

Artículo de revisión

CLONACIÓN ANIMAL: SOLUCIÓN A PROBLEMAS REPRODUCTIVOS Y FISIOLÓGICOS DE ANIMALES DE ÉLITE

Animal cloning: reproductive and physiological problems solution in elite animals

M. Moreno-Millán y S. E. Demyda

*Laboratorio de Citogenética Animal Aplicada y Molecular, Departamento de Genética,
Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba, 14071-Córdoba (España)
E.mail: ge1momim@uco.es*

RESUMEN

Las nuevas biotecnológicas reproductivas han abierto posibilidades impensables hace algunos años que hoy día son realidad y que podríamos decir incluso una realidad rutinaria. Los problemas reproductivos de los animales, ya sean estrictamente reproductivos, fisiológicos o incluso de imposibilidad de reproducción porque el animal haya muerto, quedan sobradamente solventados con la metodología de la clonación. Para ello ha hecho falta todo un desarrollo y optimización de muy diversas técnicas reproductivas y del control de muchas variables. El resultado es que disponemos de una metodología de clonación que nos permite mantener en el tiempo aquellos genotipos o animales de alto valor, sea genético, económico o sentimental. Así la puesta a punto de la metodología de la transferencia nuclear lo ha propiciado, unida a otras técnicas como la fecundación *in vitro* (FIV), la inyección intracelular de esperma (ICSI), la transferencia

de embriones (TE) y técnicas de cultivo celulares. Se han obtenido resultados extraordinarios en la clonación reproductiva, el rescate de animales castrados e incluso de animales muertos de forma natural o por accidentes. Pero existe un hecho biológico que conviene considerar. Cuando se habla de clonación no podemos decir que el animal obtenido (el clon) va a tener las mismas características que el animal original. El genoma no es estático sino que se ve influenciado y modulado constantemente. El fenotipo de un animal es el resultado de la interacción de su propio genoma y del ambiente. Los procesos epigenéticos juegan un papel fundamental en el resultado final, además de que en el animal clonado existe una información genética proveniente del óvulo receptor del núcleo de la célula del animal a clonar, es decir, el genoma mitocondrial materno que también tiene su influencia.

Palabras clave: *clonación, animal, reproducción*

ABSTRACT

The Reproductive biotechnology has opened new possibilities unthinkable some years ago and they are a reality today. Even more we might say a routine reality. Reproductive problems of animals, whether strictly reproductive, physiological, or because of death of the animals, they are amply solved with cloning methodology. To reach it a development and optimization of different reproductive techniques and control of many variables are needed. The result is that we have a cloning methodology that allows us to maintain over time those genotypes or high-value animals, whether genetic, economic or sentimental. So the development of the methodology of nuclear transfer, together with other techniques such as *in vitro* fertilization (IVF), intracellular sperm injection (ICSI), embryo transfer (ET) and cell culture techniques, has led it. We have obtained excellent results in reproductive cloning, rescue castrated animals and even dead animals in natural or by accident way. But there is a biological fact that should be considered. When we talk about cloning, we can not to say that the animal obtained (clone) will have the same characteristics as the original animal. The genome is not static but is constantly influenced and modulated. The phenotype of an animal is the result of interaction of their own genome and the environment. Epigenetic processes play a major role in the outcome. In addition, in the cloned animal a genetic information from the recipient egg of the nucleus of the cell of the animal to clone, ie maternal mitochondrial genome, also has its influence.

Keywords: *cloning, animal, reproduction*

INTRODUCCIÓN

Cuando se habla de clonación nos estamos refiriendo a una de las biotecnologías recientes que posiblemente tenga más proyección e impacto sobre la sociedad. Cuando nos referimos a clonación todo el mundo piensa en la obtención de seres idénticos a partir de la información genética existente en una célula. Este hecho ha de quedar meridianamente claro desde el inicio que no es ni será así. La clonación no significa eso sino otra cosa. Pero antes de sumergirnos en el desarrollo de lo que en el título de trabajo queremos expresar hemos de comenzar por hacer un brevísimo repaso a las nuevas metodologías en biotecnología que han conducido, todas ellas, en mayor o menor escala, al desarrollo de la clonación Animal y sus posibilidades.

Las biotecnologías reproductivas están formadas por muy diversas metodologías que van desde la inseminación artificial, iniciada en 1898, hasta la transgénesis, de muy reciente aparición, pasando por la transferencia embrionaria, iniciada en 1974; la fecundación *in vitro* (FIV), iniciada en 1991; la transferencia de ovocitos, iniciada en 1995; la inyección espermática intracelular (ICSI), iniciada en 1996; el sexado espermático; el sexado embrionario, hasta la propia clonación iniciada de forma sistemática en animales de alto valor (particularmente equidos) en 2003.

Toda ésta nueva biotecnología y su importancia científica se inició como consecuencia del nacimiento, el día 25 de Julio de 1978, del primer “niño probeta”, Louise Brown, como consecuencia de un proceso de fecundación *in vitro*. Fueron los Dres. Patrick Steptoe y Robert Geoffrey Edwards los que lo consiguieron ese año en el Reino Unido. En España se consiguió en 1984. En 2010 el Dr. Edwards fue galardonado con el Premio Nobel en Fisiología y Medicina en reconocimiento a su labor científica. El paso al uso de ésta metodología en animales se retrasó algo iniciándose alrededor de los años 90. En el presente artículo haremos una breve revisión de la clonación como una técnica biotecnológico-reproductiva de gran importancia

para la resolución de muchos problemas de índole reproductivo y productivo.

REVISIÓN DEL TEMA

Debemos iniciar la revisión de la clonación indicando que simultáneamente y sobre todo en el tiempo inmediatamente posterior a la fecha del nacimiento del primer “niño (en este caso niña) probeta” se produce una intensa puesta a punto, podríamos decir en todos los grandes laboratorios de investigación, de todas las técnicas reproductivas y como consecuencia se produce el primer caso del nacimiento de un animal “clonado”, Dolly, la oveja Dolly que nació el 5 de Julio de 1996, el animal que los investigadores del Instituto Roslin de Edimburgo (Escocia), liderados por Ian Wilmut, consiguieron mediante la metodología de la transferencia nuclear desde una célula donante adulta a un óvulo no fecundado y sin núcleo y que después fue implantado a una hembra portadora.

A partir de este hito el uso de estas metodologías se generalizó. Respecto a la clonación de otras especies de animales doméstico de más alto valor, como es el caso del ganado vacuno y particularmente de los équidos, se comenzaron a obtener animales clonados cada vez con más facilidad a medida que la metodología se hacía más y más rutinaria, es decir, se conocían y controlaban más variables en todo el proceso. No hace falta señalar que estas biotecnologías son muy complejas y no tanto por la metodología en sí cuanto por el sistema biológico con el que se trabaja. De manera que rápidamente se comenzaron a obtener clones de ganado vacuno, siendo Pampa, de raza Jersey, la primera vaca clonada y obtenida en Sudamérica, en Argentina (2001), mediante la metodología usada con Dolly, pero en éste caso fue gestada a partir de la clonación de fibroblastos obtenidos de piel fetal por el equipo del Dr. Carlos Melo. Posteriormente se obtuvieron muchas más e incluso transgénicas como es el caso de Mansa que nació en 2002. Actualmente se estima en más de 4.000 los animales pertenecientes al

ganado vacuno que han sido clonados en todo el mundo según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

Por otra parte y en referencia a un aspecto importante desde el punto de vista económico, es decir, todo lo relacionado con las mascotas, hemos de señalar que la clonación ha tenido un gran éxito de manera que incluso se han originado muchas empresas biotecnológicas que ofertan la posibilidad de obtener clones a partir de células congeladas de las mascotas fallecidas y con las que ciertas personas tienen una especial relación. Desde Lancelot Encore, el primer perro clonado comercial de raza Labrador a partir de células congeladas del original Lancelot, se han clonado varios cientos de perros y gatos a unos precios de alrededor de 100.000 dólares. El primer perro clonado se consiguió en 2005 en Corea del Sur, de nombre Snuppy, un galgo afgano, por el polémico Dr. Hwang Woo Suk. En cuanto a los gatos, el primer gato clonado se obtuvo en 2001 por el equipo del Dr. D. Kraemer de la Universidad de Texas A&M a partir de una célula de una gata de capa calicó (tres colores) de nombre Rainbow y cuyo nombre fue CC (CopyCat).

Pero donde realmente la clonación está teniendo un gran éxito, pese a las dificultades que a continuación relatamos, es el ganado equino. Como sabemos el caballo es el animal doméstico de más impacto e importancia desde muchos puntos de vista, desde el cultural, el social o el económico. La primera vez que se consiguió clonar un caballo fue en la Universidad de Cremona por el equipo del Dr. Cesare Galli, la yegua Prometea en el año 2003. Ese mismo año se consiguió clonar el primer mulo, en éste caso una mula de nombre Gema de Idaho por el equipo dirigido por el Dr. Gordon Woods de la Universidad de Idaho, EEUU.

¿Cuál es el interés de ésta tecnología en el mundo del caballo?

Podríamos decir en primer lugar que se abren con ésta metodología unas perspectivas de aplicación sobre todo en caballos de alto valor

económico y prestigio social como son los dedicados al deporte del Polo y de la competición ecuestre (Hípica) aunque actualmente la reproducción artificial de los équidos de estas especialidades está prohibida por las normas que regulan las competiciones. Pero pese a esto último y desde el punto de vista del uso de ésta metodología, hemos de señalar que existen hechos fundamentales. El primero es que disponemos de una técnica que se encuentra perfectamente puesta punto en équidos; el segundo es que su aplicación no depende nada más que de tener paciencia y dinero y el último es que, actualmente, un clon comercial de caballo cuesta en torno a unos 80.000 euros, pudiéndose estimar ésta cantidad como ridícula en comparación al valor de los animales sobre los que se quiere conseguir clones.

Pero no todo es tan fácil. Existen tres grandes problemas de los que poco a poco se van conociendo cómo ir resolviéndolos. En primer lugar nos encontramos que el espermatozoide de caballo no tiene una gran capacidad fecundante debido a varias causas. Por una parte el efecto individual. Existen grandes diferencias entre caballos respecto a la calidad de sus espermatozoides. Además si usamos como fuente de embriones la metodología de fecundación *in vitro* (FIV) (de otro modo sería muy difícil obtener suficientes embriones), es necesario que los espermatozoides sufran la capacitación espermática con la reacción acrosómica y sin perder su motilidad (algo difícil en ésta especie). En segundo lugar, la disponibilidad de ovocitos de la madre para poder obtener embriones es muy escasa. Tenemos que señalar que si en ganado vacuno de un ovario podemos obtener unos 10 ovocitos de clase A, los perfectos para FIV, en yeguas esa cantidad queda reducida a 2-3 máximo además de la dificultad de detectar los folículos. Por lo tanto y de cara a obtener gran cantidad de embriones para la clonación, es imprescindible la aplicación de la metodología FIV sobre óvulos extraídos de yeguas sacrificadas. Pero hay que señalar que éste proceso es muy complejo particularmente en caballo, de ahí que hasta comienzos de los años

90 los casos de potros nacidos mediante ésta metodología era muy escaso. En realidad existen pocas referencias, en comparación con otras especies de animales domésticos, de éxitos en la FIV. Por ejemplo en 1991 se publicaron dos casos solamente.

El primer paso en la FIV es proceder a la capacitación espermática, uno de los procesos realmente complejos, que puede ser obtenida por diversas técnicas. Se ha establecido, en la activación espermática, que la hiperactivación del espermatozoide equino usando procaína incrementa de forma sustancial y reproducible el éxito en la FIV, con el consiguiente aumento de la tasa de fertilización en más del 60%, según McPartlin et al., 2009. Por otra parte y para facilitar el proceso de fertilización se han puesto a punto otras técnicas para ayudar al espermatozoide. Así se pensó en primer lugar que, como no podían fácilmente atravesar la zona pelúcida, había que ayudarles. Para ello se aplican técnicas con el objetivo de perforar la zona pelúcida (pelúcida drilling) obteniéndose una “zona drilling”. Existen diversas metodologías como es el caso del uso de un taladro piezo-eléctrico que ayuda a debilitar (perforar) dicha zona facilitando la entrada del espermatozoide o bien usando una micropipeta, contactando con la zona pelúcida, presionando sobre ella y produciendo una presión negativa sobre la misma de forma que la depresión debilite dicha zona. Otra metodología es el proceso de una inyección subzonal del espermatozoide que consiste en colocarlo entre la pelúcida y el ovocito. También se puede usar un láser para producir la debilitación de ésta zona (Laser Assisted. Zona Drilling). Otro método que ha sido usado en el ganado equino es el de la transferencia ovocitaria que consiste básicamente en la transferencia, al lugar de fecundación en la yegua receptora sincronizada (el infundíbulo), de ovocitos maduros obtenidos de folículos preovulatorios de ovarios de yeguas de matadero. Por último disponemos del método más efectivo a la hora de obtener grandes cantidades de embriones equinos, el método denominado ICSI (inyección intracitoplásmica de espermatozoide). Ésta técnica permite producir embriones equinos *in vitro*, permitiendo

fertilizar ovocitos obtenidos de ovarios de matadero u ovocitos aspirados por punción transvaginal. El uso de ésta metodología permite avanzar en los trabajos encaminados a la investigación básica en los estudios de cultivo de éste tipo celular y a la vez ir optimizando los resultados obtenidos en su uso tanto en yeguas como en caballos de alto valor genético.

¿Porqué usamos la ICSI?

La respuesta es bien simple. Por una parte para solucionar problemas de animales con muy poca motilidad espermática y por otro lado para solucionar problemas de la FIV en algunas especies como es el caso de la especie equina. La ICSI fue empleada por primera vez en 1996 con éxito. También se ha combinado con el uso de la metodología “drilling”, usando el piezo-drill o bien el Láser.

¿En qué se diferencian la FIV y la ICSI?

Los dos procesos son prácticamente similares solo diferenciados en uno de los pasos, el de la propia FIV o ICSI. El proceso es el siguiente: Colección de Gametos; Maduración Ovocitaria; Selección y Capacitación Espermática; “FIV o ICSI”; Cultivo Embrionario y por último Transferencia.

¿Cuáles son los problemas derivados de la ICSI?

La principal dificultad existente es llevar al embrión desde las primeras 24 horas hasta el 7º día o su llegada a estadio de blasto. En éste proceso existen varios puntos clave: medio de cultivo usado, atmósfera gaseosa y recambio de medio o feeding. Cada uno de ellos es fundamental. En total podemos señalar que los resultados medios observados en la literatura actualmente de todo el proceso de cultivo *in vitro* ronda el 10% de llegada al estadio de blasto. Al inicio de las investigaciones los resultados no alcanzaban el 2%, llegando a obtenerse en la actualidad hasta el 30% en algunos casos (Hinrichs *et al.*, 2010).

Después de haber hecho éste breve repaso a las metodologías que pueden ser usadas en la especie equina para obtener grandes cantidades de embriones, vamos a referirnos a su aplicación a la clonación, entendida pretendidamente como la biotecnología reproductiva que permite obtener animales idénticos a partir de células somáticas de donantes de gran valor, ya sea comercial o sentimental. Al final haremos una brevísima reflexión sobre si de lo que hablamos es de clonación o de algo diferente.

Cuando procedemos a realizar la clonación nos encontramos con tres grandes problemas: primero que el esperma equino no tiene una gran capacidad fecundante; segundo que los ovocitos disponibles de las yeguas son escasos y tercero el bajo porcentaje de blastos para ser transferidos que podemos obtener. Por otra parte hemos visto que la ICI es la mejor de las metodologías a usar pero que también tiene sus propios inconvenientes y, también hay que decirlo, sus ventajas. Entre sus ventajas se encuentran que soluciona los problemas que afectan al espermatozoide y que es la única forma de fecundar *in vitro* con éxito en équidos hasta el momento presente y, como desventaja, que se trata de una técnica muy cara y por tanto poco usada, más allá del nivel experimental.

Al proceso de clonación se le abren tres posibilidades de aplicación. Una de ellas es la de la clonación embrionaria; la segunda la reproductiva y la tercera es la terapéutica. Desde nuestro punto de vista productivo las más interesantes son las dos primeras. En cuanto a la clonación embrionaria ya Ozil *et al.*, 1982 publicaron algunos resultados en ganado vacuno sobre la obtención de terneros idénticos como consecuencia de la bisección de embriones en estadio de mórula siendo todos ellos idénticos y similares a los gemelos univitelinos. Desde ese momento se han “clonado” no solamente ganado vacuno sino otras muchas especies tales como los ratones e incluso monos (caso de Tetra, el primer mono clonado). Pero donde más importancia puede tener la clonación es el aspecto reproductivo. El uso de esta metodología para obtener animales “clonados” a

partir de células somáticas de animales de alto valor, en éste caso équidos, creemos que es el futuro y debemos potenciar la investigación y el control, cada vez más, de todas las variables que en el proceso influyen para optimizarla y aplicarla, podríamos decir, de forma rutinaria.

El método de clonación que se usa más importante es el método descrito por el equipo de Ian Wilmut, el de la transferencia nuclear, es decir, el método SCNT o transferencia de núcleos de células somáticas. Consiste básicamente en enuclear una célula somática; enuclear un ovocito maduro, transferir el núcleo somático dentro del ovocito enucleado; activación del ovocito inducida por pulsos eléctricos; comienzo de la mitosis somática; obtención de dos, cuatro, etc. células hasta llegar a estadios de mórula y blasto y la transferencia a la hembra receptora. Éste es el proceso básico pero con muchísimas variables que hay que ir controlando, algunas de ellas las hemos visto anteriormente.

DISCUSIÓN

Como hemos indicado, el objetivo de la clonación no es sino el de poder obtener copias de un animal para nuestro propio interés. Es una técnica que se ha puesto a punto en diversas especies sin grandes problemas técnicos o bien con problemas fáciles de resolver. No obstante se ha observado que el éxito depende muchísimo de la especie que se quiera clonar.

La clonación de animales de alto valor económico o genético ha sido todo un éxito y así, por señalar el primer caso en Sudamérica, en 2002 el equipo dirigido por el Dr. A. Muto, consiguió el primer clon de un vacuno al nacer en la Universidad San Martín (BsAs) un clon de un toro de raza Brangus del que se tomó células de la oreja, se seleccionaron óvulos de vacas y después de la transferencia nuclear se obtuvieron embriones de los que nació un ternero de nombre Ciruelo. Posteriormente y mediante ésta metodología han nacido muchos más incluso transgénicos, como es el caso en 2004 de "Pampero", el primer macho clonado y

transgénico a la vez. En España se ha conseguido clonar un toro de la raza De Lidia denominado Got, en 2010, en Palencia por un equipo dirigido por V. Torrent. En fin podemos encontrar muchos casos obtenidos en los últimos años en muy diversas razas.

Pero es la especie equina en la que más importancia tiene la clonación al tratarse de animales de muy altos valores genéticos y por supuesto económicos. Desde un punto estrictamente de clonación hay tres vías de actuación. Por una parte la clonación de animales importantes desde la óptica de su valor demostrado en las distintas actividades que desarrollan. Una gran mayoría de los clones comerciales obtenidos se refieren a animales de Polo, deporte que en algunos países como Argentina tienen una importancia deportiva y sobre todo económica fundamental. Pues bien una de las primeras yeguas clonadas fue Cuartetera, yegua emblemática en éste deporte en ese país. Sus dos primeros clones obtenidos mediante la metodología de la transferencia nuclear se subastaron el 17 de Noviembre de 2010 y fueron adquiridos por la cantidad de 800.000 dólares. Toda ésta metodología la lleva a cabo en Argentina una empresa privada creada en 2008 en Estados Unidos. Además de ésta yegua se han clonado varios ejemplares más de gran valor y además de otros ejemplares como es el caso de Colibrí, Lapa, Nona, Aiken Cura, Buenaventura y Small Person, todos ellos animales de deporte de élite y de alto valor económico. Como hemos referido anteriormente uno de los problemas que están resultando difíciles de controlar es la disponibilidad de óvulos por lo que se hace necesario disponer de un gran número de ellos para conseguir el éxito esperado. Es por esto que los investigadores hacen uso de los ovarios de yeguas sacrificadas, donde se pueden obtener mucho más óvulo de lo que se consiguen con otras técnicas reproductivas como obtención de óvulos por laparoscopia. Obviamente la puesta a punto de ésta biotecnología reproductiva genera unos beneficios económicos y de valor añadido que hace que países como Argentina sean referentes en éste campo.

Pero el uso de la clonación no está solamente indicado en la obtención de clones o réplicas de animales importantes sino que ésta metodología tiene su aplicación en otro campo muy importante, por ejemplo el del rescate reproductivo. Existen momentos en los que los caballos o yeguas se hacen realmente viejos para la reproducción natural y merece la pena la aplicación de ésta biotecnología para continuar obteniendo animales de gran calidad. Así ha ocurrido con algunos animales como uno de los mejores en salto, Quidam de Revel, del que, aparte de todos sus descendientes naturales, se han obtenido diversos clones de los que se esperan unas características similares a las del original. Por citar alguno de ellos nos referimos a Quidam de Revel II o a Paris-Texas, nacido en 2005 cuando Quidam de Revel contaba con 23 años. La técnica usada en éste caso por el Dr. Hinrichs fue ligeramente diferente a la que usada por otros grupos de investigación como el del Dr. Galli. El Dr. Hinrichs, en Texas, en lugar de usar la electro-fusión de la célula donante con el ovocito desnudo, el núcleo se introduce mecánicamente dentro del citoplasma del ovocito haciendo uso del piezo-drill. Además éste grupo consigue una adicional estimulación del desarrollo embrionario inyectando extractos de espermatozoides.

Pero también los éxitos son enormes sobre todo en animales fallecidos pero de los que se mantienen tejidos congelados. Así es el caso de Chellano Z, caballo de salto, que murió en 1995 cuando tenía 11 años y su dueño decidió clonarlo debido a su gran pedigree y así en 2008 nació Chellano Alpha Z.

Otra opción importantísima en la recuperación de animales de alto valor genético se refiere a la posibilidad de recuperar animales que por diversas razones han sido castrados, es lo que se denomina la clonación de castrados. En éste caso la metodología de la clonación ha dado unos resultados muy interesantes como en el caso de Pieraz, caballo castrado y campeón de dos Raids mundiales además de otros muchos Raids. Se retiró de la competición en el 2000 y la

empresa de Eric Palmer obtuvo su clon denominado Pieraz Sallion que nació en 2005.

Por último existe otra posibilidad de uso de ésta metodología. Se trata de cuando se produce una situación de emergencia por accidentes, particularmente los deportivos. Una situación de éste tipo se produjo en el caso de Aiken Cura. A sus once años y después de ser considerado el mejor caballo de Polo en 2005 y 2006, se fracturó la mano izquierda en 2007, fue operado, y al final, después de diversas complicaciones murió. Pero la clonación acudió en su ayuda y se consiguió un clon denominado Aiken Cura 2 nacido en 2012.

Podemos concluir que la clonación ya no es un reto científico sino una realidad que está en nuestras manos y que nos resolverá muchos problemas.

¿Clones?

Visto todo lo anterior, cabría hacer se una pregunta que está en el aire y que todos pensamos, ¿los clones son realmente clones de los originales?, es decir, ¿realmente cuando conseguimos un clon tenemos la garantía de que se va comportar como el original? La respuesta no puede ser más categórica. Desde un punto de vista genético, no, y desde el punto de vista del interés de clonar un determinado animal, también no. ¿Entonces?. La explicación a ambas negativas es bien clara. Por una parte y a pesar de que se parte del genoma (núcleo celular) existente en un animal en un momento determinado, ese genoma comienza el desarrollo de un nuevo individuo y obviamente desde el punto de vista genético éste posee y sufre su propio proceso. Además hemos de tener en cuenta la herencia materna recibida por los mitocondrias de la madre donadora de ovocitos que también influye. Como sabemos el fenotipo de un animal es el resultado del efecto del genoma más el efecto del ambiente que a su vez puede ser temporal o permanente. En suma el resultado final no es nada más que el genoma modulado por las modificaciones del propio genoma y por el ambiente. Es por ello que decimos que la clonación no producirá una copia

exacta del original. Y en ese proceso es obvio pensar que tampoco el clon poseerá las mismas cualidades que el original. Lo que sí se ha demostrado, y genéticamente es lógico, es el hecho de que poseen cualidades muy cercanas a los originales y de ahí su interés, de hecho muchos clones han demostrado poseer unas características muy próximas a las de sus originales.

REFERENCIAS

- D.L. Hartman, I.C. Veleza. Use of intracytoplasmic sperm injection and in vitro culture to the blastocyst stage for clinical production of foals from mares post mortem. *Anim Reprod Sci* 2010; 121(1-2):239-240.
- McPartlin, L.A., S.S. Suarez, C.A. Czaya, K. Hinrichs, J. Bedford-Guaus. Hyperactivation of Stallion Sperm Is Required for Successful In Vitro Fertilization of Equine Oocytes. *Biol Reprod* 2009; 81:199–206.
- Ozil, JP, Y Heyman, JP Renard. Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *Vet Rec* 1982; 110:126-127.
- Restrepo G, S. Restrepo. Consideraciones importantes acerca de la producción *in vitro* de embriones equinos. *Med Vet Zootec.* 2011; 6 (1): 55-63