MANUALES CLÍNICOS DE VETERINARIA

EDITORES DE LA COLECCIÓN
Juan Morgaz Rodríguez
Pilar Muñoz Rascón
Alba Galán Rodríguez

TÉCNICAS REPRODUCTIVAS EN LAS ESPECIES ANIMALES

Carlos C. Pérez Marín
Lydia Gil Huerta
Luis Ángel Quintela Arias

Escaneado con CamScanner

Manuales clínicos de Veterinaria

Técnicas reproductivas en las especies animales

EJEMPLAR GRATUITO
PROHIBIDA SU VENTA

Escaneado con CamScanner

Manuales clínicos de Veterinaria

Técnicas reproductivas en las especies animales

Editores

Carlos C. Pérez Marín (UCO)

Lydia Gil Huerta (UNIZAR)

Luis Ángel Quintela Arias (USC)

Editores de la colección

Juan Morgaz Rodríguez (UCO)

Pilar Muñoz Rascón (UCO)

Alba Galán Rodríguez (UCO)

ELSEVIER

Escaneado con CamScanner

ELSEVIER

Avda. Josep Tarradellas, 20-30, 1.º 08029 Barcelona, España

Técnicas reproductivas en las especies animales
de Carlos C. Pérez Marín, Lydia Gil Huerta y Luis Ángel Quintela Arias

© 2024 Elsevier España, S.L.U.
ISBN: 978-84-1382-371-3
eISBN: 978-84-1382-666-0

Todos los derechos reservados.

Reserva de derechos de libros
Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra solo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley. Diríjase a CEDRO (Centro Español de Derechos Reprográficos) si necesita fotocopiar o escanear algún fragmento de esta obra (www.conlicencia.com; 91 702 19 70/93 272 04 45).

Advertencia
Los profesionales de la salud e investigadores deben siempre contrastar con su propia experiencia y conocimientos la evaluación y el uso de cualquier información, método, compuesto o experimento descrito en esta obra. Los rápidos avances en el conocimiento científico requieren que los diagnósticos y las dosis de fármacos recomendadas sean siempre verificados de manera independiente. Conforme al alcance máximo permitido por la ley, ni Elsevier, ni los autores, editores o colaboradores asumen responsabilidad alguna por cualquier reclamación por daños que pudieran ocasionarse a personas o propiedades por el uso de productos o por negligencia, o como consecuencia de la aplicación de cualesquiera métodos, productos, instrucciones o ideas contenidos en esta obra. Con el único fin de hacer la lectura más ágil y en ningún caso con una intención discriminatoria, en esta obra se ha podido utilizar el género gramatical masculino como genérico, remitiéndose con él a cualquier género y no solo al masculino.

Servicios editoriales: DRK Edición
Depósito legal: B.14.868-2023
Impreso en Polonia

Escaneado con CamScanner

Sección 6

Técnicas relacionadas con la producción *in vitro* de embriones

Escaneado con CamScanner

Recogida de ovocitos en equinos

CAPÍTULO 28

Pablo Fernández Hernández, Marcos Luis Calero, Lauro González Fernández, Beatriz Macías García y José Manuel Ortiz Rodríguez

Introducción

Las técnicas de reproducción asistida son muy utilizadas en équidos para la obtención de descendencia. Dentro de estas técnicas se incluyen la fecundación *in vitro* (FIV) y la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI), para lo que se necesita la obtención previa de los gametos femeninos u ovocitos, que puede realizarse *in vivo* o *post mortem*.

En el momento del nacimiento, las hembras presentan un número determinado de ovocitos inmaduros en el estroma ovárico, rodeados por una única capa de células epiteliales, lo que conforma los folículos primordiales. En las yeguas, este número supera a los ovocitos que pueden ser utilizados durante la vida reproductiva. Una vez alcanzada la pubertad, durante el diestro se produce una oleada folicular seguida del crecimiento de un conjunto de folículos, cuyas células epiteliales secretan el fluido folicular que rellena el antro o cavidad folicular, rodeando al ovocito primario. Este fluido es el responsable de la maduración del ovocito en el folículo preovulatorio. En la fase estral del ciclo se determina el folículo dominante que continúa su desarrollo hasta la ovulación del ovocito maduro, y el resto de los folículos involucionan. En el 75% de los casos, las yeguas ovulan un folículo por ciclo estral, aunque en ocasiones pueden observarse ovulaciones de dos o tres folículos. Por lo tanto, si aspiramos un folículo dominante podemos obtener un ovocito maduro, pero en la aspiración del resto de los folículos se obtienen ovocitos inmaduros. Un ovocito maduro es aquel que ha reanudado la meiosis alcanzando la metafase II, fase en la que el ovocito sale del ovario mediante la ovulación y puede ser fecundado. La reanudación de la meiosis ocurre como respuesta a la señal endógena de la hormona luteinizante (LH) o tras la estimulación exógena con un análogo de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) o de la LH (gonadotropina coriónica humana [hCG]).

En diversas especies domésticas se han establecido protocolos de maduración de ovocitos mediante el cultivo *in vitro* en medios específicos suplementados con hormonas y otros componentes, como suero fetal bovino. Actualmente, alrededor del 60% de los ovocitos equinos sometidos a maduración *in vitro* alcanzan el estadio de metafase II (maduran) y pueden ser utilizados en programas de reproducción asistida.

Recogida de ovocitos *in vivo*

Existen dos posibilidades de recogida de ovocitos *in vivo:* una consiste en la aspiración de todos los folículos presentes en el ovario, es decir, tanto los que se encuentran en desarrollo como los atrésicos, para la obtención de ovocitos inmaduros; y otra en la aspiración de un folículo dominante para la obtención de un ovocito maduro.

Obtención de ovocitos inmaduros

La recolección de ovocitos inmaduros *in vivo* es un procedimiento descrito en yeguas desde hace tres décadas, que se realiza mediante la aspiración folicular transvaginal ecoguiada (OPU, *ovum pick up*). Esta técnica permite obtener un ovocito de cada folículo visible ecográficamente y puede realizarse en diferentes épocas del año, independientemente de la localización geográfica en la que se encuentre el animal. No obstante, es preferible realizarla en los

© 2024. Elsevier España, S.L.U. Reservados todos los derechos

Escaneado con CamScanner

periodos de transición entre el anestro y la época fértil, o viceversa, cuando las yeguas presentan mayor número de folículos. Una buena tasa de recuperación de ovocitos inmaduros mediante OPU se considera que está alrededor del 50% de los folículos aspirados.

Material

En primer lugar, se necesita un ecógrafo con sonda microconvexa o rectal, provista de un mango o funda rígida de teflón que permita alcanzar el fondo de la vagina y mantenerlo agarrado desde el exterior. Esta funda dispone de una guía para introducir una aguja de 12 G y doble lumen, es decir, un canal de entrada conectado a un sistema de infusión para el fluido de lavado, separado de un canal de salida para la aspiración y conectado a una bomba de vacío que permite la recolección del fluido folicular y los ovocitos en una botella colectora (fig. 28.1). Para el lavado folicular se dispone de medios comerciales, pero hay trabajos que demuestran que se pueden utilizar medios de lavado de embriones suplementados con 4-8 UI/ml de heparina. En cuanto a la presión de vacío de la bomba, no existe una presión determinada, sino que se debe ajustar para realizar una aspiración de 20 ml en aproximadamente 60 s.

El laboratorio tiene que contar con una lupa estereoscópica, campana de flujo laminar y placa térmica para mantener estable la temperatura de los ovocitos. El contenido de la botella colectora pasará por un filtro con un tamaño de poro no superior a 80 µm, y para la búsqueda de los ovocitos se utilizan placas de Petri y pipetas estériles. Además, en el laboratorio se utilizarán medios de lavado, de mantenimiento y de envío de ovocitos (fig. 28.2).

Procedimiento

La técnica se realiza con la yegua en estación sometida a sedación y analgesia balanceada. Algunos veterinarios prefieren utilizar anestesia epidural, mientras que otros prefieren el uso de una combinación de agonistas alfa-2 (p. ej., detomidina) y opiáceos (p. ej., morfina, butorfanol, etc.) en bolos o en infusión continua. Es importante recordar que es una técnica incómoda para la yegua y que puede generar bastante dolor y movimientos durante el proceso que dificultan la OPU. Por ello, es importante contar con un buen protocolo de sedoanalgesia y administrar medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, así como antibióticos de amplio espectro, durante el procedimiento.

Esta técnica requiere tres o cuatro personas, dependiendo del material y de las preferencias del equipo veterinario que realice la OPU. Una persona se encarga de la monitorización del estado general y de la sedación del animal, una manipula el ovario

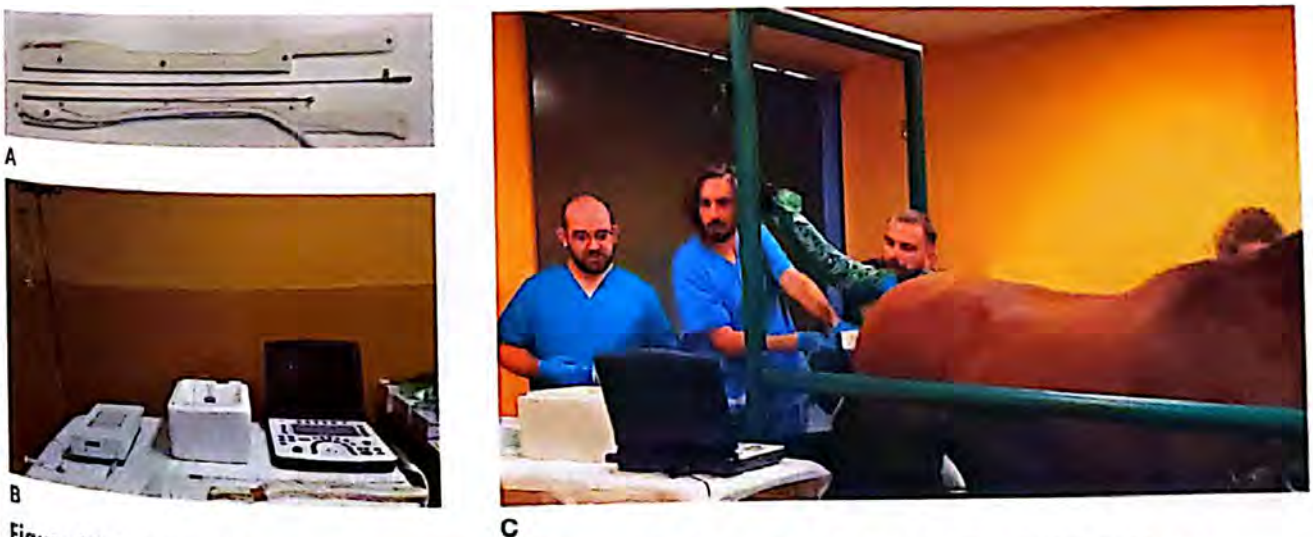
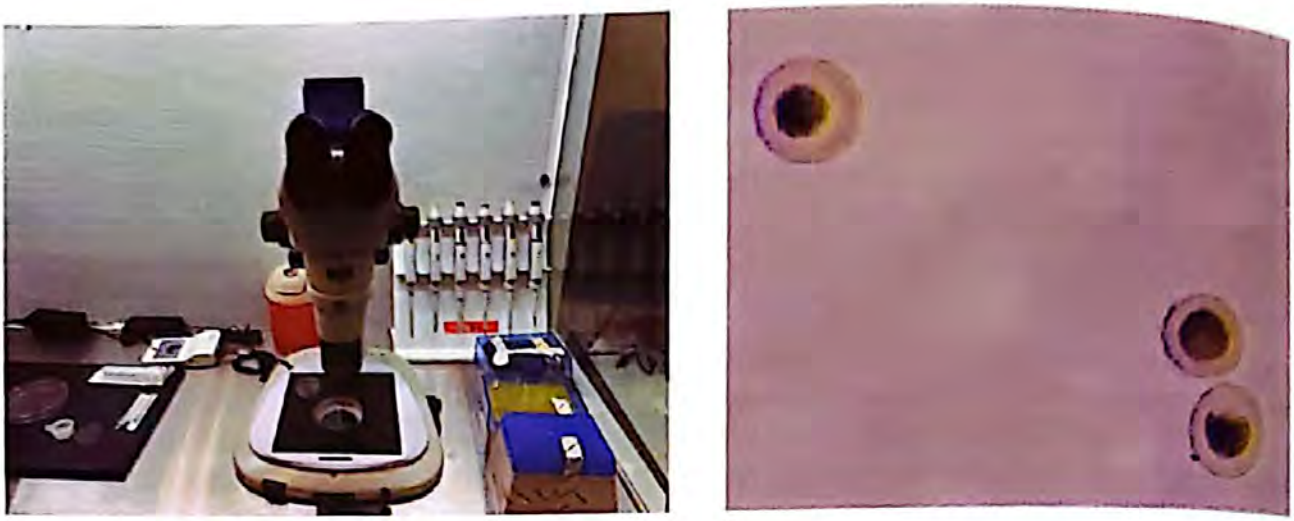


Figura 28.1. Material y personal necesarios para la obtención de ovocitos de yegua mediante OPU. **A.** Mango con sonda microconvexa, guía y aguja de doble lumen de 12 G. **B.** Bolsa de medio de lavado, bomba de vacío, botella para recuperación del material aspirado y ecógrafo. **C.** De izquierda a derecha: operario encargado de la inyección del medio de lavado, operario que maneja la aguja, veterinario que manipula el mango y el ovario, y persona encargada de la sedación de la yegua.

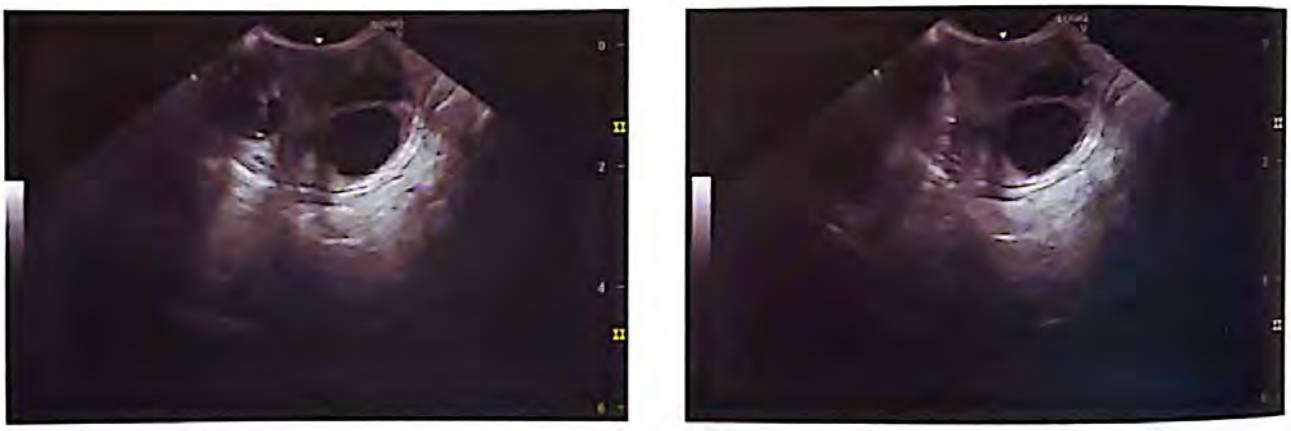
© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Escaneado con CamScanner



A B

Figura 28.2. Búsqueda de ovocitos en el laboratorio. **A.** Campana de flujo laminar con placa térmica y material necesario (micropipetas, puntas estériles, placas de Petri, filtro y medios). **B.** Ovocitos obtenidos mediante OPU.



A B

Figura 28.3. Imagen ecográfica transvaginal del procedimiento de OPU. En la parte superior izquierda de ambas imágenes se observa la aguja de doble lumen punzando un folículo. **A.** Folículo punzado. **B.** Folículo colapsado tras la aspiración del fluido folicular.

por vía rectal y la sonda ecográfica situada en el interior de la vagina, otra maneja la aguja y el pedal de aspiración, y una cuarta se encarga de inyectar el fluido de lavado (v. fig. 28.1); esta última persona es prescindible en caso de usar una bomba con dos pedales, uno para la inyección del fluido y el otro para aspiración. Además, es posible realizar la manipulación ovárica y el manejo de la aguja al mismo tiempo, con una bomba de dos pedales, y así llevar a cabo el procedimiento solo con dos veterinarios. Sin embargo, la OPU requiere mucha práctica y expone a las yeguas a una serie de riesgos, por lo que no es recomendable realizarla con poco personal.

Tras vaciar el recto y realizar un lavado de la región perineal de la yegua, se introduce el mango con la sonda ecográfica por la vagina, provisto de camisa sanitaria. Una vez colocada la sonda, se introduce la aguja por la guía y uno de los operadores, mediante manipulación rectal, extrae el ovario del ligamento ancho y lo aproxima a la porción craneal de la vagina, donde se encuentra la sonda ecográfica, para lo que es necesario tratar a la yegua con butilescopolamina para tener una relajación rectal completa. Los folículos tienen que ser posicionados para que el veterinario que manipula la aguja avance atravesando el fórnix vaginal y alcance el antro del folículo (fig. 28.3), aspirando el fluido folicular mediante el pedal de vacío de la bomba. Una vez aspirado el folículo, este será lavado al menos seis veces consecutivas con la coordinación del operador encargado de

Escaneado con CamScanner

inyectar el medio de lavado y el que manipula la aguja y aspira el contenido. El volumen de fluido que se introduce para los lavados depende del tamaño de cada folículo; en nuestro caso, lo estimamos según el volumen teórico de la esfera que generaría el diámetro del folículo aspirado ($V = 4/3\ \pi r^3$, donde r es el radio del folículo). Además, junto con la aspiración, el veterinario que manipula el ovario realiza un masaje rectal del folículo y el que manipula la aguja raspa las paredes foliculares mediante movimientos rotacionales de la aguja, lo que facilita la recolección del complejo cúmulo-ovocito que se encuentra adherido a la pared folicular. Es conveniente visualizar en el ecógrafo cómo se llena y vacía el folículo durante los diferentes lavados, lo que también se percibe mediante palpación por el veterinario que manipula el ovario. En ocasiones, debido a pequeños movimientos se dificulta la visualización de los lavados foliculares, pero si el veterinario que maneja el ovario está cómodo, se recomienda continuar con ellos hasta finalizar.

En cuanto a la colocación del material, se recomienda colocar el ecógrafo, la bomba de aspiración y el resto del sistema a la derecha de la yegua para la manipulación del ovario izquierdo. El veterinario encargado de colocar los folículos manipulará dicho ovario con su mano derecha en el recto y con la izquierda sujetará el mango de la sonda ecográfica, lo que permite que el mango de la sonda esté en el lado derecho del operador y pueda ser empujado hacia la derecha para permitir que la punta de la sonda se mueva hacia la izquierda visualizando el ovario (v. fig. 28.1). Para la manipulación del ovario contralateral se recoloca todo el material al lado izquierdo del animal. No obstante, algunos veterinarios manipulan ambos ovarios sin cambiar de posición el material, o utilizan el brazo homolateral al ovario a aspirar, pero en yeguas que presentan poca laxitud del ligamento ancho resulta complicado. Durante el procedimiento, colocar una sonda urinaria facilita la manipulación de la sonda ecográfica, ya que si la vejiga contiene demasiada orina puede dificultar los movimientos de la sonda e incomodar a la yegua.

Antes de iniciar el procedimiento, el medio de lavado y la botella de recolección son atemperados a 38 °C, para evitar el estrés térmico a los ovocitos. Algunas bombas de aspiración disponen de termostato para mantener la temperatura tanto del medio como de la botella colectora. No obstante, la botella donde se recogen los ovocitos puede mantenerse a temperatura ambiente (15-23 °C) durante la OPU, ya que la temperatura descenderá progresivamente y los ovocitos inmaduros pueden sobrevivir al menos 24 h a esta temperatura, evitando cambios bruscos.

Una vez aspirados todos los folículos visibles ecográficamente, la botella que contiene los ovocitos se traslada a un laboratorio, donde se realizan el filtrado y el aclarado del contenido; en este paso es muy importante mantener siempre el filtro con líquido. Después del aclarado, el líquido remanente se deposita en una placa de búsqueda lavando bien el filtro, para posteriormente localizar los ovocitos con el uso de la lupa estereoscópica (v. fig. 28.2). Los ovocitos pueden ser enviados a un laboratorio especializado en FIV o ICSI, gracias a su fácil conservación en un medio de transporte, donde realizarán la maduración de los ovocitos y posteriormente la fecundación. Los medios de envío pueden prepararse en el laboratorio usando medios basados en TCM *(tissue culture medium)* adicionado con suero fetal bovino (20% v/v) y antibiótico (generalmente gentamicina, 25 µg/ml). Además, algunos medios comerciales (Holding) han sido testados y pueden utilizarse para mantener los ovocitos viables a temperatura ambiente hasta 48 h.

Finalizado el procedimiento, el material de la OPU (agujas, mango de la sonda y botella colectora) puede lavarse con líquidos no tóxicos para los ovocitos y esterilizarse en un autoclave.

Riesgos

La aspiración de ovocitos transvaginal es un procedimiento seguro para el animal, pero doloroso y de complicada manipulación, por lo que requiere buen entrenamiento del personal veterinario que lo realiza y un control exhaustivo de la sedación y la analgesia del animal. Una maniobra forzada puede causar laceraciones en el recto, peritonitis y adherencias. En ocasiones se han descrito infecciones ováricas, pero la incidencia es inferior al 0,5%. No obstante, repetidas sesiones de OPU en la misma yegua por un equipo veterinario entrenado no causan complicaciones reproductivas. Además, la fertilidad de la yegua se mantiene, ya que el crecimiento de los folículos y la viabilidad de los ovocitos no se ven afectados por la aspiración folicular repetida de los ovarios.

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito.

Escaneado con CamScanner

Aplicaciones clínicas

La OPU es un procedimiento muy demandado por propietarios de yeguas de alto rendimiento deportivo, ya que no requiere tratamientos hormonales ni un seguimiento exhaustivo del animal; solo es necesario un único procedimiento y la yegua puede retomar su rutina en dos días. Asimismo, es la técnica de elección para aquellas yeguas que no quedan gestantes ni tienen buenos resultados en los programas de transferencia de embriones. Por lo tanto, la OPU se utiliza en hembras de edad avanzada o con problemas reproductivos, como infecciones uterinas recurrentes u obstrucciones de los oviductos, entre otros, y es la única alternativa en yeguas infértiles.

Por otro lado, ofrece la posibilidad de ampliar la elección de sementales para la obtención de descendencia de una misma yegua, así como el uso de sementales con baja fertilidad *in vivo* o de eyaculados congelados cuya calidad o cantidad es limitada para la realización de una inseminación artificial.

Obtención de ovocitos maduros

La aspiración de ovocitos madurados *in vivo* puede realizarse mediante OPU, pero es preferible hacerla a través del flanco de la yegua, ya que el complejo cúmulo-ovocito no se encuentra adherido a la pared en los folículos preovulatorios y no requiere lavados foliculares, solo la aspiración del fluido. Además, los ovocitos maduros son susceptibles a los cambios de temperatura y el sistema utilizado para la aspiración por el flanco es de menor longitud, existiendo menor probabilidad de que la temperatura varíe de los 38 °C.

Material

Para la aspiración folicular por el flanco se necesita un bisturí con el que se realiza una pequeña incisión, a través de la cual se introduce un trocar de acero inoxidable y 10 G de diámetro interno (3,571 mm). También es necesaria una aguja de 20 cm de longitud, conectada mediante un tubo de extensión a una jeringa de plástico y sin émbolo de caucho de 50 ml para realizar la aspiración (fig. 28.4). Se utilizará un medio heparinizado que puede ser el mismo que el descrito anteriormente para la aspiración de ovocitos inmaduros.

Procedimiento

En primer lugar hay que realizar un seguimiento exhaustivo del ciclo estral de la yegua e inducir la ovulación con hCG o GnRH para llevar a cabo la aspiración folicular 24-35 h después. En un potro de contención, se administra sedación y analgesia a la yegua, tras lo que se rasura y se realiza la preparación estéril de una zona de al menos 6 × 6 cm en el flanco correspondiente al ovario donde se encuentra el folículo preovulatorio (v. fig. 28.4). Tras fijar

A B C

Figura 28.4. Aspiración folicular por el flanco. **A.** Material, de izquierda a derecha: hoja de bisturí del n.º 11, trocar y cánula de 10 G, aguja de 20 cm, tubo de extensión y jeringa de 50 ml. **B.** Colocación del trocar. **C.** Aspiración del contenido folicular tras introducir la aguja.

Escaneado con CamScanner

el ovario por vía transrectal pegado a la pared abdominal, se identifica el lugar de proyección de este donde se va a realizar la punción, se administra un anestésico local (p. ej., mepivacaína) y un veterinario se coloca un guante estéril en la mano homolateral al ovario para manipular el material, introduciendo la otra en el recto para manejar el ovario. Una vez localizado por palpación, el ovario que presenta el folículo preovulatorio se coloca en la pared abdominal, justo en la zona preparada y anestesiada. Con la mano estéril se realiza una pequeña incisión con un bisturí, por la que se introduce el trocar de ciego horizontalmente y se retira la cánula. Con ayuda de otro operador que maneje la jeringa de aspiración, se aspira al menos 1 ml de medio de lavado atemperado a 38 °C y, a continuación, se coloca el folículo preovulatorio en la cánula y se introduce la aguja. Una vez dentro del antro folicular, el operador encargado de la jeringa aspira todo el fluido lentamente para no dañar al ovocito, mientras se masajea vigorosamente el folículo. Por último, en el laboratorio se deposita el fluido folicular en placas de Petri y se localiza el ovocito maduro con la ayuda de una lupa estereoscópica calentada a 38 °C. En el caso de los ovocitos madurados *in vivo* es muy importante mantener la temperatura constante a 38 °C para preservar la viabilidad.

Ventajas

La principal ventaja de aspirar solo folículos preovulatorios es que se obtienen ovocitos madurados *in vivo* con una tasa de recuperación del 80% aproximadamente, mientras que en la aspiración de todos los folículos la tasa es del 50%. Además, estos ovocitos no requieren maduración *in vitro* y presentan una mayor competencia en la producción de embriones viables. Asimismo, los ovocitos pueden ser transferidos directamente, por laparotomía, al oviducto de una receptora ya inseminada para obtener una gestación. Por otro lado, esta técnica resulta más fácil para aquellos veterinarios que realizan por primera vez la aspiración de ovocitos, ya que los folículos preovulatorios son grandes y su palpación y manipulación resultan menos complicadas.

Limitaciones

Las principales desventajas de la obtención de ovocitos madurados *in vivo* radican en la monitorización del crecimiento folicular y la determinación del momento de inducción de la ovulación. Además, la aspiración debe realizarse cuando el folículo haya respondido al inductor para asegurar que el ovocito ha reanudado la meiosis, pero antes de la ovulación. Al mismo tiempo, hay que tener en cuenta que la fecundación debe realizarse pasadas 36 o 48 h de la inducción de la ovulación, dependiendo de si la inducción fue con hCG o con GnRH, respectivamente, por lo que es importante coordinarse con el laboratorio que realiza la FIV o la ICSI. Por último, cabe destacar que las yeguas no responden a los tratamientos de superovulación, por lo que en cada ciclo estral se obtiene un único ovocito maduro; son escasas las veces en que se obtiene más de uno.

Recogida de ovocitos *post mortem*

En ocasiones, una yegua de alto valor genético puede fallecer o presentar algún problema por el que deba someterse a eutanasia de forma inesperada. En estas situaciones, los ovarios se pueden retirar y enviar a un laboratorio encargado de extraer y madurar los ovocitos *post mortem*, para una posterior fecundación y obtención de descendencia. Los ovarios deben retirarse cuanto antes, pero hay estudios que indican que los mejores resultados se obtienen cuando llegan al laboratorio en las primeras 6 h tras la muerte o cuando son retirados antes de la eutanasia. Cuando los ovocitos van a ser extraídos en las primeras 2 h, los ovarios pueden mantenerse a temperatura corporal (37 °C), pero si el transporte es de mayor duración se debe disminuir la temperatura progresivamente hasta alcanzar la temperatura ambiente (15-23 °C), y nunca mantener los ovarios a una temperatura inferior a 12 °C. El trasporte se puede realizar en una caja isotérmica con los ovarios almacenados en bolsas de plástico. No obstante, cuando no hay un laboratorio cercano se pueden extraer los ovocitos en el lugar donde se encuentra la yegua y enviarlos en un medio de transporte a temperatura ambiente, como ya se ha descrito.

En las vacas y las cerdas, los ovocitos se extraen mediante aspiración de los diferentes folículos con aguja y jeringa, pero en las yeguas hay que raspar

© Elsevier. Fotocopiar sin autorización es un delito

Escaneado con CamScanner

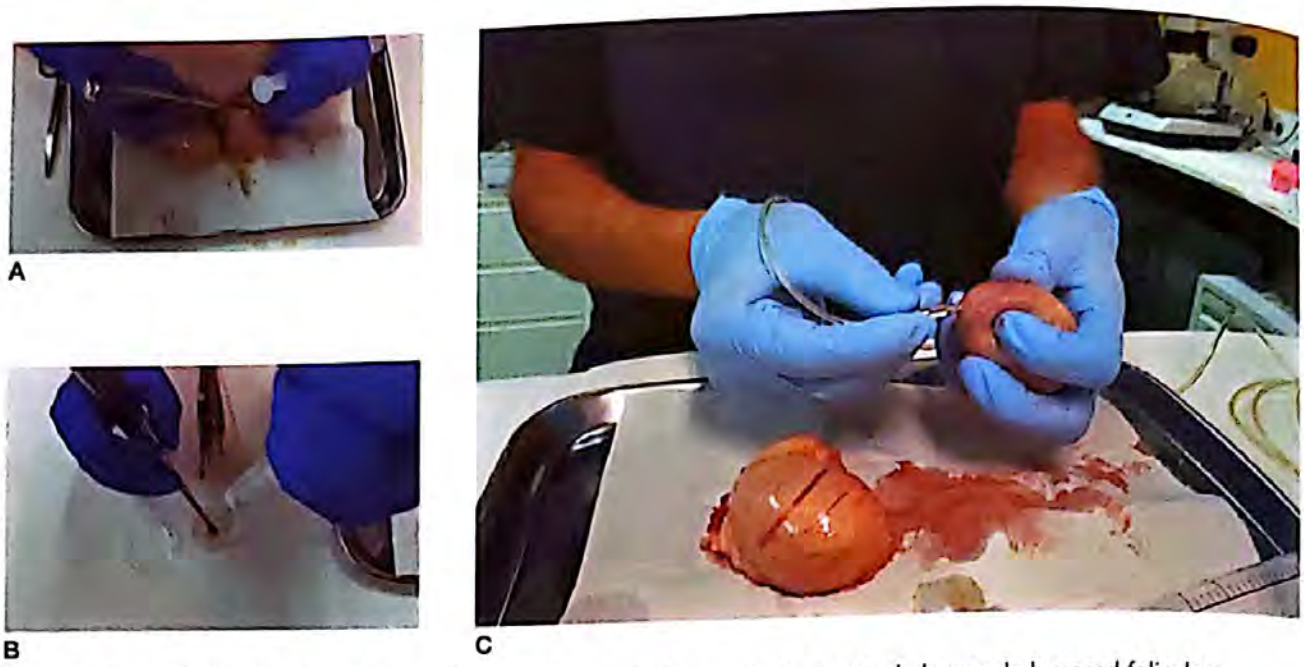


Figura 28.5. Obtención de ovocitos *post mortem*. **A.** Raspado mediante cureta de hueso de la pared folicular. **B.** Lavado del material obtenido en una placa de Petri para la búsqueda del complejo cúmulo-ovocito. **C.** Aspiración de los folículos con bomba de vacío.

las paredes foliculares. Por lo tanto, la aspiración de los ovocitos puede hacerse con una bomba de vacío y una aguja de 14 G raspando bien las paredes, o mediante el uso de bisturí y cureta de hueso (fig. 28.5). Este último método es el más eficiente y consiste en raspar por completo las paredes foliculares. En primer lugar, mediante palpación se localizan los diferentes folículos en la superficie ovárica y con un bisturí se realiza un corte, tras lo que se raspa la pared folicular con la cureta y esta se coloca en una placa de Petri de 35 mm, depositando el tejido raspado en la placa y aplicando medio de lavado con una jeringa de 10 ml y una aguja de 20 G. Este procedimiento se realiza tantas veces como sea necesario para raspar el folículo por completo. Es conveniente utilizar una placa por folículo. Una vez finalizado el raspado de un folículo, con la lupa estereoscópica se localiza el ovocito. Tras raspar todos los folículos de la superficie ovárica se realiza un corte longitudinal del ovario para obtener los ovocitos de los folículos que se encuentran en la parte interna del ovario. En caso de utilizar la bomba de vacío, el contenido aspirado de todos los folículos se depositará en placas de Petri para la búsqueda de los ovocitos.

Bibliografía recomendada

Carnevale EM. Advances in collection, transport and maturation of equine oocytes for assisted reproductive techniques. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2016;32:379-99.

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;81:138-51.

Hinrichs K. Advances in holding and cryopreservation of equine oocytes and embryos. *J Equine Vet Sci* 2020;89:102990.

Hinrichs K. Assisted reproduction techniques in the horse. *Reprod Fertil Dev* 2013;25:80.

Hinrichs K. Assisted reproductive techniques in mares. *Reprod Domest Anim* 2018;53(Suppl 2):4-13.

Lazzari G, Colleoni S, Crotti G, Turini P, Fiorini G, Barandalla M, et al. Laboratory production of equine embryos. *J Equine Vet Sci* 2020;89:103097.

Squires E. Current reproductive technologies impacting equine embryo production. *J Equine Vet Sci* 2020;89:102981.

Stout TAE. Clinical application of in vitro embryo production in the horse. *J Equine Vet Sci* 2020;89:103011.

Velez IC, Arnold C, Jacobson CC, Norris JD, Choi YH, Edwards JF, et al. Effects of repeated transvaginal aspiration of immature follicles on mare health and ovarian status: effect of transvaginal aspiration on health. *Equine Vet J* 2012;44:78-83.

Escaneado con CamScanner