

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL  
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL  
MADURACIÓN DE OVOCITOS DE YEGUAS OBTENIDOS DE OVARIOS DE RASTRO Y  
MADURADOS EN DOS MEDIOS DIFERENTES.

Prestador de Servicio Social:  
Carlos Luis Molotla Jiménez  
Matrícula: 2172029231

Asesor:



Interno: Dr. José Ernesto Hernández Pichardo.  
Núm. Económico: 16587



Externo: MBRA Antonio Jersain Montiel Quiroga.  
Cédula Profesional: 2195521

Lugar de Realización:  
Laboratorio "Manejo de la Reproducción", Universidad Autónoma Metropolitana,  
Unidad Xochimilco.

Fecha de Inicio y Término:  
5 de junio al 5 diciembre de 2023.

## ÍNDICE

<b>1.- RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>2.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>3.- MARCO TEÓRICO.</b>	<b>5</b>
<b>4.- OBJETIVO GENERAL.</b>	<b>6</b>
<b>5.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>7</b>
<b>6.- MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>7</b>
6.1 Obtención de los ovarios.	7
6.2 Obtención de los COC.	7
6.3 Maduración de los ovocitos.	8
6.4 Determinación de la maduración de los ovocitos.	8
6.5 Análisis Estadístico	9
<b>7.- Actividades Realizadas.</b>	<b>9</b>
<b>8. – Objetivos y metas alcanzados</b>	<b>9</b>
<b>9. – Resultados, discusión y conclusiones.</b>	<b>9</b>
<b>10.- Bibliografía</b>	<b>12</b>

## 1.- RESUMEN

La Maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos es, dentro de la reproducción animal, el enlace que permite el uso de otras biotecnologías tales como la Fertilización *in vitro* (FIV), o inyección espermática intracitoplasmática (ICSI) en el caso particular de los equinos; la suma de varios factores ha dificultado el estudio de este tipo de procedimientos en la especie. La baja disponibilidad y el alto costo de los medios de MIV específicos para ovocitos equinos crea la necesidad de seguir investigando medios eficaces para dicha función; por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue madurar ovocitos equinos obtenidos *post mortem* en dos diferentes medios de maduración. Se colectaron un total de 509 ovarios, de los que se aspiraron 1545 folículos, obteniendo en total 934 ovocitos. De los cuales 508 ovocitos fueron madurados en medio TCM199 y 426 ovocitos en medio DMEM/F12. El porcentaje de maduración en medio TCM199 fue de 52%, mientras que en el medio DMEM/F12 fue del 55%, sin mostrar diferencia significativa entre ambos medios ( $P>0.05$ ). Se concluye que el porcentaje de maduración fue similar en ambos medios, sin embargo el medio TCM199 es el más común para llevar a cabo la maduración de ovocitos equinos.

## 2.- INTRODUCCIÓN

A lo largo de miles de años los caballos han sido utilizados por la humanidad con diferentes propósitos tales como: fuerza de tracción para las labores agrícolas, como medio de transporte, con fines bélicos, y también en actividades de ocio y deportivas. En la actualidad se calcula que alrededor del mundo existen 58 millones de caballos, de los cuales aproximadamente el 60% es utilizado como fuerza de trabajo (Murray *et al.*, 2013).

En México se estima que la población equina se encuentra alrededor de los 12,955,040 ejemplares (Robledo-Reyes *et al.*, 2024) si bien una gran parte de ellos continúa siendo utilizada en labores agrícolas otro tanto es utilizado en una amplia variedad de disciplinas deportivas tales como la charrería, disciplina denominada como el deporte nacional y declarada en 2016 como patrimonio cultural intangible de la humanidad por la UNESCO. Recientemente ha venido en aumento la práctica de otras disciplinas ecuestres en nuestro país como el salto y el adiestramiento (Deraga, 2007).

Para cumplir con las actividades en las que los humanos han involucrado a los caballos, se realiza una selección, teniendo en cuenta sus características y habilidades como: conformación, velocidad y habilidad para saltar, por citar algunos ejemplos (Hanot *et al.*, 2018). El uso de biotecnologías permite incrementar la eficiencia reproductiva de los animales en pro del aprovechamiento de sus características genéticas de valor, dicho de otro modo, las tecnologías de reproducción asistida han sido una herramienta esencial en la búsqueda de transmitir características deseadas a la descendencia de caballos y yeguas de alto valor genético y económico, además de ayudar en el manejo de machos y hembras subfértiles (Cabeza y Gambini, 2023; Gardón y Satúe, 2023; Hinrichs, 2018). Dentro de las biotecnologías reproductivas implementadas en la especie equina se incluyen: la inseminación artificial, cuyos primeros casos de éxito en los equinos datan de finales del siglo XIX; la transferencia de embriones, la transferencia de ovocitos, la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI), la recuperación y maduración *in vitro* de ovocitos obtenidos *in vivo* o *post mortem*, y la clonación (Hinrichs, 2013; Betancur y Escobar, 2011).

Técnicas como la maduración *in vitro* (MIV) y la Fertilización *in vitro* (FIV), han sido ampliamente desarrolladas en animales de producción, como en el caso de los bovinos, especie en la cual la producción *in vitro* de embriones (PIVE) ha tenido un enorme progreso. Al inicio, en la mayoría de los estudios en dicha especie se emplearon ovarios obtenidos *post mortem* en rastros; la alta disponibilidad de este tipo de ovarios fue en gran parte responsable del rápido avance en el desarrollo de las técnicas de maduración *in vitro* para ser posteriormente empleadas en la maduración de ovocitos obtenidos mediante aspiración folicular provenientes de vacas donadoras vivas; por el contrario, en la especie equina los avances se han dado de manera más lenta, debido en parte a la escasa existencia de lugares de sacrificio para esta especie (Betancur y Escobar, 2011; Squires, 1996).

La MIV de ovocitos permite que puedan utilizarse aquellos ovocitos que se encuentren en un estado inmaduro dentro del ovario y no solo los que se encuentran en fase preovulatoria en procedimientos como la FIV y la ICSI, respectivamente. Lo anterior resulta útil en hembras con problemas de subfertilidad, en aquellas en las que no se desea interrumpir su actividad deportiva e incluso las que recién han muerto. Por otra

parte, el uso de la MIV en conjunto con otras técnicas como la vitrificación de ovocitos, puede permitir la creación de bancos genéticos, donde se preserven por largos periodos ovocitos que posteriormente puedan ser descongelados, madurados e inseminados, ayudando a la preservación de otros équidos (Agnieszka *et al.* 2021; Hinrichs, 2013).

### **3.- MARCO TEÓRICO.**

La PIVE en equinos es una técnica que genera un incremento en la eficiencia reproductiva de especímenes de alto valor genético y comercial, pero a pesar de todos los estudios que se han realizado, la PIVE es una técnica con acceso y éxito limitado (Betancur y Escobar, 2011).

La PIVE, tanto en los equinos como en otros mamíferos de interés zootécnico, involucra, además de la recuperación de los ovocitos, la maduración *in vitro* de los ovocitos obtenidos (MIV), la fertilización *in vitro* de los ovocitos madurados (FIV) y el desarrollo embrionario *in vitro* de los ovocitos fertilizados (Ortega *et al.*, 2022).

En la MIV de los ovocitos se buscan crear condiciones adecuadas que se asemejen a las que se encuentran en el aparato reproductor de la yegua, reportándose en ovocitos de yegua tasas de MIV de 50% al 75%, que son menores a las obtenidas en otras especies (Betancur y Escobar, 2011).

La maduración del ovocito se divide en maduración nuclear y citoplasmática, que son los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membrana que experimenta el ovocito, con el fin de prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollarse posteriormente. La maduración nuclear comienza tras la reanudación de la meiosis, y es el paso de la vesícula germinal (VG) a metafase II (MII), que consiste en: La disolución de la membrana nuclear conocida como “rotura de la vesícula germinal”, la formación del huso meiótico y la condensación de la cromatina en cromosomas homólogos que se alinean en el huso, alcanzando el estadio de metafase I; para continuar con la segregación de los dos grupos de cromosomas homólogos, dando lugar a la extrusión del primer corpúsculo polar (CP) y formación del ovocito en estadio de MII, que se

considera la maduración nuclear. La maduración citoplasmática prepara al ovocito para la fecundación y el desarrollo embrionario, produciéndose una redistribución de las mitocondrias y de los gránulos corticales (Chávez, 2013).

Entre los factores que afectan la MIV de los ovocitos de equino, se encuentran los siguientes: estado de compactación de la granulosa ya sea con cúmulo compacto o expandido, tiempo de maduración de los ovocitos, (Betancur y Escobar, 2011), medio de maduración, suplementos, condiciones de temperatura, pH y tensión de oxígeno (Ramírez y Suarez, 2021).

En los complejos ovocitos cumulus (COCs) se pueden diferenciar dos tipos: ovocitos expandidos y compactos: los ovocitos con células del cúmulo expandidas tienen una mayor tasa de maduración que los ovocitos con cúmulos compactos, por otra parte el tiempo óptimo de maduración para los ovocitos expandidos va de 24 a 30 horas, mientras que para los ovocitos compactos es de entre 30 y 36 horas, no observando diferencia en el desarrollo embrionario una vez madurados los ovocitos compactos o expandidos (Ramírez y Suarez, 2021; Chávez, 2013).

Los medios más utilizados para la maduración *in vitro* de ovocitos equinos son medios de cultivo de tejidos 199 (TCM 199, M199), medio Eagle modificado de Dulbecco F-12 (DMEN/F-12) y medio optimizado de potasio simplex (KSO-Maa), los cuales pueden ser suplementados con suero fetal bovino, hormonas LH y FSH, líquido folicular, factores de crecimiento epidérmico (EGF), cocultivos con células del cumulus, granulosa u oviducto, además de antibióticos ( Velásquez y Vargas, 2023; Ramírez y Suarez, 2021; Morris, 2018; Abdoon *et al.*, 2014; Chávez, 2013; Betancur y Escobar, 2011).

Se ha reportado que las condiciones de MIV tienen una enorme influencia para que los ovocitos fertilizados lleguen a la etapa de blastocisto (Galli *et al.*, 2007).

## **5.- OBJETIVO GENERAL.**

Comparar la maduración de ovocitos equinos con TCM 199 Y DMEN F-12 como medios de maduración.

## **6.- OBJETIVO ESPECÍFICO.**

- Evaluar el porcentaje de maduración con el medio TCM 199.
- Evaluar el porcentaje de maduración del medio DMEN-F12.

## **7.- MATERIAL Y MÉTODOS.**

La investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio “Manejo de la Reproducción” adscrito a la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México. Todos los reactivos utilizados fueron de Sigma Aldrich (St. Louis, USA), a menos que se indique lo contrario.

### **7.1 Obtención de los ovarios.**

Los ovarios fueron colectados en una unidad de sacrificio y transportados en solución NaCl (0.157 M) con 10,000 UI/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina y 25 µg/mL de anfotericina (In vitro®) al Laboratorio “Manejo de la Reproducción” de la UAM-X a una temperatura de 24 °C a menos de 2 h desde su obtención (Ribeiro *et al.*, 2008). Los ovarios se lavaron tres veces en el laboratorio con la solución NaCl para retirar sustancias contaminantes y la Túnica Albugínea fue retirada para exponer visualmente a los folículos (Lodde *et al.*, 2019).

### **7.2 Obtención de los COC.**

Los COCs se obtuvieron por aspiración de folículos de 10 a 35 mm de diámetro con una jeringa (10 mL) y aguja (calibre 18), durante la aspiración se llevó a cabo el lavado del interior de los folículos con 1 mL de solución ABT Rinsing (ABT 360®) suplementado con 10 UI/mL heparina (Campos *et al.*, 2019). Para la búsqueda de los COCs se utilizó un microscopio estereoscópico (SMZ645 NIKON), fueron tres veces lavados en ABT Rinsing y colocados en cajas de cuatro pozos que contenían 500 µL de medio de maduración base: TCM199 o DMEM/F12, respectivamente.

### **7.3 Maduración de los ovocitos.**

Para la maduración de los COCs en el medio base de maduración TCM-199 con sales Earle's (Ref. 31100-035, Gibco, Life Technologies, USA), se suplemento con bicarbonato de sodio (26.2 mM), alcohol polivinílico (0.1%), D-glucosa (3.05 mM), piruvato de sodio (0.91 mM), cisteína (0.57 mM), factor de crecimiento epidérmico (10 ng/mL), Insulina (10 µg/mL), Transferrina (5.5 µg/mL) y Selenio (5 µg/mL) y suero fetal bovino (SFB) (10%) (Montiel *et al.*, 2018).

El medio base de maduración DMEM/F12 (Ref. 12500-062, Gibco, Life Technologies, USA) (Merlo *et al.*, 2018) fue suplementado con bicarbonato de sodio (29 mM), piruvato de sodio (1 mM), factor de crecimiento (50 ng/mL), Insulina -Transferrina – Selenio (1%), hormona folículo estimulante (100 µg/mL), SFB (10%) y antibiótico (1%).

En ambos casos los ovocitos fueron madurados a 38.5 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% aire y humedad a saturación durante 36 h (Restrepo *et al.*, 2009).

### **7.4 Determinación de la maduración de los ovocitos.**

Pasado el tiempo de incubación, para determinar la maduración de los ovocitos fue necesario retirar las células del cumulus (CC) mediante pipeteo colocando los COC en una gota de 500 µL en PBS con 20% de SFB, y 80 UI de hialuronidasa/mL durante 3 minutos (Bedford *et al.*, 2008), para luego ser lavados tres veces en medio TCM 199-H (Caillaud *et al.*, 2008), posteriormente los ovocitos se colocaron en gotas de 250 µL de TCM 199-H, y con la ayuda de un microscopio estereoscópico (SMZ745T, Nikon, Japón)./, se buscó el primer cuerpo polar (CP), que es indicativo de maduración del ovocito.

## **7.5 Análisis Estadístico**

Se analizó el porcentaje de maduración con la prueba de chi cuadrada ( $\chi^2$ ) para determinar si existe diferencia estadística significativa, considerando como valor de significancia de  $P < 0.05$  (Wayne y Chad, 2013).

## **8.- Actividades Realizadas.**

- Transporte de los ovarios desde la unidad de sacrificio al laboratorio de Manejo de la Reproducción.
- Lavado de ovarios con solución salina estéril.
- Retiro de túnica albugínea ovárica para mejorar la exposición de los folículos.
- Lavado y aspiración de folículos para la obtención de los COCs.
- Búsqueda de COCs con ayuda de microscopio estereoscópico.
- Preparación de medios de maduración TCM199 y DMEM/F12.
- Búsqueda de cuerpos polares en los COCs posterior al periodo de maduración con ayuda de un microscopio estereoscópico.
- Registro de resultados.

## **9. – Objetivos y metas alcanzados**

- Evaluar el porcentaje de maduración con el medio TCM 199. Objetivo alcanzado, el medio TCM199 obtuvo el 52% de maduración de ovocitos.
- Evaluar el porcentaje de maduración con el medio DMEN-F12. Objetivo alcanzado, el medio DMEM/F12 obtuvo el 55% de maduración de ovocitos.

## **10. – Resultados, discusión y conclusiones.**

Se colectaron un total de 509 ovarios, de los que se aspiraron un total de 1545 folículos, se obtuvieron 934 ovocitos; 508 ovocitos fueron sometidos a maduración con el medio TCM199, mientras que 426 fueron colocados en el medio DMEM/F12 para su maduración.

En el presente estudio se obtuvieron en promedio 1.95 ovocitos por ovario, este resultado es inferior a lo reportado por otras investigadoras que reportan: 2.4 (Deleuze *et al.*, 2018), 2.98 (Agnieszka *et al.*, 2021), 4.65 (Rodríguez *et al.*, 2019) y 3.6 ovocitos por ovario (Lorenzo *et al.*, 2010). Lo anterior puede ser debido a inadecuada posición del ovario durante la punción, la presión de la aguja, además de los movimientos incorrectos y lavados insuficientes durante la aspiración (Rodríguez *et al.*, 2021).

Se reporta que con el método de raspado de los folículos se obtiene un mayor número de ovocitos de equino, aunque representa una desventaja el ser un método que requiere de otro entrenamiento como raspar eficientemente las paredes del folículo lo que lleva más tiempo que puede afectar en la maduración de los ovocitos (Reyes-Perea *et al.*, 2023; Carnevale y Maclellan, 2006; Vazquez *et al.*, 1993).

**Tabla 1.** Maduración de ovocitos de equino utilizando medios comerciales TCM199 y DMEM/F12 a las 36 h de cultivo.

Medio de maduración	Ovarios	Folículos aspirados	Ovocitos obtenidos	Ovocitos/Ovario	Ovocitos madurados
TCM199	255	793	508	1.99	262/508 <b>52%</b>
DMEM/F12	254	752	426	1.92	233/426 <b>55%</b>

Los porcentajes de maduración no mostraron diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ).

Los porcentajes de maduración fueron similares con ambos medios TCM199 y DMEM/F12 ( $P > 0.05$ ), respectivamente. Los porcentajes de maduración *in vitro* en equinos que se reportan van de 50 al 75% (Restrepo y Restrepo, 2011). En la presente investigación, se obtuvo 52% de maduración de ovocitos con el medio TCM 199, este resultado es superior a 39% (Galli *et al.*, 2007) y 47% (Agnieszka *et al.*, 2021), sin embargo, se han reportado valores superiores con el 55.7% (Abdonn *et al.*, 2018) y 66.3% (Rodríguez *et al.*, 2019). Lo anterior se puede deber a que existen diferentes factores que afectan la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos de equinos, entre los que se encuentran: los medios de maduración, la suplementación de estos, así como el tiempo de maduración, temperatura, pH, humedad y oxigenación durante

la maduración (Ramírez y Suarez 2021; Aranda, 2017). Otros investigadores (Hinrichs *et al.*, 2002), mencionan que un factor que puede influenciar en la maduración de ovocitos de equinos *in vitro* es el tiempo que transcurre entre el momento del sacrificio de las hembras hasta el proceso de colecta y maduración de los ovocitos, ya que se ha observado que los ovocitos que se colectan inmediatamente después del sacrificio poseen una mayor tasa de reanudación meiótica.

En la presente investigación se obtuvo 55% de maduración de ovocitos empleando el medio DMEM/F12, este resultado es superior a 40.4% (Galli *et al.*, 2007), 44.3 % (Rizzo *et al.*, 2019), 43% (Ducheyne *et al.*, 2019)., aunque, por otra parte, se han obtenido porcentajes de maduración del 60% en COCs obtenidos de folículos con un diámetro mayor a 2 cm utilizando el medio DMEM/F12 sin adicionar bicarbonato de sodio y dando un tiempo de maduración de 24 hrs (Lodde *et al.*, 2019). Cabe mencionar que el menor porcentaje de maduración obtenido en esta investigación puede ser debido a que los ovocitos se obtuvieron de folículos de 10 a 35 mm de diámetro y se ha reportado que el tamaño de los folículos de donde se obtienen los ovocitos influye en el porcentaje de maduración *in vitro*, ya que folículos con diámetro >20 mm poseen una alta competencia meiótica comparada con aquellos de diámetro menor (Hinrichs y Schmidt, 2000; Lorenzo *et al.*, 2010).

En conclusión, en el presente estudio los porcentajes de maduración obtenidos en ambos medios de maduración, se encuentran dentro del rango de lo que se ha descrito previamente en la literatura y no presentaron diferencias significativas entre sí; sin embargo el TCM199 es el medio que se utiliza con mayor frecuencia para la MIV de equino y de otras especies. Adicionalmente, mejorar aspectos como la disminución del tiempo transcurrido entre la colecta de los ovarios y la obtención de los COCs aumentaría las probabilidades de obtener una mejor tasa de maduración, aunque la baja disponibilidad de unidades de sacrificio de equinos representa una limitante.

Un método confiable y consistente de maduración *in vitro* de los ovocitos de equino sería de gran ayuda en el campo de la reproducción equina, pues permitiría seguir con la aplicación de biotecnologías reproductivas en equinos tales como la ICSI y la

vitrificación de embriones, por lo que aún existen diversos aspectos por investigar para optimizar los medios de maduración *in vitro* para los ovocitos de dicha especie.

## 11.- Bibliografía

- Abdonn, A., Abdel, R.H., Shawki, S., Kandil, O., & Fathalla, S. 2014. Influence of follicle size, methods of retrieval on oocytes yield and morphology in Egyptian Jennies ovaries with special reference to maturation rate in vitro. *Veterinary Research Communications*; 38(1): 287-295
- Agnieszka, N., Joanna, K., Wojciech, W., & Adam, O. 2021. In vitro maturation of equine oocytes followed by two vitrification protocols and subjected to either intracytoplasmic sperm injection (ICSI) or parthenogenic activation. *Theriogenology*, 162, 42–48.
- Aranda, C. 2017. Maduración de ovocitos equinos por encapsulación. Tesis fin de grado: Veterinaria. Universidad Zaragoza. ZAGUAN; Repositorio Institucional de Documentos: <https://zaguan.unizar.es/record/58026?ln=es>.
- Bedford, G.J., Yoon, Y., Fissore, R. A., Choi, H., & Hinrichs, K. 2008. Microinjection of mouse phospholipase C zeta complementary RNA into mare oocytes induces long-lasting intracellular calcium oscillations and embryonic development. *Reproduction, Fertility, and Development*, 20(8): 875-883.
- Betancur, R.G., & Escobar, R.S. 2011. Consideraciones importantes acerca de la producción *in vitro* de embriones equinos. S. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 6(1): 55-63.
- Cabeza, J.P., & Gambini, A. 2023. Advancements and challenges in in vitro reproductive technologies for the conservation of equine species. *Theriogenology Wild*. 2, 10036.
- Caillaud, M., Dell'Aquila, E., De Santis, T., Nicassio, M., Lacalandra, M., Goudet, G., & Gérard, N. 2008. In vitro equine oocyte maturation in pure follicular fluid plus interleukin-1 and fertilization following ICSI. *Animal Reproduction Science*, 106(3-4): 431-439.
- Campos-Chillon, L. F., Martin, J., & Altermatt, J. L. 2019. Pregnancy obtained in a late gestational mare by in vitro embryo production. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(12), 1926-1929.

- Carnevale, E. M., & Maclellan, L. J. 2006. Collection, Evaluation, and Use of Oocytes in Equine Assisted Reproduction. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 22(3), 843–856.
- Chávez, G.B.A. 2013. Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos equinos utilizando suero de yegua en dos etapas del estro, y uniones heterólogas con espermatozoides equinos tratados con heparina y procaina. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Biológicas. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México.
- Deleuze, S., Douet. C., Couty. I., Moros-Nicolás, C., Barrière,Blard, T., Reigner, F., % Magistrini, M. 2018. Ovum Pick Up and In vitro Maturation of Jennies Oocytes Toward the Setting Up of Efficient In Vitro Fertilization and In Vitro Embryos Culture Procedures in Donkey (*Equus asinus*). *Journal of Equine Veterinary Science*: 65(1); 111-117.
- Deraga, D. 2007. El caballo y el deporte. *Revista Estudios del Hombre*, (23): 193-209.  
<http://148.202.18.157/sitios/publicacionesite/pperiod/esthom/esthompdf/esthom23/7.pdf>
- Ducheyne, K.D., Rizzo, M., Daels, P.F., Stout, T.A.E., & Ruijter-Villani, M. 2019. Vitriifying immature equine oocytes impairs their ability to correctly align the chromosomes on the MII spindle. *Reproduction, Fertility and Development*. 31, 1330–1338.
- 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. *Animal Reproduction Science*. 98: 39–55.
- Gardón, J. C., & Satúe, K. 2023. History of Horses and the Biotechnologies Applied to Its Reproduction. *Equine Science - Applications and Implications of New Technologies*. pp 1-16.
- Hanot, P., Herre, A., Guintard, C., & Cornette, R. 2018. The impact of artificial selection on morphological integration in the appendicular skeleton of domestic horses. *Journal of Anatomy*, 232(4): 657-673. doi: 10.1111/joa.12772

- Hinrichs, K. & Schmidt, A.L. 2000. Meiotic competence in horse oocyte: interactions among chromatin configuration, follicle size, cumulus morphology and season. *Biology Of Reproduction*. 62: 1402-1408.
- Hinrichs, K. 2013. Assisted reproduction techniques in the horse. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(1): 80. doi:10.1071/rd12263
- Hinrichs, K. 2018. Assisted reproductive techniques in mares. *Reproduction in Domestic Animals*, 53, 4–13.
- Hinrichs, K., Choi Y.H., Love L.B., Love C.C., Varner D.D., & Ingram L.A. 2002. Effects of holding time and media on meiotic and developmental competence of horse oocytes. *Theriogenology* 58: 675–678.
- Lodde, V., Colleoni, S., Tessaro, I., Corbani, D., Lazzari, G., Luciano, A.M., Galli, C., & Francios, J. 2019. A prematuration approach to equine IVM: considering cumulus morphology, sesonality, follicle of origin, gap injection coupling and large-scale chromatin configuration in the germinal vesicle. *Reproduction, Fertility and Development*; 31(12): 1793-1804.
- Lorenzo, P. L., Liu, I. K. M., Carneiro, G. F., Conley, A. J., & Enders, A. C. 2010. Equine oocyte maturation with epidermal growth factor. *Equine Veterinary Journal*, 34(4), 378–382.
- Merlo, B., Mari, G., & Iacono, E. 2018. In vitro developmental competence of horse embryos derived from oocytes with a different corona radiata cumulus-oocyte morphology. *Animal Reproduction Science*. 198, 233-237.
- Montiel, Q. A. J., Rodríguez, S. J.L., Hernández, P. J. E. 2018. Maduración de ovocitos de yegua, de ovarios de rastro en dos épocas del año. 7° Congreso y 3ª feria Técnico-científica del departamento de Producción agrícola y animal 2018. Presentado del 19 al 21 de septiembre de 2018. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, CDMX, México.
- Morris, L.H.A. 2018. The development of *in vitro* embryo production in the horse. *Equine Veterinary Journal*; 50(1): 712-720
- Murray, G., Munstermann, S., & Lam, K. 2013. Benefits and challenges posed by the worldwide expansion of equestrian events- New standards for the population of competition horses and equine disease free zones (EDF) in countries. World Organisation for Animal Health. World Assembly. 81st General Session, p. 1-9.

- Ortega, R. R., Palma, G., Vacacela, A. W., Carrera, D. R. 2022. La cisteamina y sus aplicaciones en la producción in vitro de embriones. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 33(1):
- Ramírez, L.O., & Suarez, R.S.2021. Fertilización in vitro en equinos. Seminario de profundización en genética y reproducción Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Cooperativa De Colombia. Colombia.
- Restrepo, B.G., & Restrepo, E.S.. 2011. Consideraciones importantes acerca de la producción in vitro de embriones en equinos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*; 6(1): 55-63.
- Restrepo, G., Gómez, J., Vásquez, N., & Giraldo, J. 2009. Evaluación de la maduración in vitro de oocitos equinos madurados en presencia de suero fetal bovino y fluido folicular equino. Encuentro Internacional de Investigadores en tecnología y medio ambiente, Politécnico colombiano, Colombia.
- Reyes-Perea, A.D., Diaw, M., & Guerrero-Netro, H.M. 2023. Assisted Reproductive Technologies in Horses: A Systematic Review. *Biomed J Sci & Tech Res* 49(5). BJSTR. MS.ID.007871.
- Ribeiro, I., Love, B., Choi, H., & Hinrichs, K. 2008. Transport of equine ovaries for assisted reproduction. *Animal Reproduction Science*, 108(1-2): 171-179.
- Rizzo, M., Ducheyne, K.D., Deelen, C., Beitsma, M., Cristarella, S., Quartuccio, M., Stout, T.A.E.,% Ruijter-Villani, D.E. 2019. Advanced mare age impairs the ability of in vitro-matured oocytes to correctly align chromosomes on the metaphase plate. *Equine Veterinary Journal*; 51(2):252-257.
- Robledo-Reyes, E. E., Olivares-Pérez, J., Hernández-Gil, M., Rojas-Hernández, S., Damián-Valdez, M. A., Villa-Mancera, A., Quiroz-Cardoso, F. 2024. Horses an important specie in charrería, its management and welfare. *AgroProductividad* 17(6). pp: 85-96.
- Rodríguez, J., Maserati, M., Robilotta, T., Augusto, G., Alonso, M.A., Redoan, M., Tibary, A., & Fleury P. 2021. Recovery of Equine Oocytes in Ambulatory Practice and Potential Complications. *Journal of Equine Veterinary Science*; 98(1): 1-4.
- Rodríguez, M.B, Gambini, A., Clérico, G., Ynsaurralde-Rivolta, A.E., Briski, O., Largel, H., Sansinema, M., & Salamone, D.F. 2019. Time of first polar body extrusión affects the developmental competence of equine oocytes after

intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction, Fertility and Development*; 31(19): 1805-1811.

- Squires, E. L. 1996. Maturation and Fertilization of Equine Oocytes. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 12(1), 31–45
- Vazquez, J.C., Moreno, J.F., Hanneman, R., Evans, J.W. & Kraemer, D.C. 1993. Evaluation of three techniques (follicular aspiration, follicular aspiration and flushing and slicing of the ovaries) for recovery of equine oocytes from excised ovaries. *J. equine vet. Sci.* 13, 483-486.
- Velásquez-Castellanos, J.A., & Vargas, L. V. 2023. Efecto del cuerpo lúteo sobre la expresión de genes marcadores de calidad celular en ovocitos y células del cúmulus equinos sometidos a maduración in vitro. Trabajo de grado: Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales: Repositorio Institucional SIDRE: <https://repository.udca.edu.co/entities/publication/ebbc23c9-17be-4b83-829b-10b96c3a030f>
- Wayne, W. D. & Chad, L. C. 2013. *Biostatistics. A foundation for análisis in the health sciences*. Tenth edition. Ed. Wiley. USA. Pp 236 y 601.