido a una yegua sincronizada que lo gesta y que dará origen a un individuo nacido o clon genéticamente idéntico al original. La muestra de célula somática corresponde a los fibroblastos obtenidos a partir de una pequeña biopsia de piel.

El objetivo de utilizar la clonación en equinos es recuperar como reproductores a ejemplares con características de interés para sus propietarios. Estas pueden ser fenotípicas o conformacionales, de performance o de progenie. Por lo tanto, si se logra obtener una potranca nacida viva mediante clonación, ésta podría ser utilizada como reproductora, nuevamente. Esto es conocido como clonación reproductiva. Otro caso interesante en el cual la clonación podría tener una aplicación comercial es el de los machos. Muchos de los de alta performance deportiva son castrados y, por lo tanto, han perdido la capacidad de reproducirse. Si esos machos son clonados, los nuevos potrillos nacidos pueden ser mantenidos como machos enteros para ser utilizados como reproductores y así continuar la línea genética. El macho castrado puede seguir compitiendo mientras que su clon es utilizado como reproductor. También en el caso de un reproductor excepcional, la senescencia reproductiva disminuye progresiva e inexorablemente su capacidad productiva y la clonación podría prolongar su vida reproductiva.

La clonación equina mediante la técnica de SCNT se describió por primera vez en 2003 (Galli *et al.*, 2003). En ese mismo año se produjeron 3 mulas a partir de células somáticas fetales y ovocitos recuperados por OPU y madurados in vivo (Woods *et al.*, 2003) y transferidos al oviducto de yeguas receptoras inmediatamente pos activación. Ese mismo año, el equipo del Dr Galli, en Italia, consiguió el primer clon en la especie equina. El primer caballo fue una potranca, originada por transferencia nuclear de células somáticas adultas dentro de ovocitos madurados in vitro y cultivados hasta el estadio de blastocisto previo a la transferencia no quirúrgica a yeguas receptoras (Galli *et al.*, 2003).

Actualmente hay más de 150 equinos obtenidos por clonación en el mundo, entre los que se incluyen clones de importantes jugadoras argentinas. No obstante, la gran mayoría corresponden a empresas privadas de biotecnología, que prefieren no difundir sus resultados en el ámbito científico. El primer nacido vivo en Latinoamérica fue fruto del trabajo de cooperación entre la Cátedra de Teriogenología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA, el Laboratorio de Reproducción Equina de la Universidad Nacional de Río Cuarto y Halitus Instituto Médico (Miragaya, 2008). Hoy en día varios laboratorios en el mundo

ofrecen la clonación en forma comercial. Existen equinos nacidos por clonación en Estados Unidos, Italia y Argentina.

El éxito de la SCNT en equinos es el resultado de la optimización de varios pasos involucrados en el procedimiento de la clonación, los mismos principios que en otras especies. El primer paso es la obtención y criopreservación de la línea celular, generalmente obtenida a partir de una biopsia de piel del animal donante a clonar. El desarrollo a blastocisto de los embriones producidos mediante SCNT está influenciado por la línea celular (Lagutina *et al.*, 2005) y varía entre 0 y 17%. La maduración in vitro de ovocitos es la única fuente sustentable de ovocitos para clonación y su calidad es crítica al igual que para la ICSI. Las limitantes incluyen el número de ovarios que pueden obtenerse de los frigoríficos y el pequeño número de folículos presentes en los ovarios.

Existen dos métodos de clonación, el libre de zona pelúcida (zona free) y con la zona pelúcida intacta. El método de zona free maximiza el número de ovocitos debido a los altos porcentajes de enucleación y de fusión celular ovocito-célula somática que se obtienen (Lagutina *et al.*, 2007). Ésta elevada eficiencia también puede obtenerse con la utilización del piezo drill para la enucleación e inyección de la célula somática (Hinrichs *et al.*, 2006). Con el método de zona free se obtiene un desarrollo pre implantación de 17 a 25%, comparable a los resultados obtenidos por ICSI de ovocitos de faena (Lagutina I, datos no publicados). Desde el punto de vista técnico, existen algunas ventajas en la técnica de zona libre. Por un lado la simplificación del proceso de enucleación luego de la remoción de la zona pelúcida; requiere menos tiempo y menos destreza manual. Segundo, se obtienen mejores porcentajes de fusión optimizando el uso de los ovocitos. Existe una desventaja, la necesidad de cultivar individualmente a los embriones. Este requerimiento puede complicar un poco el trabajo y es imposible en estos casos transferir embriones en estadios tempranos de clivaje. La limitación del cultivo puede ser superada mediante el sistema de cultivo WOW (well of the well) y mediante la utilización del medio de cultivo SOF para el desarrollo embrionario in vitro hasta el estadio de blastocisto (Lagutina *et al.*, 2007).

La agregación embrionaria ha demostrado incrementar la eficiencia de la clonación. Los porcentajes de blastocistos al día 7 se incrementan cuando la agregación se realiza con hasta cuatro cigotos. Más allá de los 4 cigotos reconstruidos, el porcentaje de blastocistos no aumenta. Los embriones clonados y agregados son más grandes inicialmente, pero el tamaño del embrión in vitro es compensado luego del día 8. Sólo los embriones agregados en grupos de 3 y de 4 llevaron al nacimiento de potrillos

clonados. Por lo tanto, el desarrollo de los embriones clonados mediante la técnica de zona free puede incrementarse mediante la agregación embrionaria de hasta 4 cigotos (Gambini *et al.*, 2014).

Los embriones clonados pueden ser criopreservados de manera exitosa y se han obtenido crías por transferencia de éstos embriones (Galli, datos no publicados). Los embriones clonados poseen menor habilidad para establecer una preñez comparado con los embriones de ICSI (Lagutina *et al.*, 2005). Por esta razón, Galli *et al.* (2014) transfieren normalmente 2 embriones clonados por receptora; ocasionalmente se obtienen preñeces dobles que luego serán reducidos mediante manipulación transrectal. El desarrollo a término de las preñeces de clones es bajo al igual que en otras especies; sin embargo, la mayoría de las pérdidas ocurren temprano durante la gestación (antes del día 50). Los potrillos son normales y no se han reportado los problemas descritos en rumiantes como hidropesía, hiperplasia de placenta, etc. La mayoría de los nacidos son normales, requieren mínima asistencia al nacimiento (Johnson *et al.*, 2010) y desarrollan a adultos fértiles. Sin embargo, el número de clones nacidos es aún muy pequeño.

## CONCLUSIONES

En este artículo se ha discutido la contribución de la OPU, la ICSI y la clonación en la reproducción de equinos durante los últimos 25 años. La OPU, la ICSI y el cultivo embrionario son técnicas que se utilizan de manera exitosa en la industria equina para obtener embriones de aquellas yeguas que han perdido total o parcialmente su capacidad de producir crías y en muchos casos representa la única opción disponible. Lo mismo se aplica a los padrillos que tienen una fertilidad disminuida o para aquellos casos en los que la disponibilidad de semen es insuficiente para realizar una inseminación artificial. Los embriones pueden ser obtenidos fuera de la temporada reproductiva y pueden ser congelados para ser transferidos más tarde, convirtiendo a éstas técnicas en algo flexible y versátil en programas clínicos. Los porcentajes de preñez obtenidos luego de la transferencia no quirúrgica de los embriones criopreservados producidos por ICSI es similar a los reportados al transferir embriones frescos o refrigerados producidos por transferencia embrionaria convencional, mostrando que el uso de OPU-ICSI-cultivo embrionario in vitro ofrece una verdadera oportunidad para reproducir individuos de valiosa genética.

La clonación equina es hoy en día una técnica reproducible que ofrece la oportunidad de preservar genética valiosa y generar copias de animales castrados o muertos y por tanto crías de éstos campeones que de otra forma no podrían haberse obtenido. Las crías de equinos clonadas no presentan

los problemas placentarios, fetales o neonatales descritos en otras especies. Es más, los primeros dos clones equinos alcanzaron la pubertad y mostraron una performance reproductiva normal.

## REFERENCIAS

- Alonso A, Baca Castex C, Ferrante A, Pinto M, Castañeira C, Trasorras V, Gambarotta M, Losinno L, Miragaya M. Intracytoplasmic sperm injection of equine oocytes with air dried sperm: effect of activation with sperm extract and intrafallopian transfer. In: Havemeyer foundation workshop, Equine in vitro fertilization, 2011, p. 15.
- Alonso A, Baca Castex C, Pinto M, Ferrante A, Miragaya M. Primer preñez obtenida en Argentina por transferencia de ovocitos de una yegua de polo de reconocida trayectoria. La especie equina, 2010; 46-53.
- Baca Castex C, Alonso A, Pinto M, Ferrante A, Miragaya M. Primer equino nacido en Latinoamérica por la técnica de transferencia de ovocitos. . La especie equina. AAVE. 2011, 34-35.
- Bogh IB, Brink P, Jensen HE, Lehn-Jensen H, Greve T. Ovarian function and morphology in the mare after multiple follicular punctures. Equine Vet J 2003; 35: 575-579.
- Carnevale EM. Folliculogenesis and ovulation. In: Rantanen, N.W., McKinnon, A.O. (Eds.), Equine Diagnostic Ultrasonography. Williams & Wilkins, Baltimore. 1998; 201-211.
- Carnevale EM, Bergfelt DR, Ginther OJ. Follicular activity and concentrations of FSH and LH associated with senescence in mares. Anim. Reprod. Sci. 1994; 35, 231-246.
- Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Panzani D, Stokes JE, Squires EL. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. Theriogenology 2005; 64: 519-527.
- Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Preis KA, Stokes JE, Squires EL. Establishment of pregnancies from oocytes collected from the ovaries of euthanized mares. Proc Am Assoc Equine Pract 2004; 50: 531-533.
- Carnevale EM, Ginther OJ. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. Biol Reprod Monogr 1 (Equine Reproduction VI), 1995; 209-214.
- Carnevale EM, Griffin PG, Ginther OJ. Age-associated subfertility before entry of embryos into the uterus in mares. . Equine Vet. J. Suppl. 1993; 15: 31-35.
- Carnevale EM, Maclellan LJ, Coutinho da Silva MA, Checure CM, Scoggin CF, Squires EL. Equine sperm-oocyte interaction: results after intraoviductal and intrauterine inseminations of recipients for oocyte transfer. Anim Reprod Sci 2001a; 68; 305-314.

- Carnevale EM, Maclellan LJ, Coutinho da Silva MA, Scott TJ, Squires EL. Comparison of culture and insemination techniques for equine oocyte transfer. *Theriogenology* 2000; 54: 981-987.
- Carnevale EM, Squires EL, Maclellan LJ, Alvarenga MA, Scott TJ. 2001b, Use of oocyte transfer in a commercial breeding program for mares with reproductive abnormalities. *J Am Vet Med Assoc* 2001b; 218: 87-91, 37.
- Choi YH, Love CC, Love LB, Varner DD, Brinsko S, Hinrichs K. 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* 2002; 123: 455-465.
- Choi YH, Roasa LM, Love CC, Varner DD, Brinsko SP, Hinrichs K. Blastocyst formation rates in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* 2004; 70: 1231-1238.
- Choi YH, Varner DD, Love CC, Hartman DL, Hinrichs K. Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. *Reproduction* 2011; 142: 529-538.
- Colleoni S, Barbacini S, Necchi D, Duchi R, Lazzari G, Galli C. Application of ovum-up, intracytoplasmic sperm injection and embryo culture in equine practice. *Proceedings of the American Association for Equine Practitioners (AAEP)* 2007; 53: 554-559.
- Galli C, Crotti G, Turini P, Duchi R, Mari G, Zavaglia G, Duchamp G, Daels P, Lazzari G. Frozen-thawed embryos produced by Ovum Pick Up and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. *Theriogenology* 2002; 58: 713-715.
- Galli C, Duchi R, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology* 2014; 81: 138-151.
- Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature* 2003; 424: 635.
- Gambini A, De Stefano A, Bevacqua RJ, Karlanian F, Salamone DF. The aggregation of four reconstructed zygotes is the limit to improve the developmental competence of cloned equine embryos. *PLoS One* 2014; 9: e110998.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston, R. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344, 768-770.
- Herrera C, Dufourq P, Freije M, Morikawa I, Centeno JE, Aristi V, Menghini L, Sporleder C. Selection of Stallions for in vitro Embryo Production by ICSI in a Commercial Program. . *Equine Embryo Transfer Society Meeting*. 2012
- Herrera C, Morikawa M, Castex CB, Pinto M, Ortega N, Fanti T, Garaguso R, Franco M, Castañares M, Castañeira C. Sex Determination of Equine Embryos by PCR using Blastocle Fluid. *Reproduction, Fertility and Development* 2015a; 27: 247-248.
- Herrera C, Morikawa MI, Baca Castex C, Pinto MR, Ortega N, Fanti T, Garaguso R, Franco MJ, Castanares M, Castaneira C, Losinno L, Miragaya MH, Mutto AA. Blastocle fluid from in vitro- and in vivo-produced equine embryos contains nuclear DNA. *Theriogenology* 2015b; 83: 415-420.
- Herrera C, Morikawa MI, Bello MB, von Meyeren M, Centeno JE, Dufourq P, Martinez MM, Llorente J. Setting up equine embryo gender determination by preimplantation genetic diagnosis in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology* 2014a; 81: 758-763.
- Herrera C, Morikawa MI, Goya F, Llorente J. Equine embryo gender determination by Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) on the same day of flushing *Journal of Equine Veterinary Science* 2014b; 34: 172-173.
- Hinrichs K, Choi YH, Love CC, Chung YG, Varner DD. Production of horse foals via direct injection of roscovitine-treated donor cells and activation by injection of sperm extract. *Reproduction* 2006; 131: 1063-1072.
- Hinrichs K, Choi YH, Love LB, Varner DD, Love CC, Walckenaer BE. Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. *Biol Reprod* 2005; 72: 1142-1150.
- Hinrichs K, Choi YH, Norris JD, Love LB, Bedford-Guass SJ, Hartman DL, Velez IC. Evaluation of foal production following intracytoplasmic sperm injection and blastocyst culture of oocytes from ovaries collected immediately before euthanasia or after death of mares under field conditions. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2012; 241, in press.
- Hinrichs K, Matthews GL, Freeman DA, Torello EM. Oocyte transfer in mares. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 212: 982-986.
- Huhtinen M, Peippo J, Bredbacka P. Successful transfer of biopsied equine embryos. *Theriogenology* 1997; 48: 361-367.
- Jacobson CC, Choi YH, Hayden SS, Hinrichs K. Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2010; 73: 1116-1126.
- Johnson AK, Clark-Price SC, Choi YH, Hartman DL, Hinrichs K. Physical and clinicopathologic findings in foals derived by use of somatic cell nuclear transfer: 14 cases (2004-2008). *J Am Vet Med Assoc* 2010; 236: 983-990.
- Lagutina I, Lazzari G, Duchi R, Colleoni S, Ponderato N, Turini P, Crotti G, Galli C. Somatic

- cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction* 2005; 130: 559-567.
- Lagutina I, Lazzari G, Duchi R, Turini P, Tessaro I, Brunetti D, Colleoni S, Crotti G, Galli C. Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep. *Theriogenology* 2007; 67: 90-98.
  - Lapin DR, Ginther OJ. Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with an equine pituitary extract. *J Anim Sci* 1977; 44: 834-842.
  - Lazzari G, Crotti G, Turini P, Duchi R, Mari G, Zavaglia G, Barbacini S, Galli C. Equine embryos at the compacted morula and blastocyst stage can be obtained by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro matured oocytes with frozen-thawed spermatozoa from semen of different fertilities. *Proceedings of the 8th International Equine Reproduction Symposium on equine Reproduction*. 2002; 58: 709-712.
  - Losinno L, Miragaya MH, Mutto A, Bereterbide S, MacDonough J, Pietrani M, Colgin M, Ross PJ. Hiperestimulación folicular y producción de embriones in vivo de yeguas ovulatorias y anovulatorias utilizando FSH equina recombinante. *Reproducción equina III*, 2013; 252-256.
  - Meyers-Brown GA, McCue PM, Niswender KD, Squires EL, DeLuca CA, Bidstrup LA, Colgin M, Famula TR, Roser JF. Superovulation in Mares Using Recombinant Equine Follicle Stimulating Hormone: Ovulation Rates, Embryo Retrieval, and Hormone Profiles. *Journal of Equine Veterinary Science* 2010; 30: 560-568.
  - Miragaya M. Primer preñez de un clon equino en Latinoamérica. *La especie equina* 2008; 22: 38-40.
  - Palmer E, Bezard J, Magistrini M, Duchamp G. In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. *J Reprod Fertil Suppl* 1991; 44: 375-384.
  - Preis KA, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Caracciolo di Brienza V, Gomes GM, Maclellan LJ, Squires EL. In vitro maturation and transfer of equine oocytes after transport of ovaries at 12 or 22 degrees C. *Theriogenology* 2004; 61: 1215-1223.
  - Ribeiro B, Love L, Choi Y, Hinrichs K. 2008a, Transport of equine ovaries for assisted reproduction. *Animal Reproduction Science*, 2008a; 108: 171-179.
  - Ribeiro BI, Love LB, Choi YH, Hinrichs K. Transport of equine ovaries for assisted reproduction. *Anim Reprod Sci* 2008b, 108: 171-179.
  - Roser JF, Meyers-Brown MS. Superovulation in the mare: a work in progress. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2012a; 32: 376-386.
  - Roser JR, Meyers-Brown G. Superovulation in the Mare: A Work in Progress. *Journal of Equine Veterinary Science* 2012b; 32: 376-386.
  - Ross PJ, MacDonough J, Bereterbide S, Garzaron A, Balbuena G, Pietrani M, Miragaya MH, Mutto A, Colgin M, Losinno L. Superovulation of cycling donor mares using recombinante equine gonadotropins and different ovulation induction agents. 8th ISEET Abstracts/ *Journal of Equine Veterinary Science* 2002; 32, 403.
  - Scott MA, Liu IKM, Overstreet JW. Sperm transport to the oviducts: abnormalities and their clinical implications. In: *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 1995, Lexington, KY, 1-2.
  - Scott TJ, Carnevale EM, Maclellan LJ, Scoggin CF, Squires EL. Embryo development rates after transfer of oocytes matured in vivo, in vitro, or within oviducts of mares. *Theriogenology* 2001; 55: 705-715.
  - Seidel GE, Cullingford EL, Stokes JE, Carnevale EM, McCue PM. Pregnancy rates following transfer of biopsied and/or vitrified equine embryos: evaluation of two biopsy techniques. *Anim. Reprod. Sci.* 2010; 121S: 297-298.
  - Squires EL. Superovulation in mares. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2006; 22: 819-830.
  - Tremoleda JL, Stout TA, Lagutina I, Lazzari G, Bevers MM, Colenbrander B, Galli C. Effects of in vitro production on horse embryo morphology, cytoskeletal characteristics, and blastocyst capsule formation. *Biol Reprod*, 2003; 69: 1895-1906.
  - Troedsson MHT, Paprocki AM, Koppang RW, Syverson CM, Griffin P, Klein C, Dobrinski JR. Transfer success of biopsied and vitrified equine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 2010; 121(Suppl. 1-2): S295-S296.
  - Vanderwall DK, Rasmussen DM, Woods GL. Effect of repeated administration of oxytocin during diestrus on duration of function of corpora lutea in mares. *J Am Vet Med Assoc* 2007; 231:1864-1867.
  - Wade CM, Giulotto E, Sigurdsson S, Zoli M, Gnerre S, Imsland F, Lear TL, Adelson DL, Bailey E, Bellone RR, Blöcker H, Distl O, Edgar RC, Garber M, Leeb T, Mauceli E, MacLeod JN, Penedo MC, Raison JM, Sharpe T, Vogel J, Andersson L, Antczak DF, Biagi T, Binns MM, Chowdhary BP, Coleman SJ, Della Valle G, Fryc S, Guérin G, Hasegawa T, Hill EW, *et al.* Genome Sequence, Comparative Analysis, and Population Genetics of the Domestic Horse. *Science*, 2009. 326:865-867.
  - Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, 2003; 301:1063.