



Evaluación de la tasa de efectividad de la técnica ICSI en la reproducción del CCC

Trabajo de grado para optar por el título de Medicina Veterinaria

Daniel Estrada Murcia

Asesor

Maria Claudia Puerta Vásquez

MVZ, Esp, MSc

Corporación Universitaria Lasallista

Facultad Ciencias administrativas y agropecuarias

Medicina Veterinaria

Caldas, Antioquia

Año 2025

Agradecimiento

A mi familia, por su apoyo incondicional y por ser mi mayor motivación a lo largo de este proceso académico y personal. Expreso mi sincero agradecimiento a las instituciones EUREKA Reproducción Equina y BIOHORSE S.A.S por su valiosa colaboración en el desarrollo de este trabajo. Gracias por brindarme el acceso a sus instalaciones, por facilitar los recursos técnicos necesarios y por acompañarme durante todo el proceso experimental con disposición, profesionalismo y compromiso.

A mi asesora académica, María Claudia Puerta, por su orientación, paciencia y constante disposición para guiarme en cada etapa de esta investigación.

Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la tasa de efectividad de la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en yeguas de la raza Caballo Criollo Colombiano (CCC) y compararla con el procedimiento convencional de lavado embrionario in vivo. La investigación se desarrolló bajo un diseño de cohorte prospectivo con casos y controles, de tipo cuantitativo, utilizando 30 yeguas sanas con edades entre 6 y 15 años. Veinte de ellas fueron sometidas a la técnica OPU-ICSI (10 provenientes de la Sabana de Bogotá y 10 de Cali), mientras que 10 yeguas adicionales conformaron el grupo control, en el cual se aplicó el lavado embrionario convencional. En el grupo ICSI se registraron variables como número de folículos aspirados, ovocitos recuperados, maduración oocitaria y número de embriones obtenidos; en el grupo control se hizo un seguimiento previo del estado reproductivo de las yeguas, a las cuales se les media los folículos dominantes, para luego inducir la ovulación con una medida de 37 mm o más para luego ser inseminadas y realizar lavado de embrión a los 8 días post ovulación. Los resultados mostraron que ambos grupos obtuvieron una media igual de embriones por yegua (1,28), aunque con amplia variabilidad individual. En el grupo ICSI se evidenció la posibilidad de obtener embriones incluso en yeguas con menor carga folicular, mientras que la obtención embrionaria del grupo control se relaciono fuertemente con el proceso fisiológico completo de ovulación y fertilización. Sin embargo, debido al tamaño reducido de la muestra (20 yeguas ICSI y 10 control), no fue posible establecer conclusiones definitivas sobre la superioridad de una técnica sobre la otra. Este trabajo aporta información preliminar que puede servir como base para investigaciones posteriores con un mayor número de animales y un diseño estadístico más robusto, orientadas a optimizar la reproducción asistida en el caballo criollo colombiano.

Palabras clave: ICSI, caballo criollo colombiano, lavado embrionario, reproducción asistida.

Abstract

The present study aimed to evaluate the effectiveness of the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) technique in mares of the Colombian Criollo Horse (CCC) breed and to compare it with the conventional *in vivo* embryo flushing procedure. The research was conducted under a prospective cohort design with cases and controls, using a quantitative approach and involving 30 healthy mares aged between 6 and 15 years. Twenty mares underwent the OPU-ICSI technique (10 from the Bogotá Savanna and 10 from Cali), while 10 additional mares constituted the control group, in which conventional embryo flushing was performed. In the ICSI group, variables such as the number of aspirated follicles, recovered oocytes, oocyte maturation, and number of embryos obtained were recorded. In the control group, reproductive status was monitored prior to the procedure, dominant follicles were measured, ovulation was induced once they reached ≥ 37 mm, followed by insemination and embryo flushing eight days post-ovulation. Results showed that both groups obtained the same mean number of embryos per mare (1.28), although with high individual variability. In the ICSI group, embryos could be obtained even from mares with lower follicular counts, whereas embryo recovery in the control group was strongly associated with the complete physiological process of ovulation and fertilization. However, due to the small sample size (20 ICSI mares and 10 controls), it was not possible to draw definitive conclusions about the superiority of one technique over the other. This study provides preliminary information that may serve as a basis for future research with a larger number of animals and more robust statistical designs, aimed at optimizing assisted reproduction in the Colombian Criollo Horse.

Keywords: ICSI, Colombian Criollo Horse (CCC), embryo flushing, assisted reproduction.

Tabla de contenido

Glosario.....	7
Introducción	7
Planteamiento del problema	10
Justificacion	11
Objetivos.....	12
<i>Objetivo general</i>	12
<i>Objetivos especificos</i>	12
Alcances y limitaciones	12
Marco teorico.....	13
<i>Meiosis</i>	14
<i>Recoleccion y clasificacion de ovocitos equinos</i>	15
<i>Preparacion de la yegua</i>	16
<i>Tecnica OPU</i>	16
<i>Clasficacion de los ovocitos</i>	18
<i>Maduracion In vitro</i>	19
<i>Fertilizacion In vitro</i>	21
<i>Cultivo In vitro</i>	23
Metodología	24
Analisis Estadistico.....	29
Resultados.....	29
Discusión	32
Conclusiones.....	¡Error! Marcador no definido. 33
Recomendaciones	34
Referencias.....	36

Índice de tablas

Tabla 1. Estadísticos generales	31;Error! Marcador no definido.
Tabla 2. Resultados de la prueba anova.	31;Error! Marcador no definido.
Tabla 3. Comparación del promedio de variables reproductivas entre grupos experimentales y control	31

Glosario

CCC: Caballo Criollo Colombiano.

ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

OPU: Ovum Pick Up (español: aspiración folicular transvaginal u obtención de óvulos)

Medio de cultivo TCM-199: Solución nutritiva utilizada para mantener y favorecer el desarrollo de células, tejidos u ovocitos en condiciones in vitro. En reproducción equina, se emplea durante la maduración y manipulación de ovocitos.

Heparina: Anticoagulante utilizado en medios de recolección de ovocitos para evitar la formación de coágulos que puedan interferir con el procedimiento.

ANOVA (Análisis de varianza): Prueba estadística utilizada para comparar las medias de tres o más grupos y determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Folículo: Estructura presente en el ovario que contiene un ovocito en desarrollo, rodeado por células de soporte y líquido folicular.

Ovocito: Célula reproductiva femenina que, tras madurar, puede ser fecundada por un espermatozoide para dar origen a un embrión.

Bomba de vacío: Equipo utilizado para generar la succión controlada durante la aspiración de folículos en el procedimiento OPU.

Introducción

Además de las técnicas clásicas de reproducción, como la inseminación artificial y la transferencia de embriones (Squires y otros., 2003), biotecnologías reproductivas avanzadas como la recuperación y maduración de ovocitos, la transferencia de ovocitos, la fertilización in vitro, el cultivo de embriones, la manipulación de embriones y la transferencia nuclear, se establecieron por primera vez en rumiantes y sirvieron como ejemplo para el uso tanto en humanos como en caballos. Los avances en reproducción asistida avanzada En el caballo, el progreso ha sido continuo, aunque a un ritmo irregular en comparación con otras especies domésticas, y los avances más importantes se produjeron solo en los últimos 12 años. (Galli, C., Colleoni, S., Duchi, R., Lagutina, I., & Lazzari, G.,2013)

Las biotecnologías reproductivas confieren el aumento en la eficiencia reproductiva de la especie equina, donde se aprovecha los rasgos genéticos de importancia, obteniendo un mayor aprovechamiento productivo y rentable. Evidencias datan que la biotecnología reproductiva no es una herramienta nueva usada con los animales por parte del hombre, para el 2.500 A.C en Asia Menor ya se realizaba la castración de machos que no reunían con las condiciones requeridas como reproductores (Galli, Colleoni, Duchi, Lagutina, & Lazzari, 2007).

Una de las técnicas de reproducción asista es la aspiración folicular transvaginal u obtención de óvulos (OPU) la cual es el proceso por el cual los ovocitos se extraen directamente de los ovarios de una yegua por vía transvaginal a través de una guía y un ecógrafo. Esta técnica se utiliza para la producción de embriones in vitro (Hinrichs, 2010) mediante la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Galli, Colleoni, Duchi, Lagutina, & Lazzari, 2007). La producción in vitro (PIV) de embriones equinos mediante la técnica de recogida de ovocitos inmaduros (OPU), maduración in vitro y posterior inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) es actualmente la técnica de reproducción asistida más eficiente disponible en la industria de la cría equina para obtener el mayor número de embriones por yegua y año (Márquez-Moya, Sala-Ayala, Carreras-Vico, Martínez-Boví, & Cuervo-Arango,

2025). El aumento de esta técnica se ha ido acompañando de un crecimiento de la eficiencia de la técnica ICSI y transferencias de embriones criopreservados producidos in vitro. Actualmente, se informa que el promedio de obtención de embriones por sesión de OPU-ICSI es del 2,12 (Claes & Stout, 2022). Algunas de las ventajas que presenta esta técnica son: La técnica OPU-ICSI presenta múltiples ventajas en la reproducción equina, ya que puede aplicarse en yeguas de edad avanzada, con problemas reproductivos, en aquellas que ciclan pero no ovulan, o que presentan alteraciones a nivel de cérvix y útero. Además, las sesiones pueden realizarse durante todo el año con intervalos de aproximadamente 14 días, lo que facilita la continuidad del procedimiento. Un aspecto relevante es que una sola pajuela de semen puede emplearse para fertilizar más de 100 ovocitos en diferentes sesiones, optimizando el recurso seminal disponible. Asimismo, los embriones producidos in vitro mediante esta técnica pueden criopreservarse de manera eficiente, lo que amplía las posibilidades de conservación y transferencia posterior. Finalmente, su uso en yeguas jóvenes contribuye a acortar los tiempos generacionales y a acelerar los procesos de mejora genética en la especie.

La producción de embriones en equinos in vitro tiene como objetivo principal lograr alcanzar la mayor eficiencia reproductiva posible, esto se debe especialmente a que el Equino lo reconocen principalmente por tener una menor capacidad reproductiva entre otras especies (Cuervo-Arango, Claes, & Stout, 2019).

Esta investigación se propone evaluar la efectividad de la técnica ICSI en yeguas de la raza caballo criollo colombiano, comparando sus resultados con los obtenidos mediante el lavado de embriones in vivo de forma convencional. Se busca determinar si existen diferencias significativas en el número de producciones embriones obtenidos. Dado que el estudio se realizó con una muestra limitada (20 yeguas para ICSI y 10 para lavado convencional), los resultados se interpretan como una aproximación inicial, más que como una conclusión definitiva, aportando una base de referencia para futuras investigaciones en este campo.

Planteamiento del problema

El gremio equino en Colombia ha presentado un gran aumento en los últimos años, especialmente lo que respecta la cría del CCC, una raza emblemática del país por su valor genético y por la cultura que esta raza representa. Sin embargo, los problemas reproductivos que presentan algunos ejemplares, tanto hembras como machos, ha obligado al gremio equino a implementar técnicas avanzadas de reproducción asistida que permita conservar y reproducir ejemplares con buenas características genéticas.

Una de estas técnicas es la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), la cual se ha aplicado y estudiado ampliamente en países con mayor desarrollo en biotecnología reproductiva equina. Sin embargo, en Colombia su uso es reciente, por lo que aun no existen estudios que evalúen su efectividad, especialmente en la raza emblemática como lo es el CCC. Esta poca información limita el respaldo científico de esta técnica para su implementación rutinaria en programas de reproducción asistida en Colombia.

Además, técnicas convencionales como lo es el lavado de embriones sigue siendo una de las técnicas mas utilizadas en muchos criaderos. Sin embargo, esta presenta ciertas limitaciones cuando se trata de ejemplares con problemas reproductivos o que tengan poca producción embrionaria. En este caso, se genera la necesidad de comparar ambas técnicas con el fin de evaluar si la ICSI representa una técnica mas eficiente para la producción embrionaria.

Este estudio busca aportar información acerca de la efectividad de esta nueva técnica de reproducción asistida en el gremio equino, generar criterios para fomentar el uso de esta biotecnología reproductiva según las necesidad y condiciones de cada propietario de esta gran raza.

Justificación

En Colombia, el estudio de la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en caballos, y en particular en el Caballo Criollo Colombiano, es todavía muy limitado. La mayor parte de la información disponible proviene de investigaciones en otras razas y contextos internacionales, lo que genera un vacío de conocimiento sobre su aplicabilidad y posibles resultados en el CCC. La introducción de esta técnica en el país es reciente, y por esto resulta necesario proporcionar información que permitan comprender su comportamiento y desempeño en nuestro país.

La investigación busca aportar evidencia sobre la tasa de efectividad de la ICSI en el Caballo Criollo Colombiano, comparándola con la técnica de lavado de embriones convencional. Esta comparación es relevante porque permitirá establecer si la ICSI representa una alternativa competitiva o incluso superior en términos de resultados, considerando las condiciones reproductivas de esta raza. Aunque el presente estudio se realiza con una población reducida (20 yeguas en el grupo ICSI y 10 en el grupo de lavado convencional), lo que limita la posibilidad de generalizar los resultados, los datos obtenidos constituyen un punto de partida importante para futuros trabajos.

Además de su valor académico, este estudio tiene un gran potencial en la práctica veterinaria y en el sector equino, pues la generación de información confiable sobre la técnica podría contribuir a mejorar los programas reproductivos y favorecer la conservación genética del Caballo Criollo Colombiano. Los hallazgos podrían orientar a criadores, veterinarios e investigadores en la toma de decisiones sobre el uso de la ICSI, y abrir nuevas líneas de investigación que profundicen en sus beneficios y limitaciones.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la tasa de efectividad de la técnica de ICSI en el CCC, con el fin de analizar su viabilidad y eficiencia para mejorar la producción embrionaria

Objetivo específico

- Evaluar la tasa de fertilización de los ovocitos mediante la técnica ICSI en caballos criollo colombiano
- Evaluar la tasa de maduración in vitro, de los ovocitos obtenidos por medio de aspiración folicular de yeguas Criollo Colombiano.
- Determinar la tasa de desarrollo embrionario, evaluando el porcentaje de embriones que alcanzan los estadios de segmentación, mórula y blastocisto.

Alcance y limitaciones

Este estudio tiene como objetivo analizar la efectividad de la técnica de Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) en yeguas de la raza criollo colombiano, comparándola con el método convencional de lavado de embriones. El estudio se realizó entre los meses de febrero y mayo de 2025 en las instalaciones de EUREKA y BIOHORSE S.A.S.,

ubicados en el municipio de Cajicá, Cundinamarca. Se seleccionaron y evaluaron un total de 30 yeguas

clínicamente sanas, todas pertenecientes a criadores particulares. Veinte de estas fueron sometidas al procedimiento ICSI (10 provenientes de Bogotá y 10 de Cali), y las otras diez a la técnica tradicional de lavado embrionario.

El enfoque del estudio es cuantitativo, ya que se basa en la recolección y análisis de datos numéricos relacionados con la producción de embriones mediante la técnica ICSI y el lavado de embriones convencional en yeguas de raza Caballo Criollo Colombiano. El objetivo principal es medir y comparar los resultados obtenidos en ambos grupos, utilizando herramientas estadísticas descriptivas e inferenciales para identificar posibles diferencias. En el caso del grupo ICSI, se siguieron todos los pasos del protocolo, desde la aspiración folicular (OPU) hasta la microinyección, cultivo y desarrollo embrionario. En el grupo convencional, se hizo inseminación con semen fresco, lavado post-servicio, y lavado uterino a los 8 días para la recuperación del embrión.

La investigación incluye animales dentro de un rango de edad de 6 a 15 años, sin importar la fase del ciclo ovárico ni la condición corporal. Las yeguas fueron elegidas con base en criterios reproductivos, principalmente una carga folicular mínima (10 folículos), aunque se incluyeron casos de yeguas mayores con menos carga folicular.

Finalmente, este trabajo busca dejar las bases para futuras investigaciones en el campo de la biotecnología equina en Colombia, ofreciendo una breve comparación entre dos técnicas que, aunque son ampliamente utilizadas en otros países, una de ellas tiene un poco de desarrollo y aplicación a nivel nacional.

Como toda investigación basada en condiciones de campo, este estudio presenta ciertas limitaciones que es importante reconocer para valorar adecuadamente sus resultados y alcance. La más importante de ellas es el tamaño reducido de la muestra, que incluyó solo 30 yeguas: 20 en el grupo ICSI y 10 en el grupo convencional. Esta muestra limitada no permite realizar afirmaciones estadísticas definitivas sobre la efectividad de la técnica ICSI en la raza criollo

colombiano. Por lo tanto, los resultados deben interpretarse con precaución. Otra limitación es la imposibilidad de controlar todas las variables biológicas. Aunque se siguieron protocolos ya establecidos, las diferencias individuales entre yeguas, la procedencia de algunos animales (especialmente las de Cali), y la calidad variable del semen congelado-descongelado utilizado, pudieron influir en las tasas de fertilización y desarrollo embrionario.

Adicionalmente, hubo restricciones en el acceso a información sobre ciertos aspectos técnicos. Por ejemplo, no se contó con datos específicos del paso a paso dentro del laboratorio con respecto al manejo de los ovocitos, medios de maduración y cultivo, hasta la producción de un embrión. Por último, el tiempo limitado del estudio (cuatro meses) impidió realizar un seguimiento a largo plazo de los embriones obtenidos (por ejemplo, hasta la gestación o nacimiento del potro), lo que impide la evaluación de la efectividad real de cada técnica a nivel productivo.

Marco teórico

Meiosis

La meiosis es el proceso mediante el cual las células germinales reducen a la mitad su número cromosómico, garantizando que, tras la fecundación, el embrión resultante reciba la genética completa ($2n$).

En equinos, al igual que en otros mamíferos, el ovocito experimenta dos fases de detención o arresto meiótico que son fundamentales para comprender su maduración y el momento en que puede ser fecundado. El primer arresto meiótico se produce en la profase I, etapa en la cual los ovocitos permanecen desde el nacimiento hasta que son reclutados para el crecimiento folicular. Durante este tiempo, el ovocito se mantiene en un estado de reposo prolongado, acompañado por células del cúmulo y de la granulosa, que le proporcionan soporte metabólico y señales de regulación. Luego, bajo la influencia de la onda folicular y los estímulos

hormonales, el ovocito reanuda la meiosis y progresa hasta la metafase I. Tras la expulsión del primer corpúsculo polar, alcanza el segundo arresto meiótico, que ocurre en la metafase II. Este es el estadio en el que el ovocito es ovulado o, en el contexto de técnicas de reproducción asistida como OPU-ICSI, el momento en que puede ser considerado competente para la fecundación. La liberación del segundo arresto meiótico únicamente se produce después de la penetración del espermatozoide, cuando se desencadenan una serie de señales de activación ovocitaria que permiten completar la meiosis II y formar el pronúcleo femenino. Por lo tanto, entender estos arrestos es esencial para valorar la calidad de los ovocitos obtenidos en procedimientos como OPU-ICSI, ya que solo aquellos que han alcanzado metafase II poseen la capacidad real de ser fecundados y generar embriones viables.

Recolección y clasificación de ovocitos equinos

Los ovocitos de los folículos antrales se pueden recuperar como se hace en bovinos, es conocida como la recuperación transvaginal de ovocitos guiada por ultrasonido u Ovum Pick Up (OPU). Hay dos enfoques principales para obtener ovocitos de la yegua donante: aspiración del folículo dominante estimulado para recuperar un ovocito madurado in vivo justo antes de que ovule; o aspiración de todos los folículos. La recolección de ovocitos maduros se basa en recolectar del folículo preovulatorio 24 h después de la administración del inductor de la ovulación a un folículo que ha alcanzado al menos 35 mm y en donde la donante muestre signos de edema uterino, presentándose la ovulación entre 36 y 40 h después del inductor. Por lo tanto, los ovocitos recolectados a las 24 h más tarde han reanudado la meiosis, tienen un cúmulus oophorus expandido que facilita su recuperación. Después de la recuperación de la yegua donante, los ovocitos completan su maduración in vitro (16 horas más) y luego pueden ser microinyectados, Galli et al. (2013). La aspiración de los folículos inmaduros sin estimulación ovárica ofrece la obtención de ovocitos de una yegua cada 14 días. Además, no es necesario realizar un seguimiento al ciclo estral o preocuparse por la aplicación de gonadotropinas, Hinrichs (2011). Cada folículo se lava continuamente con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco suplementada con heparina y albúmina sérica bovina calentada a 38 °C. se realiza un lavado donde se raspa la pared folicular en la aguja de punción. Se llevan a placas de Petri y

se visualizan los ovocitos y el análisis visual de las células de la granulosa. Carnevale & Sessions (2012).

Preparación de la yegua

Es necesaria una adecuada restricción física al momento de iniciar el procedimiento, la cual se puede realizar en un brete, la yegua debe estar bajo sedación y con relajación del recto de tal manera que permita una adecuada manipulación del ovario durante el procedimiento. Las yeguas son sedadas con detomidina, butorfanol, xilacina, acepromazina y tramadol. La detomidina y el xilacina son agonistas alfa 2 adrenergico que tiene un efecto de sedación y un periodo corto de analgesia, tienen un efecto de relajación de la musculatura lisa del tracto gastrointestinal lo que hace que disminuya la motilidad intestinal. La detomidina tiene de 50 a 100 veces más potencia que la xilacina, ambos medicamentos son usados para procedimientos entre 5 a 20 minutos. El butorfanol y el tramadol son opioides usados por sus efectos analgésicos durante la sedación, Su uso favorece la analgesia y la duración de la sedación en procedimientos cortos con el paciente en estación. La acepromazina es un tranquilizante y sedante usado en equinos para procedimientos cortos. La relajación del recto juega un papel muy importante durante el procedimiento ya que gracias a esto la manipulación del ovario es mucho más fácil, para esta se reporta el uso de bromuro de hioscina (Cuervo-Arango, Sala-Ayala, Márquez-Moya, & Martínez-Boví, 2025).

Técnica OPU

La técnica de OPU puede variar según el número de operadores involucrados durante su ejecución. Una opción consiste en la participación de tres personas: un operador encargado de sostener el ovario y la sonda ecográfica, un segundo operador que manipula la aguja de aspiración y un tercer operador que realiza el lavado folicular mediante una jeringa, siempre y cuando no se utilice una bomba de infusión, ya que este operador no sería necesario. La segunda opción, se basa en que un solo operador maneja simultáneamente la sonda, el ovario y la aguja, mientras un asistente controla el lavado con jeringa o bomba, eliminando la necesidad de operadores adicionales.

Después de la preparación de la yegua y de la desinfección de la región perineal se introduce vía vaginal la guía de aspiración el cual lleva el transductor transvaginal y la aguja de aspiración; por vía rectal se acerca el ovario hacia la guía de aspiración y durante el procedimiento se realiza la manipulación del ovario, cuando los folículos a aspirar se ubican se introduce la aguja hasta la cavidad folicular y se recupera el fluido folicular mediante aspiración (Figura 1).

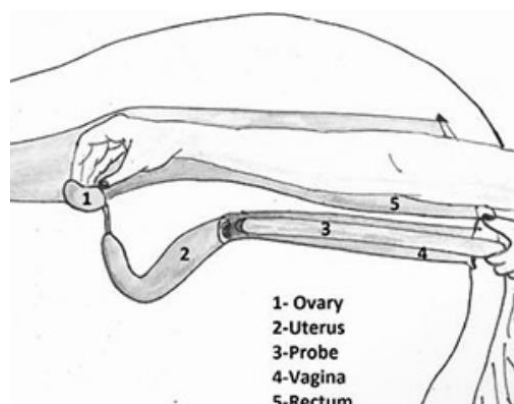


Figura 1. Retracción del ovario hacia la pared vaginal vía transrectal.

Una de las alternativas para coleccionar ovocitos en la yegua es aspirar todos los folículos visibles en el ovario en cualquier momento del ciclo logrando recuperar ovocitos maduros e inmaduros. Se utiliza un ecógrafo con una sonda convexa de 7.5 MHz para la visualización y aspiración de folículos. Cada folículo se aspira con una aguja de doble bisel de calibre 12 unida a una bomba de vacío a una presión de 180-200 mm de Hg. Cada folículo se lava continuamente con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco suplementada con heparina y albúmina sérica bovina calentada a 38 °C. se realiza un lavado donde se raspa la pared folicular en la aguja de punción. Se llevan a placas de Petri y se visualizan los ovocitos y el análisis visual de las células de la granulosa (Hinrichs, 2010). La tasa de recuperación de ovocitos (ORR, número de ovocitos recuperados por folículo aspirado) aún varía entre los estudios, pero normalmente se encuentra en el rango del 50 al 60 % (Claes & Stout, 2022; Hinrichs, 2010).

Clasificación de los ovocitos

Luego de recuperar los ovocitos, se realiza una clasificación para seleccionar los ovocitos mas capacitados para hacer la maduración *in vitro*. Esta clasificación de basa en las características morfológicas de las células del cúmulus (compactos y expandidos) y en el aspecto del citoplasma (Cardona, 2016) (Figura 2).

- Ovocitos Expandidos: Ovocito que ha comenzado su maduración meiótica, caracterizado por un cúmulus oophorus (capa de células que rodea el ovocito) que se ha extendido y dispersado. Estos ovocitos son recolectados de folículos preovulatorios o expandidos, se descartan los ovocitos con el cúmulus expandido para la maduración *in vitro* es debido a que se considera que están ya maduros (Márquez-Moya, Sala-Ayala, Carreras-Vico, Martínez-Boví, & Cuervo-Arango, 2025; Galli, Colleoni, Duchi, Lagutina, & Lazzari, 2013).
- Ovocitos Compactos: Es un ovocito que tiene más de tres capas de células del cúmulus y ellas se encuentran compactas (Márquez-Moya, Sala-Ayala, Carreras-Vico, Martínez-Boví, & Cuervo-Arango, 2025; Galli, Colleoni, Duchi, Lagutina, & Lazzari, 2013).
- Corona Radiada: No es una clasificación de ovocitos, pero es una forma de seleccionar los ovocitos que no presentan cumulo expandido ni compacto, debido a que en el proceso de recolección y lavado presenta un desprendimiento del cúmulus, dejando solo la corona radiada presente o una denudación parcial de la zona pelúcida (Márquez-Moya, Sala-Ayala, Carreras-Vico, Martínez-Boví, & Cuervo-Arango, 2025; Galli, Colleoni, Duchi, Lagutina, & Lazzari, 2013).
- Degenerados: Ovocitos que presentan alteración de la corona radiada y citoplasma encogido y deformado (Márquez-Moya, Sala-Ayala, Carreras-Vico, Martínez-Boví, & Cuervo-Arango, 2025).

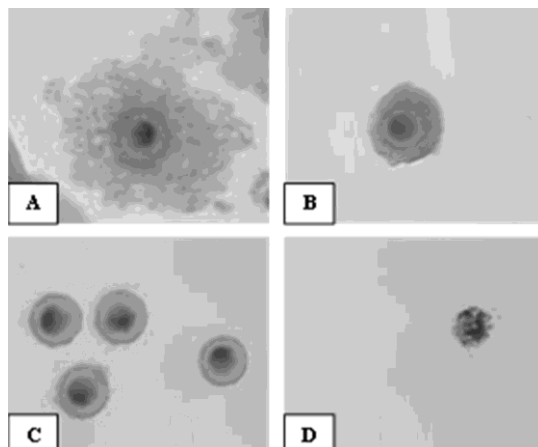


Figura 2. Clasificación morfológica de ovocitos. A) Expandido. B) Compactos. C) Corona Radiada. D) Degenerados.

Fertilización *In vitro* en equinos

Maduración *In vitro*

El núcleo de un ovocito permanece en estado de vesícula germinal en los folículos primordiales y en crecimiento, hasta que la meiosis se reanuda antes de la ovulación. Después del pico preovulatorio de LH, la vesícula germinal se rompe, se reanuda la meiosis y el ovocito ovula o queda en estado de atresia. De este modo, el proceso de maduración *in vivo* de los ovocitos se produce en un ambiente folicular óptimo, que finaliza con la expulsión al oviducto de un ovocito maduro capaz de ser fecundado por un espermatozoide capacitado (Cuervo-Arango, Sala-Ayala, Márquez-Moya, & Martínez-Boví, 2025).

Luego de la recolección de ovocitos, estos pasan a una etapa de maduración *in vitro* en la que se busca crear condiciones ambientales adecuadas que asemejen a las que se producen en el tracto reproductivo de la yegua y para lograrlo debe tenerse en cuenta ciertos factores: medio de maduración, suplemento, tiempo de maduración, condiciones de temperatura, pH y tensión de oxígeno. El medio de maduración *in vitro* más utilizado en muchos laboratorios se basa en M199, aunque la introducción de DMEM/F12 en dicho medio en un laboratorio se asoció con

aumentos en las tasas de segmentación y blastocisto posteriores. Existen algunas diferencias clave entre estos dos medios, una de las cuales es la glucosa. Las concentraciones de glucosa en el líquido folicular de la yegua varían de 3,24 a 4,7 mmol/L, con una tendencia a niveles más altos durante la fase folicular. La concentración de glucosa en M199 es de 5,5 mmol/L y en DMEM/F12 es de 17,5 mmol/L. Es posible que las diferencias en las concentraciones de glucosa durante la maduración afecten el desarrollo de los ovocitos, como se ha observado en el ganado. La fuente de proteína más comúnmente reportada en los medios de maduración de ovocitos es el 10% de FBS (Suero fetal bovino), y sigue siendo la fuente de proteína preferida por su efecto beneficioso en la competencia meiótica en comparación con la BSA (Albumina sérica bovina), la reposición de suero o el líquido folicular. También, se han añadido diversas hormonas a los medios de maduración de ovocitos, incluyendo la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Investigaciones posteriores para optimizar la composición iónica revelaron que aumentar la concentración de calcio a 5,6 mmol/L fue perjudicial, mientras que reducir el nivel de calcio resultó beneficioso para el desarrollo posterior. Morris, L. H. A. (2018).

En otro estudio realizado (Universidad Texas, 2016). Cuando reciben ovocitos inmaduros generalmente se envían durante la noche en un medio de cultivo de embriones a temperatura ambiente. Esta baja temperatura favorece la maduración de los ovocitos sin estimularlos. Los platos contienen gotas de 150 mL de medio de maduración M199 con sales Earle [Invitrogen, Carlsbad, CA] con 25 metroSe realizan infusiones de gentamicina (Invitrogen) al 10 % de suero fetal bovino (FBS; Invitrogen) y 5 mU/mL de hormona folículo estimulante (Sioux Biochemicals, Sioux Center, IA), bajo aceite mineral blanco claro. La noche en que se recuperan los ovocitos, se colocan en una incubadora a 38,2 °C, y 5% de CO₂ en el aire para equilibrar antes de usar. Otros han informado tasas de blastocistos más altas utilizando un medio basado en DMEM/F-12 para la maduración de ovocitos. Sin embargo, cuando evaluaron esto en su sistema, encontraron tasas de blastocistos más bajas para los ovocitos madurados en DMEM/F-12 (Sigma-Aldrich) que en M199. Rader, K. (2016). Si bien los medios, las condiciones de incubación y la duración de la IVM y las técnicas para la ICSI están razonablemente bien establecidos, existen diferencias entre laboratorios con respecto a los medios preferidos, aditivos del medio, método para realizar la ICSI y las condiciones de cultivo exactas. Resulta un poco

desconcertante que lo que funciona mejor en un laboratorio puede no ser óptimo en otro. Hinrichs, K. (2018).

Para ayudar a programar la iniciación de la maduración los ovocitos, se pueden mantener en la noche en un medio simple con la temperatura ambiente antes de ponerlos en un medio de cultivo de maduración sin ningún efecto sobre la maduración o el desarrollo de los embriones. La duración óptima de la maduración es entre 24 y 30 horas, una vez madurados, se desnuda el cumulo y se selecciona para ICSI a aquellos que tienen presencia de un cuerpo polar (Figura 3).

Hablando de la tasa de maduración, resulta un poco complicado que se pueda determinar esto concretamente ya que lo que funciona mejor en un laboratorio puede no ser óptimo en otro (Claes & Stout, 2022). Sin embargo, los laboratorios establecidos logran altas tasas de maduración de ovocitos, alrededor del 50% y el 75% (Hinrichs, 2010; Galli, Colleoni, Duchi, Lagutina, & Lazzari, 2007).

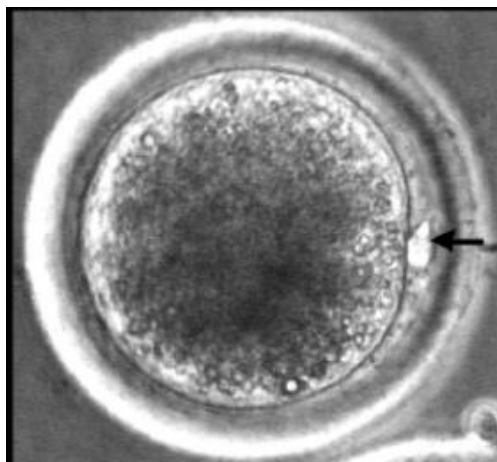


Figura 3. Ovocito equino madurado in vitro con presencia de cuerpo polar (flecha)

Fertilización *In vitro*

En el caballo, la producción de embriones in vitro es una valiosa herramienta clínica y de investigación, pero actualmente solo es viable mediante la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). La necesidad de ICSI limita tanto el uso clínico del procedimiento como

la capacidad de investigar la biología de la capacitación y la fertilización espermática en esta especie. A pesar de los numerosos intentos de establecer métodos para la FIV (es decir, fertilización de ovocitos mediante incubación con espermatozoides) los resultados no son repetibles e, incluso cuando se logra la fertilización, la eficiencia es baja (Goudet, G., Besenfelder, U., Daels, P., Hinrichs, K., Morris, L., & Stout, T.,2022). lo que a su vez parece deberse principalmente a la incapacidad de estimular adecuadamente a los espermatozoides de semental para que capaciten y penetren en los ovocitos equinos (Stout, T. A. E. 2020). El uso de la ICSI evita la necesidad de realizar un proceso quirúrgico de la transferencia del ovulo maduro al oviducto de la yegua receptora, y permite usar menos concentraciones de espermatozoides buscando más eficiencia que la fertilización in vitro estándar. Sin embargo, requiere de equipos de alto costo y una persona experimentada (Vélez & Hinrichs, 2011). La ICSI implica el uso de equipos complejos, incluido un microscopio invertido acoplado a un sistema de micro manipulación. Básicamente, el micro manipulador convierte los movimientos macroscópicos en microscópicos, permitiendo el manejo de gametos. Está equipado con dos brazos, uno conectado a una pipeta de sujeción y el otro a una pipeta de inyección. La pipeta sujeta el ovocito, colocando el primer cuerpo polar (PB) en la posición 6 o 12 en el sentido de las agujas del reloj. La pipeta de inyección, utilizada para inmovilizar y sujetar un solo espermatozoide, atravesará la membrana de un ovocito en metafase II y depositará el esperma en el citoplasma (Figura 4).

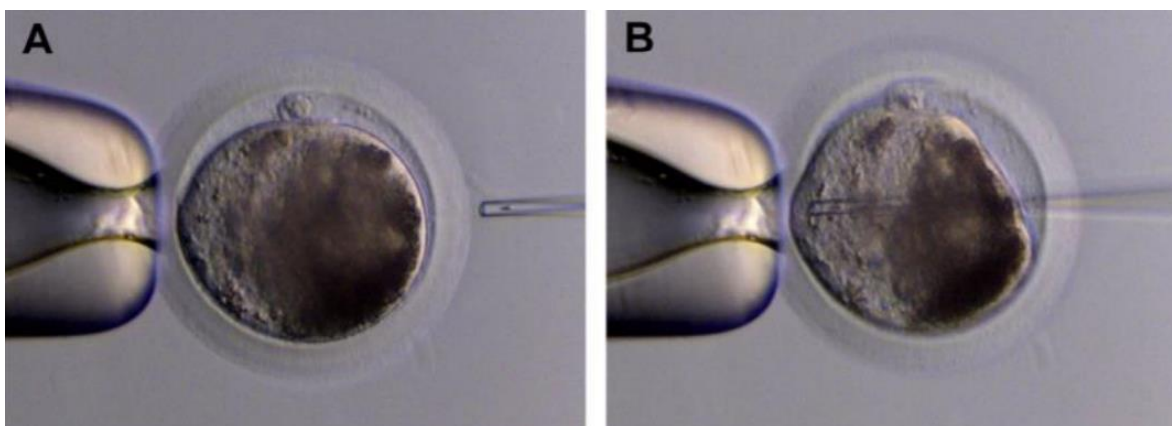


Figura 4. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). (A) El ovocito es sostenido por la pipeta de retención/sujeción. (B) La pipeta de inyección que contiene el espermatozoide. Tomado de (Stout, 2020).

Después de que se realiza la ICSI en todos los ovocitos se colocan en un medio que puede contener sales de M199 y se mantienen durante aproximadamente 2 horas a 38,2°C. Se comprueba la lisis de los ovocitos; Los ovocitos lisados se descartan y los ovocitos intactos se transfieren al medio de cultivo de embriones (Stout, 2020).

Cultivo *In vitro*

Durante esta fase los cigotos pueden desarrollarse a estadios embrionarios más avanzados como el blastocisto. Usualmente, este tiempo está entre 6 a 7 días. En equinos se ha utilizado dos sistemas de cultivo con éxito para el cultivo de embriones. El sistema más simple es usar un medio de cultivo celular llamado DMEM/F-12 y también se usa un medio de cultivo de embriones humanos (Stout, 2020).

Los embriones se examinan en busca de división el día 5 después de ICSI, esto corresponde al clivaje en un desarrollo embrionario normal, el cual consiste en una serie de divisiones celulares (mitosis) del óvulo fecundado (cigoto) para formar el futuro embrión antes de la gastrulación. Este proceso implica que una sola célula se divida repetidamente hasta formar una esfera de células, pasando por las etapas de mórula y blastocisto, y culminando en la implantación en el útero para el inicio de la gestación (Estela-Paz, Saavedra-Saavedra y Moyano, 2009). Cualquier embrión no dividido se descarta en ese momento. Los embriones que se han dividido se colocan en una nueva gota de medio de cultivo para su desarrollo a la etapa de blastocisto. Los embriones se examinan diariamente desde el día 7 hasta el día 10 después de la ICSI para determinar el desarrollo de blastocistos. Los blastocistos se reconocen por la formación de una capa de trofoblasto aparente inmediatamente dentro de la zona pelúcida, con una sugerencia de densidad disminuida de la cara interna del embrión (Figura 5).

Existen diferencias entre los programas en cuanto al tiempo que se permite que los embriones alcancen la etapa de blastocisto; algunos programas usan solo embriones que alcanzan la etapa de blastocisto dentro de los primeros 8 días de cultivo, mientras que otros incluyen

embriones que alcanzan la etapa de blastocisto en los días 10-12. Si bien el cultivo durante un período más largo mejorará claramente el rendimiento de blastocisto, esto solo es útil si los embriones en desarrollo posterior mantienen una competencia de desarrollo aceptable (Campbell, 2014).

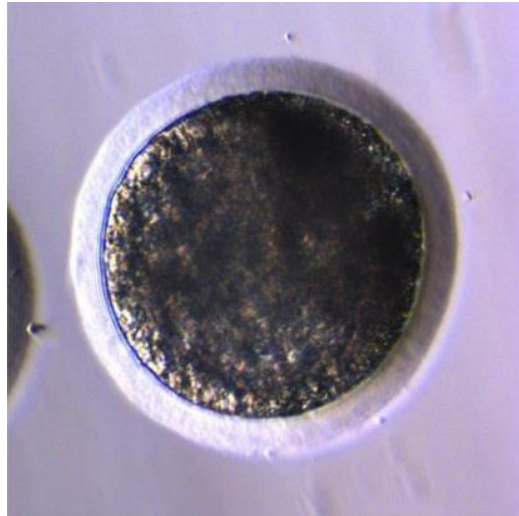


Figura 5. Blastocisto equino producido por ICSI y cultivo in vitro. Las células externas, inmediatamente dentro de la zona pelúcida, han formado una capa de trofoblasto aparente y hay una apariencia de densidad disminuida de la cara interna del embrión. Tomado de (Stout, 2020).

Materiales y métodos

Lugar y duración

Este estudio se llevó a cabo en las instalaciones de EUREKA Reproducción Equina, ubicada en el municipio de Cajicá, Cundinamarca (Colombia), entre los meses de febrero y mayo del año 2025, con una duración total de cuatro meses.

Animales utilizados

Se trabajó con un total de 30 yeguas de raza criollo colombiano, con un promedio de edad entre los 6 y 16 años. Todas las yeguas eran propiedad de criadores particulares, cuyos nombres se mantuvieron en confidencialidad por solicitud expresa. Las yeguas se encontraban en buenas condiciones generales de salud y fueron evaluadas previamente mediante ecografía transrectal para descartar patologías reproductivas como endometritis o presencia de fluidos intrauterinos. Ninguna de las yeguas seleccionadas presentó alteraciones que impidieran su inclusión en el estudio.

De las 30 yeguas, 20 fueron asignadas al grupo de OPU-ICSI, de las cuales 10 provenían de la Sabana de Bogotá y 10 de la ciudad de Cali. Las 10 yeguas restantes formaron parte del grupo tratado mediante lavado de embriones convencional.

Criterios de inclusión y manejo clínico

Para el grupo de OPU-ICSI, el criterio principal de selección fue la presencia de una carga folicular mínima de 10 folículos antrales. No obstante, también se incluyeron yeguas de mayor edad con menor carga folicular, según la valoración clínica individual y también debido a que son yeguas con una gran importancia en el gremio equino en nuestro país. No se consideraron como criterios de inclusión la fase del ciclo ovárico ni la condición corporal, ya que la técnica de aspiración ovocitaria no dependía de estos factores.

Previo a cada sesión de OPU o lavado convencional, las yeguas fueron sometidas a revisiones ecográficas rutinarias para garantizar su aptitud reproductiva, y se administraron medicamentos según el protocolo específico de cada procedimiento.

Procedimiento de OPU-ICSI

Para la aspiración folicular se utilizó un equipo de ecografía con sonda micro convexa, con una aguja de doble bisel calibre 12, dispuesta dentro de una guía rígida adaptada a la sonda

ecográfica. La aspiración se realizó utilizando una bomba de vacío calibrada a una presión de 130 mmHg.

El medio utilizado para la recolección ovocitaria fue un medio comercial específico para OPU, suplementado con heparina, con el fin de evitar la formación de coágulos en el sistema de aspiración.

Una vez finalizado el procedimiento de OPU, los ovocitos fueron trasladados al laboratorio de selección, que se encuentra dentro de las mismas instalaciones de EUREKA, fueron clasificados y almacenados en una transportadora de ovocitos a una temperatura de 22.5 °C por un periodo de entre 10 y 12 horas (o hasta 24 horas en los casos de yeguas provenientes de otras ciudades). En el caso de yeguas que provienen de otra ciudad, se les realiza el procedimiento OPU, luego se busca mediante un estereoscopio los ovocitos obtenidos para ser almacenados en un medio y una transportadora de ovocitos a igual temperatura de 22.5°C hasta llegar al laboratorio de ICSI. Este almacenamiento controlado se realizó para reducir el metabolismo celular y evitar que los ovocitos iniciaran su proceso de maduración de forma espontánea.

Al día siguiente, los ovocitos fueron llevados al proceso de maduración in vitro, el cual se extendió por un periodo de 24 horas. Finalizado este tiempo, se evaluó su estado de maduración y aquellos que presentaban características adecuadas fueron sometidos a la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), utilizando semen equino, tanto semen congelado como semen fresco, la elección de uno de estos por ejemplo del congelado se usa en casos de que el caballo ya haya fallecido, este fuera del país o que el dueño autoriza usar mejor semen congelado, en si no hay una preferencia de usar uno u otro, todo depende de la calidad del semen en fresco y si es una mala calidad se opta por semen congelado.

A partir de la microinyección, ellos se mantienen en un medio de cultivo con diferentes gases, hormonas, diferentes productos y se realizan observaciones desde el día 5 post-inyección, el cual es el día que se da el clivaje en un desarrollo embrionario normal, luego de esto se revisa cada día o día por medio, y desde el día 7 o día 10 se comienza a determinar si están óptimos para transferir o vitrificar. Normalmente, todos los embriones los están vitrificando por decisión de la empresa, los casos donde no vitrifican y transfieren inmediatamente es cuando el cliente exige rápido la transferencia o porque el embrión no tiene una calidad tan buena, es decir si se desarrollo todo, pero hay una posibilidad de que no sobreviva a la vitrificación o que no

sobrevida en el momento de la desvitrificación, por ende en este caso se decide transferir inmediatamente. Los embriones vitrificados se encuentran empajillados, y cuando llega el momento de transferir se introducen en una transportadora de embriones a una temperatura predeterminada de la cual no me brindaron información y son llevados en esta transportadora al sitio donde se encuentra la receptora para su transferencia.

Aquí falta dejar claro que se hace con los embriones que encuentran viables? En que casos transfieren y en que casos vitrifican, y como vitrifican (rapido o lento), porque eso tambien influye en los resultados. Como transfieren? Cambian medio, reempajillan?

Procedimiento de lavado de embriones convencional

Las yeguas de este grupo tuvieron un seguimiento reproductivo mediante ecografia, con el objetivo de detectar el momento previo a la ovulación. Una vez se identificó un folículo preovulatorio de tamaño adecuado, se aplicó deslorelina 1 mL/Intramuscular, para inducir la ovulación. Al día siguiente, se procedió con la inseminación artificial utilizando semen refrigerado, seguida con post-servicio 24/h después, utilizando oxitocina 2 mL/Intramuscular, no se realiza lavado uterino para el post-servicio debido que ninguna presento liquido por reacción al semen.

A los 8 días post-inseminación, se realizó el lavado uterino para recuperación embrionaria utilizando solución Ringer lactato. Tras la filtración del medio, se procedió a la inspección visual del filtro para identificar embriones. En caso de no ser visibles a simple vista, se utilizó un estereoscopio para examinar la solución de lavado. Los embriones recuperados fueron lavados cuidadosamente pasando por diez gotas de medio de cultivo, y luego se empajillaron para transferencia o criopreservación, según correspondiera.

Diseño metodológico

La presente investigación se estructuro como un estudio de cohorte prospectivo con diseño de casos y controles, empleando un enfoque cuantitativo. El objetivo fue comparar

parámetros reproductivos entre yeguas sometidas a la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y aquellas tratadas mediante lavado embrionario convencional.

Para el grupo experimental, se conformaron dos subgrupos diferenciados por su procedencia geográfica: Sabana de Bogotá (altitud 2.598 msnm) y Cali (altitud 1.000 msnm).. Cada subgrupo incluyó 10 yeguas, totalizando 20 animales sometidos al protocolo de aspiración folicular guiada por ecografía (OPU) seguido de ICSI. Adicionalmente, se estableció un grupo control compuesto por 10 yeguas, a las cuales se les aplicó el procedimiento convencional de lavado embrionario, con el fin de realizar una comparación exploratoria entre ambas técnicas.

Durante el periodo de estudio (febrero a mayo de 2025), cada yegua de los grupos experimentales fue sometida a tres sesiones de OPU bajo condiciones estandarizadas. La aspiración folicular fue realizada por el mismo equipo técnico, asegurando uniformidad en el manejo y manipulación de los ovocitos. Todos los ovocitos recuperados fueron transportados y procesados en el mismo laboratorio, siguiendo un protocolo único de ICSI, independientemente del lugar de origen de los animales.

En los grupos experimentales se registraron las siguientes variables reproductivas:

- Número total de folículos aspirados por yegua.
- Número de ovocitos recuperados en cada sesión.
- Número de ovocitos que alcanzaron la maduración in vitro.
- Número total de embriones generados posterior a la microinyección espermática.

A partir de estas variables, se calcularon las siguientes tasas:

- Tasa de recuperación ovocitaria (O/F)
- Tasa de maduración (M/O)
- Tasa de desarrollo embrionario (E/M)x

Para el grupo control, se registró el número de folículos presentes previo al lavado y el número de embriones recuperados posteriormente. Es importante señalar que, si bien la estructura experimental y el registro sistemático de variables permiten establecer comparaciones entre ambas técnicas, el tamaño limitado de la muestra ($n = 30$) restringe la capacidad de inferencia estadística. Por tanto, los resultados obtenidos deben interpretarse bajo un enfoque exploratorio, orientado a generar hipótesis para estudios posteriores con mayor poder estadístico.

Análisis estadístico

Para el análisis de la información recolectada, se inició con un estudio descriptivo de las variables medidas, empleando frecuencias absolutas y relativas, así como estadísticos como promedio, mediana, moda, rango, varianza, desviación estándar y coeficiente de variación. Esto permitió tener una visión general del comportamiento de los datos en cada uno de los grupos evaluados.

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis comparativo entre las tres procedencias incluidas en el estudio (Sabana de Bogotá, Cali y grupo control), aplicando la prueba ANOVA con el propósito de identificar si existían diferencias estadísticamente significativas en las variables analizadas.

La organización de los datos se realizó en Microsoft Excel y el procesamiento estadístico se llevó a cabo en la plataforma Google Colab utilizando la interfaz de Python. Para todas las pruebas se trabajó con un nivel de confianza del 95% y un nivel de significancia del 0,05.

Resultados

Se evaluaron 30 yeguas de la raza Caballo Criollo Colombiano, distribuidas en tres grupos experimentales: Sabana de Bogotá (n = 10), Cali (n = 10) y un grupo control (n = 10) sometido a lavado embrionario convencional. Durante un periodo de cuatro meses, se realizaron tres sesiones de aspiración folicular (OPU) por yegua en los grupos sometidos a la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), mientras que el grupo control fue intervenido mediante una única sesión de lavado embrionario. En todos los casos, se registraron las variables definidas en el diseño metodológico.

En el conjunto de yeguas tratadas con ICSI (Sabana y Cali), se obtuvo un promedio de 1,28 embriones por individuo, con una mediana de 1 y una moda de 0. El rango observado fue de 0 a 7 embriones, con una varianza de 2,18 y una desviación estándar de 1,48, lo que refleja una dispersión moderada a alta en la producción embrionaria. El coeficiente de variación ($CV = 1,16$) indica una elevada variabilidad relativa, evidenciando que, aunque el promedio supera un embrión por yegua, se presentaron casos sin producción embrionaria y otros con resultados superiores a la media.

En el grupo control, el número promedio de embriones recuperados fue ligeramente inferior al observado en los grupos ICSI, aunque también se evidenció una amplia variabilidad en los resultados.

Al analizar los datos por procedencia, el grupo Sabana presentó un promedio ligeramente menor en el número de folículos aspirados (14,73) en comparación con el grupo Cali (15,77). No obstante, los promedios de recuperación ovocitaria y maduración in vitro fueron similares entre ambos grupos: Sabana registró 11,40 ovocitos recuperados y 6,40 ovocitos maduros por sesión, mientras que Cali obtuvo 12,67 y 7,90, respectivamente. En cuanto a la producción embrionaria, Sabana alcanzó un promedio de 1,87 embriones por yegua, frente a 1,63 en Cali. Las tasas de recuperación ovocitaria (O/F) fueron elevadas en ambos grupos, superando el 77%, mientras que las tasas de maduración in vitro se situaron en torno al 55% para Sabana y 62% para Cali.

El análisis estadístico mediante ANOVA no reveló diferencias significativas entre los tres grupos en ninguna de las variables evaluadas ($p > 0,05$). En particular, la comparación del número de folículos aspirados y la tasa de ovulación arrojó un valor p de 0,89, mientras que la comparación entre ovocitos maduros y tasa de ovulación presentó un valor p de 0,36. Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones del presente estudio, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas en el desempeño reproductivo entre los grupos evaluados.

Cabe destacar que el tamaño limitado de la muestra ($n = 30$) restringe la potencia estadística del análisis, lo que obliga a interpretar los resultados con cautela. No obstante, los datos obtenidos proporcionan información valiosa sobre la aplicación de la técnica ICSI en el

Caballo Criollo Colombiano y constituyen una base preliminar para futuras investigaciones con mayor representatividad poblacional.

Tabla 1. Estadísticos descriptivos generales

Promedio	Mediana	Moda	Rango	Varianza	Desviación estándar	Coefficiente de variación
1,28	1	0	7	2,18	1,48	1,16

Nota: Estadísticos descriptivos calculados para la población total de yeguas evaluadas (Sabana, Cali y controles).

Tabla 2. Resultados de la prueba ANOVA

Variable / Relación evaluada	Valor p
Varianza entre grupos (Sabana, Cali y control)	0,0933
Tasa de ovulación y folículos	0,89
Tasa de ovocitos maduros y ovulación	0,36
Tasa O/F (todas las procedencias)	No significativa

Nota: Prueba ANOVA con nivel de significancia de 0,05. Valores $p > 0,05$ indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

Tabla 3. Comparación del promedio de variables reproductivas entre grupos experimentales y control

Variable	Sabana de Bogotá	Cali	Control (Lavado convencional)
Folículos	14.73	15.77	13.50
Ovocitos	11.40	12.67	10.20
Maduros	6.40	7.90	6.00
Embriones	1.87	1.63	1.20

Nota: Los valores corresponden al promedio de cada variable obtenida en los grupos evaluados: Sabana de Bogotá y Cali (técnica ICSI) e inseminación convencional (Control).

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio permitieron comparar la efectividad de la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) con el lavado embrionario convencional en yeguas de la raza Caballo Criollo Colombiano. En términos generales, ambos grupos alcanzaron un promedio similar de embriones por yegua, lo que sugiere que la ICSI podría ofrecer una eficiencia comparable a la técnica tradicional. No obstante, se observó una amplia variabilidad individual en las respuestas, con algunas yeguas que no produjeron embriones y otras que superaron la media, lo que refleja una dispersión significativa en los resultados. Esta heterogeneidad puede explicarse tanto por factores biológicos propios de cada yegua como por condiciones técnicas asociadas a los procedimientos, tal como lo han señalado investigaciones previas en equinos de otras razas (Cuervo-Arango et al., 2019).

Un aspecto relevante es que, en el grupo ICSI, se logró obtener embriones incluso en yeguas con menor carga folicular, lo que representa una ventaja frente al lavado embrionario convencional, que depende estrictamente del ciclo ovulatorio completo. Este hallazgo concuerda con reportes internacionales que destacan la utilidad de la ICSI en casos de fertilidad reducida, o cuando se cuenta con un número limitado de ovocitos o de dosis de semen. En este sentido, la técnica demuestra potencial como herramienta de apoyo en programas reproductivos donde el lavado convencional no resulta eficaz (Equine Medical Services, s.f.). Sin embargo, el análisis estadístico mediante ANOVA no mostró diferencias significativas entre los grupos evaluados (Sabana de Bogotá, Cali y control), lo que impide establecer conclusiones definitivas acerca de la superioridad de una técnica sobre la otra. Este resultado puede atribuirse, en parte, al tamaño reducido de la muestra, que limita la capacidad de detectar diferencias sutiles. De igual manera, factores como la calidad variable del semen congelado-descongelado, el estado fisiológico de las yeguas y las variaciones en la respuesta a la estimulación folicular pudieron haber influido en los resultados obtenidos (UC Davis, s.f.).

La dispersión observada en las tasas de recuperación, maduración y fecundación también pone de manifiesto la necesidad de estandarizar ciertos aspectos del procedimiento, como los medios de cultivo empleados, las condiciones de transporte de los ovocitos y el tiempo

transcurrido entre la aspiración y la microinyección. Estos factores han sido identificados en la literatura como determinantes de la calidad ovocitaria y, en consecuencia, del éxito en la formación de embriones (Brück et al., 1992). En conjunto, la información generada en este trabajo genera un gran aporte al conocimiento de la reproducción asistida en el Caballo Criollo Colombiano. Aunque no se lograron diferencias significativas entre la ICSI y el lavado convencional, los hallazgos sugieren que la ICSI ofrece ventajas prácticas en casos específicos, como la posibilidad de obtener embriones a partir de yeguas con baja carga folicular, con limitaciones reproductivas y el uso de machos reproductores con mala calidad seminal o que ya no se encuentran vivos, con el fin de preservar la genética. De esta manera, el estudio contribuye a sentar las bases para investigaciones futura que, con un mayor número de animales y un diseño metodológico más estricto, puedan definir con mayor claridad el papel de la ICSI en la reproducción equina nacional (Cuervo-Arango et al., 2019).

Conclusiones

El presente estudio tuvo como propósito evaluar la efectividad de la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en el Caballo Criollo Colombiano (CCC) y compararla con el procedimiento convencional de lavado embrionario convencional. Los resultados obtenidos permiten señalar varios aspectos de interés, aunque deben interpretarse con cuidado debido al tamaño reducido de la muestra (20 yeguas sometidas a OPU-ICSI y 10 al lavado convencional).

En primer lugar, se observó que la media de embriones producidos por yegua fue equivalente en ambos grupos (1,28), lo que sugiere que, en términos generales, la eficiencia reproductiva alcanzada con la técnica ICSI puede ser comparable a la del lavado convencional. No obstante, los datos mostraron una amplia variabilidad individual, con yeguas que no produjeron embriones y otras que superaron la media, lo que evidencia una dispersión moderada a alta en los resultados. Esta heterogeneidad indica que la respuesta reproductiva puede estar influenciada por factores biológicos propios de cada individuo y por la técnica misma. Un hallazgo importante es que la técnica ICSI permitió obtener embriones incluso en yeguas con

baja carga folicular, lo que representa una ventaja frente al lavado convencional, el cual depende directamente del proceso fisiológico completo de ovulación y fertilización. Esto refuerza la idea de que la ICSI puede constituirse en una alternativa útil para el manejo de yeguas con limitaciones reproductivas o con condiciones que dificultan la producción de embriones mediante técnicas tradicionales.

Sin embargo, los análisis estadísticos (ANOVA) no mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (Sabana, Cali y control), lo que confirma que no es posible establecer conclusiones definitivas sobre la superioridad de una técnica sobre la otra con los datos disponibles. La dispersión observada en las tasas de recuperación ovocitaria, maduración y formación de embriones subraya la necesidad de ampliar la muestra y de estandarizar algunos aspectos técnicos del procedimiento para obtener resultados más consistentes.

En síntesis, este trabajo aporta información sobre el uso de la técnica ICSI en el Caballo Criollo Colombiano y constituye un punto de partida para futuras investigaciones. Aunque no se puede afirmar con certeza la efectividad de la técnica frente al lavado convencional, se evidencia su potencial como herramienta reproductiva, especialmente en situaciones donde otras alternativas no son viables.

Recomendaciones

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, es posible plantear algunas recomendaciones que pueden guiar investigaciones y aplicaciones futuras. En primer lugar, resulta fundamental ampliar el tamaño de la muestra en trabajos posteriores, lo que permitirá realizar análisis estadísticos más sólidos y establecer conclusiones con un mayor grado de confianza sobre la efectividad de la técnica ICSI frente al lavado convencional. De igual manera, se recomienda profundizar en el control de variables biológicas y técnicas, tales como la edad de las yeguas, el estado folicular, la calidad del semen congelado-descongelado y la estandarización de los medios de cultivo, pues estas condiciones afectan directamente en los resultados reproductivos. Asimismo, es importante implementar seguimientos a largo plazo de los embriones producidos por ambas técnicas, con el fin de evaluar no solo la tasa de obtención

embrionaria, sino también la viabilidad gestacional y el desarrollo de los potros nacidos mediante estos procedimientos. Otra recomendación importante se relaciona con la necesidad de fortalecer la capacitación técnica y la infraestructura en biotecnologías reproductivas en Colombia, de manera que se logre consolidar el uso de la ICSI y adaptarla a las particularidades del Caballo Criollo Colombiano.

Referencias

- Hinrichs, K. (2010). *In vitro production of equine embryos: State of the art. Reproduction in Domestic Animals*, 45(Suppl. 2), 3–8. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01624.x>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.011>
- Claes, A., & Stout, T. A. E. (2022). Success rate in a clinical equine in vitro embryo production program. *Theriogenology*, 187, 215–218. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.04.019>
- Cuervo-Arango, J., Claes, A. N., & Stout, T. A. E. (2019). Mare and stallion effects on blastocyst production in a commercial equine ovum pick-up-intracytoplasmic sperm injection program. *Reproduction, Fertility and Development*, 31, 1894–1903. <https://doi.org/10.1071/RD19201>
- Hawley, L. R., Enders, A. C., & Hinrichs, K. (1995). Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. *Biology of Reproduction*, 52, 243–252. https://doi.org/10.1093/biolreprod/52.monograph_series1.243
- Márquez-Moya, A., Sala-Ayala, L., Carreras-Vico, N., Martínez-Boví, R., & Cuervo-Arango, J. (2025). Factors influencing oocyte recovery during ultrasound-guided follicle aspiration in mares: A postmortem study. *Theriogenology*, 235, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.12.032>

- Galli, C., Colleoni, S., Duchi, R., Lagutina, I., & Lazzari, G. (2013). Equine assisted reproduction and embryo technologies. *Animal Reproduction*, 10(3), 334–343.
- Bruck, I., Raun, K., Synnestvedt, B., & Greve, T. (1992). Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. *Equine Veterinary Journal*, 24(1), 58–59. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1992.tb02780.x>
- Ovohorse Equine Reproduction. (s.f.). ¿Qué es la técnica OPU-ICSI? Ovohorse. <https://ovohorse.com/tecnicas-de-reproduccion-asistida-equina-pick-up-icsi/#Realización-de-aspiraciones>
- Alejandro, M., Raquel, C., Pacheco, A., Bartholazzi, A., Vega, H. O., & Ribeiro, S. (2016). Aspiración folicular, maduración in vitro e inyección intracitoplasmática en yeguas. *PUBVET*, 10(3), 248–256.
- Cardona, L. A. (2016). Maduración de ovocitos equinos por encapsulación. *Universidad de Zaragoza*, 1(2).
- Cuervo-Arango, J., Sala-Ayala, L., Márquez-Moya, A., & Martínez-Boví, R. (2025). The influence of aspiration pressure, follicle flushing method and needle rotation during single-operator OPU technique on oocyte recovery and embryo production in the mare. *Animals*, 15(6), 832. <https://doi.org/10.3390/ani15060832>
- Salamone, D., Canel, N., Belen, R. (2017). ICSI in domestic and wild mammals. *Society for Reproduction and Fertility*, 2(17), 1–52.
- Vélez, I., & Hinrichs, K. (2011). Técnicas de reproducción asistida en caballos. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 6(2), 124–128.
- Stout, T. A. E. (2020). Clinical application of in vitro embryo production in the horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, 89, 103011. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103011>

Campbell, M. (2014). Transferencia de embriones en caballos de competición: Gestión de yeguas y expectativas. *Equine Veterinary Education*, 26(6), 322–327.

Carnevale EM, Sessions DR. In vitro Production of Equine Embryos. *J Equine Vet Sci*. 2012;32(7):367–71.

Hinrichs ICV y K. Assisted reproductive technologies in the horses. *CES Med Vet y Zootec*. 2011;6(2):124–8.

Goudet, G., Besenfelder, U., Daels, P., Hinrichs, K., Morris, L., & Stout, T. (2022). Assisted reproductive techniques in horses. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(Suppl. 4), 165–178. <https://doi.org/10.1111/rda.14085>

Estela-Paz, M. E., Saavedra-Saavedra, J., & Moyano, M. N. (2009). Comparación entre el clivaje temprano y el estadio pronuclear como parámetros de referencia para inducir el embarazo en pacientes ovoreceptoras en Cali (Colombia). *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 60(3), 225–232. Recuperado de https://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342009000300004

Cuervo-Arango, J., Sala-Ayala, L., Márquez Moya, A., & Martínez, R. (2019). Factors influencing blastocyst production in a commercial equine ICSI program. *Animals*, 9(10), 743. <https://doi.org/10.3390/ani9100743>.

UC Davis School of Veterinary Medicine. (s.f.). ICSI services. UC Davis Veterinary Assisted Reproduction Technologies (VetART). Recuperado el 25 de agosto de 2025, de <https://vetart.vetmed.ucdavis.edu/ICSI-services>.

Equine Medical Services. (s.f.). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Recuperado el 25 de agosto de 2025, de <https://www.equmed.com/reproductive-services/icsi/>

