

Efecto de los suplementos fluido folicular y suero fetal bovino sobre la maduración *in vitro* de oocitos equinos

Giovanni Restrepo Betancur*, John Jairo Giraldo Giraldo**, Jorge Gómez Oquendo***, Neil Vásquez Araque****, Eliana María Vásquez Correa*****, Jorge Andrés Ortega Flórez*****, Luis Fernando Córdoba*****

Resumen

Introducción. La producción de embriones (PIVE) en equinos es una técnica que genera mayor eficiencia reproductiva de ejemplares de alto valor genético. Sin embargo, es una técnica con un acceso y un éxito limitado, debido a las dificultades para alcanzar tazas de fertilización eficientes mediante fertilización *in vitro* (FIV) convencional, y por las altas necesidades en recursos técnicos y económicos para la fertilización por ICSI, entre otras limitaciones para el desarrollo embrionario *in vitro*. Un paso fundamental para la PIVE en equinos es la maduración *in vitro* (MIV), dado que determina la capacidad que un ovulo tendrá para desarrollarse en un embrión. Se han evaluado diferentes medios, fluidos y moléculas para el mejoramiento de este proceso. Sin embargo, aun no se conoce una composición óptima del medio de maduración para oocitos equinos. **Objetivo.** Evaluar dos componentes para la MIV, el suero fetal bovino (SFB) y el fluido folicular equino (FF), para conocer las condiciones fisiológicas reproductivas de la hembra equina en nuestro medio, cual componente es más favorable para la MIV, como un indicador de la habilidad de los oocitos para el desarrollo embrionario. **Materiales y Métodos.** Para la MIV, el SFB y el FF, fueron incluidos individualmente en una proporción del 20%, en medio TCM-199 suplementado adicionalmente con ganadotropinas (FSH y LH), an-

* Médico Veterinario y Zootecnista, magíster en Biotecnología, candidato a doctor en Biotecnología. Profesor asistente. Facultad de Ciencias Agrarias, Politécnico Colombiano Jaime Izasa Cadavid

** Zootecnista, especialista en Reproducción Animal, candidato a magíster en Ciencias – Biotecnología. Docente investigador. Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias, Corporación Universitaria Lasallista

*** Médico Veterinario, Profesor titular. Facultad de Ciencias Agrarias, Politécnico Colombiano Jaime Izasa Cadavid

**** Biólogo, M.Sc. en Biotecnología, candidato a Ph. D. en Biotecnología. Profesor asociado. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín

tibióticos, glutamina, insulina, transferrina y selenio. Grupos de 5 oocitos fueron incubados por 36 horas en condiciones ambientales controladas de 39°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. **Resultados.** Se evidenciaron mayores porcentajes de expansión máxima del cumulo para los oocitos suplementados con SFB (47,5%), respecto a los madurados con FF (16,2%). No se encontró diferencia estadística para los porcentajes totales de MIV entre los tratamientos. **Conclusión.** El SFB como suplemento en la MIV, ejerce un efecto benéfico sobre la expansión del cumulo de oocitos equinos.

Effect of follicular fluid and bovine fetal serum supplements on *in vitro* maturation of horse oocytes

Abstract

Introduction. The production of embryos in horses is a technique that provides higher reproduction efficiency for animals with a high genetic value. The access to it and its success are limited, though, due to the difficulties to reach efficient fertilization rates by the use of *in vitro* conventional fertilization, and given the need of many technical and economic resources for ICSI (intracytoplasmic sperm injection), among other limitations for embryo development *in vitro*. A fundamental step for embryo production in horses is the *in vitro* maturation, because it determines the capability an egg has to become an embryo. Several media, fluids and molecules have been evaluated, aiming to improve this process, but an optimal composition of the maturation medium for horse oocytes is not yet known. **Objective.** To evaluate two components for *in vitro* maturation: The bovine fetal serum and the horse's follicular fluid, to understand the physiological reproductive conditions of mares in our environment and what component is better for the maturation as an indicator of the oocyte's ability to develop itself as an embryo. **Materials y Methods.** For the *in vitro* maturation, the bovine fetal serum and the horse's follicular fluid, they were individually included in a 20% proportion in TCM-199 medium, additionally supplemented with gonadotropins (FSH and LH), antibiotics, glutamine, insulin, transferrin and selenium. Groups of 5 oocytes were incubated during a 36 hours period in controlled environmental conditions, at 39°C, 5% of CO₂ and 90% of relative humidity. **Results.** Higher percentages of maximum expansion of the cluster could be seen for oocytes supple-

***** Estudiante de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias, Corporación Universitaria Lasallista

***** Estudiante de Ingeniería Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Politécnico Colombiano Jaime Izasa Cadavid

***** Estudiante de Ingeniería Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Politécnico Colombiano Jaime Izasa Cadavid

mented with bovine fetal serum (47.5%) compared with those matured with horse's follicular fluid (16,2%). No statistic difference was found for the *in vitro* maturation percentages between treatments. **Conclusion.** The bovine fetal serum as a supplement for *in vitro* maturation has a beneficial effect on the cluster expansion of horse's oocytes.

Introducción

La biotecnología reproductiva es una herramienta reciente que permite el aprovechamiento de los rasgos genéticos de valor de los animales, en la búsqueda de un mayor beneficio productivo para el hombre. Para la especie equina se han implementado biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial, la transferencia de embriones, la producción *in vitro* de embriones (PIVE) y la clonación; sin embargo, las tasas de éxito para algunas de ellas, se han visto limitadas ya sea por restricciones de tipo técnico o por barreras de tipo fisiológico, propias de dicha especie¹.

La inseminación artificial y la transferencia de embriones en equinos han logrado importantes avances en países donde la explotación equina es altamente relevante. Para el caso de la clonación son escasos los reportes de éxito, mientras que para la PIVE se han logrado valiosos avances en países como Estado Unidos, Italia, Holanda y Francia. En Colombia técnicas como la inseminación artificial y la transferencia de embriones son actualmente aplicadas a la reproducción equina, aunque su difusión a los productores sea aun muy escasa. Mientras tanto, algunas limitantes logísticas aún nos ubican algo distantes de la aplicación de la clonación en equinos. El paso siguiente entonces, para el avance de tecnologías aplicadas a la reproducción equina en Colombia, esta representado por la PIVE.

En la actualidad no existen reportes de avances en este sentido en el país, tal como sí se han logrado para el caso de la producción *in vitro* de embriones bovinos. La PIVE en equinos puede representar para el sector de la producción equina en Colombia, una mayor eficiencia reproductiva de animales de alto valor genético, superando el aporte dado por biotecnologías como la inseminación artificial y la transferencia de embriones, en la búsqueda de sobreponerse al escaso aprovechamiento de una genética equina reconocida en el ámbito mundial por su alto valor. Con esta finalidad es necesario entonces avanzar en el establecimiento de procesos de PIVE en equinos²⁻⁵.

Para ello, es necesario inicialmente establecer en nuestro medio los protocolos adecuados de obtención de células germinales femeninas (oocitos), y las condiciones de maduración *in vitro*, que permitan obtener oocitos con características apropiadas para alcanzar la fertilización *in vitro* y el desarrollo embrionario⁶. Esta investigación pretende entonces determinar las mejores condiciones *in vitro* para

la obtención de oocitos maduros equinos, con proyecciones de una buena calidad para su fertilización *in vitro*, como paso inicial en la búsqueda de la producción *in vitro* de embriones equinos en las condiciones de nuestro país.

Materiales y métodos

La recolección del material de estudio representado por ovarios de yeguas con fisiología reproductiva normal se realizó en el corregimiento Los Palomos del Municipio de Guarne (Antioquia), en la planta de sacrificio de equinos, mientras que los procesos de maduración *in vitro*, se desarrollaron en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.



Imagen 1. Planta de sacrificio de equinos

Procesamiento de material de investigación

Los ovarios de equino fueron obtenidos de hembras con historia reproductiva desconocida en una planta de faenado equino. Se depositaron en solución salina estéril al 0.9% (con 40mg/L de sulfato de gentamicina) a 25-30°C para luego ser transportados (en aproximadamente 3 horas) hacia el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional, Sede Medellín para su procesamiento.

En el laboratorio, bajo condiciones asépticas se lavaron los ovarios tres veces con PBS a 30°C para retirar material contaminante, sangre y detritus tisulares. Antes de la recolección de los oocitos se realizó la remoción de la túnica albugínea ovárica para permitir la visualización de los folículos ováricos. Luego con aguja N°18 en jeringa de 20 mL, se procedió a la aspiración de los folículos y el líquido fue recolectado en tubos cónicos de 50 mL con PBS suplementado con heparina 25 UI/ml.

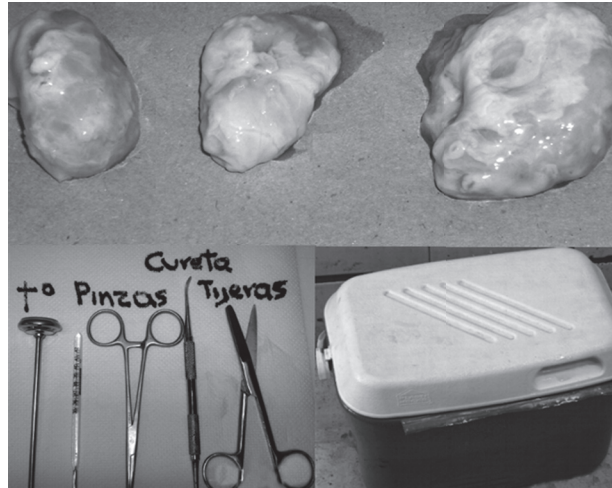


Imagen 2. Ovarios equinos (arriba), y materiales de recolección y transporte de ovarios (abajo)

Durante la aspiración un movimiento de raspado fue desarrollado con la aguja en el interior del folículo, el cual fue lavado con su propio líquido folicular. Después de 20 minutos de sedimentación, el pelet fue extraído con una pipeta estéril y fue depositado en cajas de petri de 100mm para la localización de los complejos cúmulo-ooocito (CCO) mediante un estereoscopio.

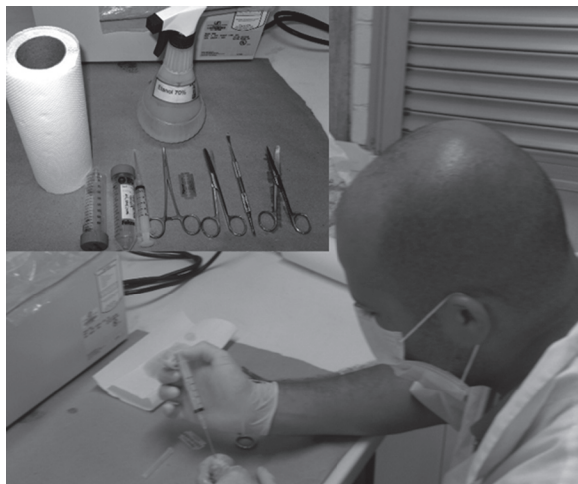


Imagen 3. Procedimiento de aspiración de ovarios

Después de que todos los folículos visibles fueron aspirados, los ovarios fueron cortados en rodajas de aproximadamente 5mm, para encontrar folículos en el estroma ovárico. Los oocitos fueron recolectados desde estos folículos por raspado con una cureta para hueso calibre 0.5. Los contenidos colectados fueron puestos en una caja de petri de 100mm en medio TCM-199, y los oocitos fueron seleccionados y lavados tres veces.

El líquido folicular recuperado por aspiración fue decantado por 20 minutos. Luego se procedió a depositar el precipitado, el cual fue resuspendido en una caja de Petri estéril de 60 x 15 mm en 6 ml de medio de TCM-199 suplementado con albúmina sérica bovina (BSA) 0,2% (p/v) y piruvato. Bajo visión con estereomicroscopio se seleccionaron los CCO de buena calidad según criterios de citoplasma intacto, cúmulos rodeando completamente el oocito, y aspecto homogéneo.

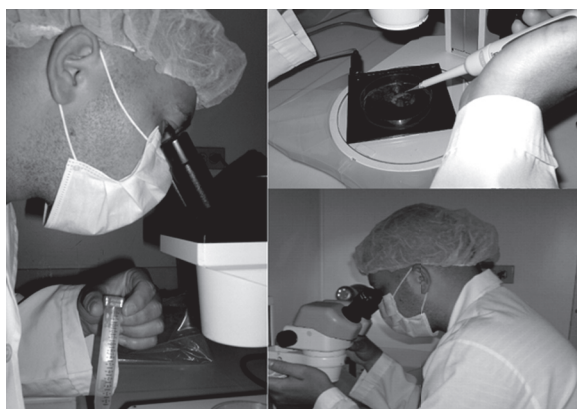


Imagen 4. Procedimiento de selección de CCO`s

Los CCO seleccionados fueron lavados tres veces en el mismo medio, y en grupos de diez se cultivaron durante 38 horas a 39°C en gotas de 50µL cubiertas con aceite mineral, de medio de maduración TCM-199 suplementado de acuerdo con el grupo de estudio.

El fluido folicular destinado para la suplementación de la maduración *in vitro* fue obtenido de folículos aspirados de un mismo ovario, fue centrifugado por 1500 rpm durante 5 minutos para sedimentar las células foliculares y recolectar el fluido. Este mismo fluido folicular fue destinado para todas las repeticiones durante el experimento.

Maduración *in vitro* de CCO

El medio de maduración TCM 199 fue suplementado con 29.2 µg/mL de glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, 0.25 µg/mL de anfotericina B, 10,0 µg/mL de insulina, 5,0 µg/mL de selenio, 5.5 µg/mL de transferrina, gonadotropinas (0,01 UI/mL de FSH porcina, 0,01 UI/mL de LH equina), 10% de suero fetal bovino o 20% de fluido folicular (Hinrichs *et al*, 2002). Las condiciones de cultivo fueron de 39°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa por 38 horas (tabla 1).

Tabla 1. Grupos de MIV con suero bovino fetal o fluido folicular durante 38 horas

Grupos	MADURACIÓN		
	Gonadotropinas	10% Suero bovino fetal	20% Fluido folicular
1	+	+	-
2	+	-	+

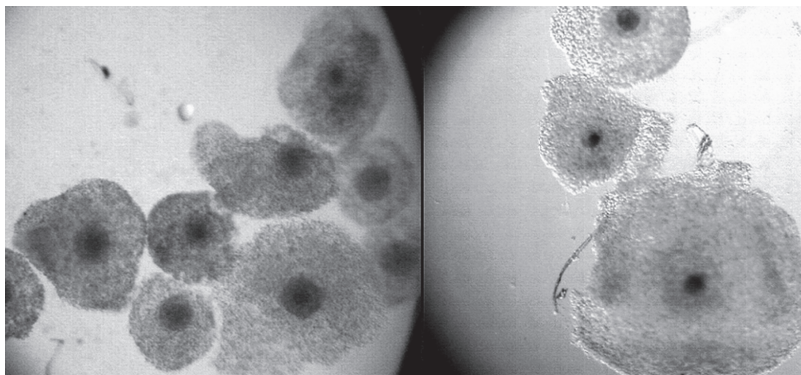


Imagen 5. Oocitos equinos madurados *in vitro*

Evaluación de la maduración *in vitro*

Al terminar el tiempo de maduración de 38 horas, los CCO fueron evaluados y clasificados para ambos tratamientos según tres categorías de expansión del cúmulo (expansión mínima, expansión media o expansión total), como parámetro correlacionado con la maduración *in vitro*. Posteriormente los CCO fueron desnudados de células de la granulosa por pipeteo en hialuronidasa al 2%. Luego, los oocitos desnudos fueron evaluados por microscopia para la evaluación de la presencia de cuerpo polar (en fresco), y luego transferidos a una gota de DAPI

0,1µg/ml (colorante fluorescente afín al ADN) por 3 a 5 minutos en oscuridad. Posteriormente fueron lavados en PBS por 5 minutos. La observación se realizó en un microscopio de fluorescencia con filtro de 380nm a 500nm y se determinó la maduración por la presencia o ausencia de cuerpo polar.

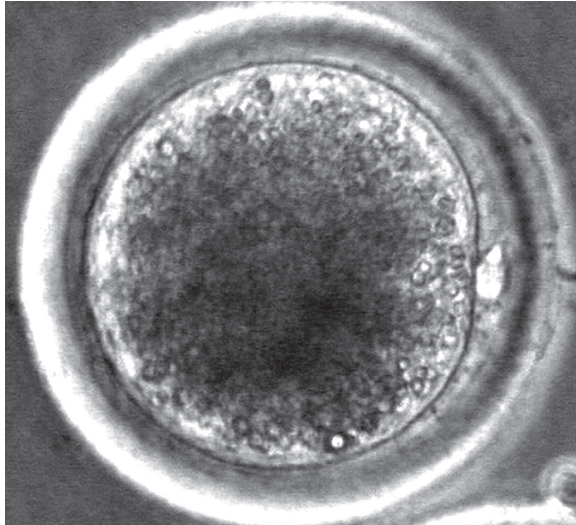


Imagen 6. Oocito equino madurado in vitro
(con presencia de cuerpo polar)

Análisis de resultados

Se realizó un estudio experimental de diseño de bloques al azar. La valoración estadística descriptiva, y la comparación de las medias por una prueba T de student entre los tratamientos se realizaron mediante el programa StatGraphics Plus 3.0.

Resultados y discusión

Fueron recuperados por aspiración de ovarios un total de 77 CCO equinos viables para la maduración *in vitro*, a partir de 11 repeticiones, lo cual arroja un promedio de 7 CCO, a partir de entre 8-10 ovarios disponibles por sesión. El total de los oocitos recuperados fue sometido a MIV, distribuido entre los tratamientos de suplementación de la maduración con suero fetal bovino (SFB) y fluido folicular equino (FF). La imagen 7 muestra la expansión de la granulosa en CCO madurados mediante ambos tratamientos.

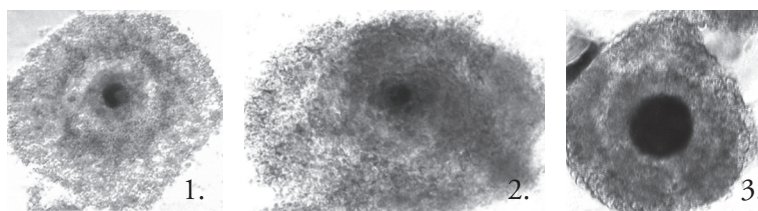


Imagen 7. CCO equinos madurados *in vitro* en tratamientos con SFB y FF

1. Oocito inmaduro; 2. Oocito madurado en SFB; 3. Oocito madurado en FF.

Conocida la expansión del cúmulo como un indicador de MIV, se definieron tres categorías de expansión (mínima, media y total), las cuales fueron evaluadas para los CCO madurados a través de ambos tratamientos. La tabla 2, muestra los resultados encontrados.

Tabla 2. Distribución según tres categorías de expansión del cúmulo para CCO equinos para los tratamientos de MIV con SFB y FF

<i>Categorías</i>	<i>Tratamiento SFB # CCO (%)</i>	<i>Tratamiento FF # CCO (%)</i>
Expansión mínima	12 (30%)	14 (37.8%)
Expansión media	9 (22.5%)	17 (45.9%)
Expansión total	19 (47.5%)	6 (16.2%)
CCO totales	40 (100%)	37 (100%)

La imagen 8, muestra ejemplos de CCO para las tres categorías de expansión del cúmulo. Nótese la granulosa compacta presente en la categoría 1, y el aumento en la expansión de la granulosa alrededor del núcleo del oocito en las categorías superiores de expansión.

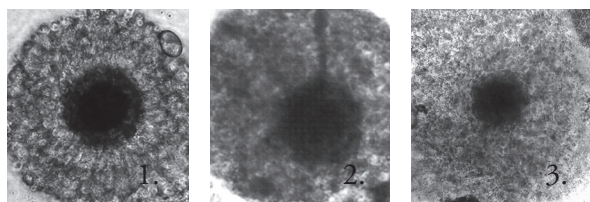


Imagen 8. Categorías para la expansión del cúmulo

1. Expansión mínima; 2. Expansión media; 3. Expansión total.

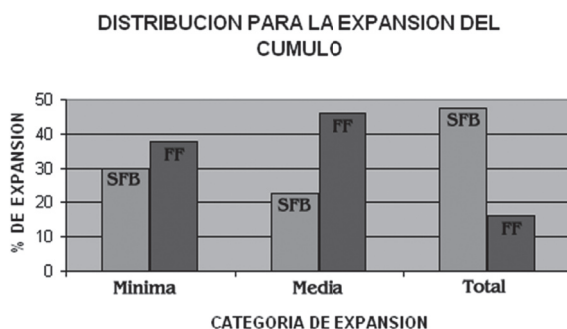


Gráfico 1. Distribución y de la expansión del cúmulo para CCO equinos para los tratamientos de MIV con SFB y FF

Mediante la caracterización de los CCO según la expansión del cúmulo, y mediante la observación del cuerpo polar en los oocitos por microscopía convencional y de fluorescencia (tinción DAPI), se determinaron los porcentajes de MIV para ambos tratamientos. La imagen 9, muestra la determinación del cuerpo polar en un oocito maduro, mientras la tabla 3 muestra los valores estadísticos para la MIV de oocitos equinos para los tratamientos SFB y FF.

La recuperación de un promedio de 7 complejos cúmulo-oocito (CCO) por sesión de aspiración a partir de entre 8 a 10 ovarios disponibles indica la dificultad en la obtención de CCO equinos, como material de estudio. Ello se deriva no solamente de la fisiología normal de la hembra equina, para la cual la formación de folículos ováricos es mucho menor respecto a otras especies, sino también de los sistemas y volúmenes de sacrificio equino, propios del entorno donde se desarrolla el estudio.

La expansión de la granulosa es considerada como un indicativo de la maduración *in vitro* y como un signo de competencia para el desarrollo de los CCO. Dicha expansión se presenta gracias a las gonadotropinas FSH y LH, las cuales se unen a receptores específicos localizados en las células de la granulosa de los CCO, que están acoplados a proteínas G, que, a su vez, activa la adenilato ciclasa, enzima que induce la producción de AMPc a partir del adenosín trifosfato (ATP). Los altos niveles de AMPc en las células de la granulosa inducen la expansión caracterizada por el desacoplamiento de las uniones gap entre dichas células, y la secreción de ácido hialurónico, lo cual permite que el oocito continúe la meiosis hasta metafase II ⁷.

Como puede observarse en las imágenes 7 y 8, la expansión de la granulosa se encontró en CCO madurados mediante ambos tratamientos (SFB y FF); además, se presenta de manera diferencial entre los tratamientos, según las ca-

tegorías de expansión establecidas (grafico 1), lo cual indica un efecto directo de los suplementos SFB y FF, sobre esta característica relacionada con la MIV. Este fenómeno puede ser explicado de manera preliminar por la composición de dichos suplementos, los cuales pueden contener diferentes concentraciones de LH y FSH, dado que se originan de fluidos corporales presentes en animales con actividad endocrinológica reproductiva. Sin embargo, son muchas las otras moléculas presentes en este tipo de suplementos, que pueden ejercer efectos estimulantes o depresores sobre la MIV de los oocitos equinos⁸⁻¹⁰.

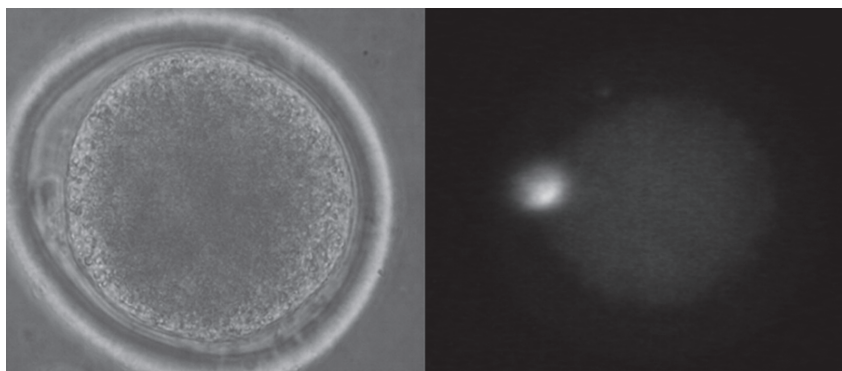


Imagen 9. Oocito equino maduro, evaluado en fresco (izq.) y mediante tinción de ADN por DAPI (der.)

Tabla 3. Valores estadísticos para la maduración *in vitro* de oocitos equinos para los tratamientos de MIV con SFB y FF

Parámetro / Tratamiento	SFB	FF
Numero de oocitos	40	37
% maduración <i>in vitro</i>	70	64.6
Desviación estándar	3.4	8.2
Error estándar	1.39	3.36

*No se evidenció diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) entre los porcentajes de maduración *in vitro* entre los tratamientos.

La tabla 2 y el gráfico 1 muestran la distribución de los CCO para cada tratamiento según tres categorías de expansión del cúmulo. Cabe destacar que para el tratamiento SFB, el 47.5% de los complejos tuvieron una expansión total del

cúmulo, aspecto considerado como indicativo de MIV competencia para el desarrollo. Para este mismo tratamiento el 30% de los CCO, tuvo una expansión mínima, mientras el 22.5% tuvo una expansión media, lo cual muestra que no todos los CCO sometidos a la MIV con SFB responden de la mejor manera a los estímulos ejercidos por dicho suplemento, hecho que puede estar relacionado por la calidad y origen de los complejos, considerando que la escasez de dicho material de investigación, y las condiciones fisiológicas de los ejemplares equinos sacrificados son factores determinantes en la calidad de los CCO disponibles. Esto se cumple de igual forma para la MIV con FF, donde se presentaron igualmente CCO en las diferentes categorías de expansión, con la diferencia que la mayor proporción de los mismos (45.9%) tuvo una expansión media. Entonces el SFB es superior como suplemento estimulante de la expansión de los CCO equinos.

La comparación entre los porcentajes consolidados de MIV para los tratamientos SFB y FF (tabla 3), no arrojó una diferencia estadística significativa, a pesar de encontrarse diferencias entre dichos tratamientos, para la distribución de los CCO en las categorías de expansión. Ello podría explicarse porque la MIV incluye los fenómenos de maduración citoplasmática y nuclear, los cuales pueden presentarse de una manera independiente según la intensidad de los estímulos hormonales presentes en el proceso^{11,12}. Por esto, un CCO puede presentar expansión del cúmulo, mas no evidenciar liberación de cuerpo polar; además, la calidad de los CCO se convierte en el factor determinante en su respuesta a la MIV^{13,14}.

Conclusiones

El suero fetal bovino, como suplemento en la maduración *in vitro* de oocitos equinos, es superior a la suplementación con fluido folicular, en la obtención de mayores porcentajes de expansión del cúmulo, como un indicador de maduración y competencia para el desarrollo embrionario *in vitro*.

De acuerdo con las condiciones de esta investigación, no existe diferencia entre las tasas de maduración *in vitro* de oocitos equinos madurados en medios suplementados con suero fetal bovino y oocitos equinos madurados en medios suplementados con fluido folicular.

Otros aportes de la investigación

Este estudio se constituye en el primer reporte de investigación en Colombia en el área de producción *in vitro* de embriones equinos.

Mediante la investigación se estandarizaron, para nuestro medio, procesos propios de la producción *in vitro* de embriones equinos como la recolección y transporte del material de investigación, el procesamiento para la recuperación de oocitos equinos a partir de ovarios post-mortem; la selección de CCO, las condiciones de MIV, y los procesos de evaluación de la MIV, procesos que se

convierten insumos de gran valor para el desarrollo de futuras investigaciones en este campo.

Referencias

1. Losinno L. y Aguilar J. Reproducción y biotecnologías en la producción equina. Sitio Argentino de Producción Animal. URL:http://www.produccionbovina.com/produccion_equinos/curso_equinos_I/14-reproduccion_y_biotecnologias.pdf [Consultada: 15 Nov. 2008].
2. Carneiro G, Lorenzo P, Pimentel C, Pegoraro L, Bertolini M, *et al.* Influence of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on *in vitro* maturation and parthenogenic development in equine oocytes. *Biol of Reprod* 2001;65:899–905.
3. Dell'Aquila M, De Felici M, Massari S, Maritato F, Minoia P. Effects of fetuin on zona pellucida hardening and fertilizability of equine oocytes matured *in vitro*. *Biol of Reprod* 1999;61:533–540.
4. Goudet G, Bezar J, Duchamp G, Gerard N, Palmer E. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic *in vitro* maturation: effect of follicle size and hormonal environment. *Biol of reprod* 1997;57:232-245.
5. Hinrichs K, Choi Y, Walckenaer B, Varner D, Hartman D. *In vitro*-produced equine embryos: Production of foals after transfer, assessment by differential staining and effect of medium calcium concentrations during culture. *Theriogenology* 2007;68:521–529.
6. Bedford SJ, Kurokawa M, Hinrichs K. y Fissore RA. Patterns of intracellular calcium oscillations in horse oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection: possible explanations for the low success of this assisted reproduction technique in the horse. *Biol of Reprod.* 2004;70:936–944.
7. Ali A, Sirard MA. Protein kinases influence bovine oocyte competence during short-term treatment with recombinant human follicle stimulating hormona. *Reproduction* 2005;130:303–310.
8. Zhang JJ, Muzs LZ, Boyle MS. *In vitro* fertilization of horse follicular oocytes matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1990;26:361–365.
9. Zhang JJ, Boyle MS, Allen WR, Galli C. Recent studies on *in vivo* fertilization of *in vitro* matured horse oocytes. *Equine Vet J* 1989;8(suppl):101–104.
10. Sepúlveda J, Silva M, y Berland M. Efecto de la adición de células de granulosa al medio TCM-199 sobre la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos equinos. II Reunión Anual Sociedad de Andrología y Gametología de Chile: IV Jornadas Internacionales de Medicina Reproductiva y Biología de la Reproducción. *int. j. morphol* 2003;21(2):167-175.
11. Tremoleda J, Tharasanit T, Van Tol H, Stout T, Colenbrander B, *et al.* Effects of follicular cells and FSH on the resumption of meiosis in horse oocytes matured *in vitro*. Tesis Doctoral, 2003.

12. Marchal R, Caillaud M, Martoriati A, Gérard N, Mermillod P, y Goudet G. Effect of growth hormone (GH) on *in vitro* nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan synthases, and connexins 32 and 43 expression, and GH receptor messenger RNA expression in equine and porcine species. *Biol of Reprod* 2003;69:1013–1022.
13. Palma G. *Biotecnología de la reproducción*. 1ª ed. Ediciones Inta Balcarce; 2001. pag 588.
14. Lydia G, Saura S, Echegaray A, Martinez F, De Blas I, *et al.* Effect of the *in vitro* maturation medium on equine oocytes: Comparison of follicular fluid and oestrous mare serum. *Acta Veterinaria Hungarica* 2005;53(2):241-248 Abstract.