



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Efecto de diferentes concentraciones de melatonina durante la
maduración del ovocito y el desarrollo embrionario en cerdos
producidos *in vitro*.**

**Tesis que para obtener el título de
Médica Veterinario Zootecnista**

Presenta:

Laura Andrea Blancas Álvarez

Asesora:

Dra. Alma Lilia Álvarez Guerrero

Co-asesores

**M. en C. Alicia Alcántar Rodríguez
Dr. José Alfredo Medrano Hernández**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mamá y papá, al esfuerzo que día a día tuvieron que realizar para que mis sueños fueran mucho más fáciles de realizar, todo esto es por y para ustedes también, los amo y deseo que sientan este trabajo tan suyo como mío.

A mi segunda mamá, la cual ha estado en cada paso, apoyándome, alentándome y recordándome lo importante de la vida.

A los profesores, tanto de la carrera como de todos los niveles de educación, por su paciencia y compromiso conmigo y con cada uno de sus alumnos, en especial a aquellos que ya no están pero que dejaron una huella en mí como persona y como profesional.

A mis amigos, a los que estuvieron en el proceso y que me tendieron la mano cada que lo necesité, la carrera fue, en parte, un trabajo en equipo y sin ustedes no lo hubiera logrado.

A mis hermanas por elección, Rebe y Lau, su apoyo, sus palabras y su compañía fueron pieza clave en éste trabajo, un cachito de esto también es para ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por siempre hacerme saber que de su mano todo es posible, que mi lugar seguro siempre será Él y que nada pasa por casualidad.

Gracias papá y mamá, gracias por su ejemplo, su amor, su compañía, su paciencia y su esfuerzo, todo lo que me han dado ha rendido sus frutos y hoy soy lo que soy, en gran parte, por ustedes.

Gracias a mis asesores, Dra. Alma, Dr. Medrano y M. en C. Alicia, todo su apoyo, conocimientos, tiempo y paciencia fueron pieza clave para que pudiera llevar a cabo éste proyecto.

Gracias a los MVZ´s José Javier Rodríguez Pérez y Julieta Islas Reyes, encargados del Rastro TIF los cuáles me abrieron las puertas para la colecta de mi material biológico.

Gracias a los trabajadores del rastro Baltazar Ortiz Luna y Gabino Ortiz Luna quienes, con su ayuda desinteresada, pude obtener el material biológico.

Gracias a mis sinodales, quienes con sus comentarios y puntos de vista se pudo nutrir aún más esta investigación.

Gracias especiales a mis compañeros y amigos del laboratorio 2, MVZ Dani, MVZ Miguel, M. en C. Alberto y M. en C. Uriel, sus comentarios y apoyo fueron de mucha ayuda, tanto que sin ustedes, los resultados no serían los mismos.

Gracias al mejor servicio social, Lau, ser mi mano derecha tiene un valor incalculable, gracias por tu apoyo, tu trabajo y compromiso para con el proyecto.

Gracias a los proyectos DGAPA-PAPIIT IN205421 y FES Cuautitlán CI2214, por el financiamiento para que se pudiera llevar a cabo este trabajo de investigación.

ÍNDICE

DEDICATORIAS-----	2
AGRADECIMIENTOS-----	3
RESUMEN -----	8
INTRODUCCIÓN -----	10
ANTECEDENTES -----	11
a) El cerdo -----	11
b) Fertilización <i>in vitro</i> -----	12
c) Usos de la melatonina en la FIV -----	13
MARCO TEÓRICO -----	14
-Maduración <i>in vitro</i> -----	15
-Fecundación <i>in vitro</i> -----	17
-Desarrollo embrionario <i>in vitro</i> -----	18
-Melatonina-----	19
-Funciones -----	22
JUSTIFICACIÓN -----	23
OBJETIVOS -----	24
-Objetivo general -----	24
-Objetivos particulares -----	24
HIPÓTESIS -----	24
METODOLOGÍA -----	25
ANÁLISIS ESTADÍSTICO -----	31
RESULTADOS -----	31
DISCUSIÓN -----	38
CONCLUSIONES -----	43
REFERENCIAS -----	44

Índice de figuras

Figura 1. Aspiración folicular en ovarios de cerda obtenidos de rastro. -----	16
Figura 2. Fotografía de ovocito maduro con expansión de células de la granulosa. -----	18
Figura 3. Esquema sobre los estadios del desarrollo embrionario. -----	19
Figura 4. Esquema de la vía para la síntesis de la melatonina. -----	20
Figura 5. Ovarios de cerda en fresco obtenidos de rastro. -----	26
Figura 6. Líquido folicular dentro de tubo cónico de 50 ml. -----	26
Figura 7. Ovocitos en diferentes etapas de maduración. Tinción de aceto-orceína al 1%. -----	32
Figura 8. Ovocitos teñidos con azul tripán después de 44 horas de maduración.-----	34
Figura 9. Embriones de cerdo y ovocito porcino no fertilizado.-----	36

Índice de tablas

Tabla 1. Porcentaje de maduración <i>in vitro</i> de COC de cerdas expuestas a diferentes concentraciones de melatonina.-----	33
Tabla 2. Porcentaje de viabilidad en ovocitos de cerda expuestos a diferentes concentraciones de melatonina. -----	34
Tabla 3. Porcentaje de fertilización y desarrollo embrionario en posibles cigotos de cerdo expuestos a diferentes concentraciones de melatonina. -----	37

Lista de abreviaturas

5-HTP= 5-hidroxitriptófano

AC= Adenilatociclasa

AMPc= Monofosfato cíclico

CO₂= Dióxido de carbono

COC= Complejo-ovocito-cúmulo

DM= Defined medium

FIV= Fertilización *in vitro*

GC= Grupo control

GE1= Grupo experimental 1

GE2= Grupo experimental 2

GE3= Grupo experimental 3

HIOMT= Hidroxiindol-O-metiltransferasa

IA= Inseminación artificial

MI= Metafase I

MII= Metafase II

MLT= Melatonina

mTBM= Medio modificado Tris-buffered

NaCl= Cloruro de sodio

NAS= N-acetilserotonina

NAT= N-acetiltransferasa

NCSU-23= Medium North Carolina State University

NE= Norepinefrina

PIV= Producción *in vitro*

ROS= Especies reactivas de oxígeno.

TALP= Solución Tyrodes modificada

TCM-199= Tissue Culture Medium 199

VG=Vesícula Germinal

μM = Micromolar

$^{\circ}\text{C}$ = Grados Celsius

RESUMEN

El presente trabajo se elaboró con la finalidad de probar los efectos de la adición de 4 concentraciones diferentes de melatonina (MLT) (0,1, 3 y 5 μ M MLT) durante la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario de cerdos respectivamente. En la primer etapa del experimento se obtuvieron 1142 complejos-ovocitos-cúmulos (COC), que fueron recuperados a partir de ovarios de cerdas de un rastro local. Para el grupo 0 μ M de MLT se colocaron 269 COC, en el grupo 1 μ M se colocaron 289 COC, para el grupo 3 μ M MLT se colocaron 306 COC y para el grupo 5 μ M de MLT se colocaron 278 COC, todos ellos incubados en cajas de 4 pozos con medio TCM-199 por 44 horas a 38°C con 5% de CO₂ y humedad a saturación. Posteriormente, los COC fueron teñidos con aceto-orceína al 1% para evaluar el porcentaje de maduración *in vitro*. En la segunda etapa del experimento se colectaron 1514 COC en total, mismos que fueron divididos en 4 grupos, pues, además de adicionar MLT en la etapa de maduración, también fue adicionada en la etapa de desarrollo embrionario a las mismas concentraciones antes mencionadas. Para ello, después de la maduración, los ovocitos fueron fertilizados con semen refrigerado a una concentración de 1x10⁶ espermatozoides/ml y co-incubados en medio mTMB durante 7 horas. Posteriormente los posibles cigotos fueron transferidos a cajas de 4 pozos con medio NCSU-23 suplementados con 0, 1, 3 y 5 μ M de MLT incubados durante 8 días. Al finalizar esta etapa, el número de posibles cigotos por grupo fue de: 336 posibles cigotos para el grupo con 0 μ M de MLT, 340 posibles cigotos para el grupo suplementado con 1 μ M de MLT, 316 posibles cigotos para el grupo suplementado con 3 μ M de MLT y 320 posibles cigotos para el grupo suplementado con 5 μ M de MLT. Los datos obtenidos fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANOVA) teniendo una p<0.05. Los porcentajes de maduración (MII) fueron: 34.5 \pm 2.46% (0 μ M de MLT), 45.9 \pm 5.70% (1 μ M de MLT), 40.7 \pm 4.7% (3 μ M de MLT) y 43.7 \pm 6.46% (5 μ M de MLT). Los porcentajes de fertilización fueron: 48.7 \pm 3.11% (0 μ M de MLT), 55.7 \pm 7.35% (1 μ M de MLT), 52.0 \pm 5.97% (3 μ M de MLT) y 35.4 \pm 3.68% (5 μ M de MLT). Los porcentajes de blastocistos fueron: 14.4 \pm 2.33% (0 μ M de MLT) , 26.9 \pm 9.57% (1 μ M de MLT), 21.2 \pm 4.43% (3 μ M de MLT) y 15.9 \pm 3.11% (5 μ M de MLT). No se encontraron diferencias significativas entre

los diferentes grupos de estudio. En conclusión, bajo estas condiciones, la MLT a las concentraciones previamente descritas, no favoreció la maduración *in vitro*, ni el desarrollo embrionario en la especie porcina.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la experimentación animal es una actividad fundamental en la investigación biomédica, ya que gracias a la utilización de diferentes animales en espacios controlados, se han podido lograr grandes avances en la medicina que habrían sido imposibles por otros medios (CREBA, 2021).

Uno de los animales con más relevancia ha sido el cerdo, ya que es una de las principales especies de producción ganadera, además, su valor biomédico como modelo animal para estudiar diversas condiciones humanas ha ido en aumento (Romar, 2019), ya que, si bien, anteriormente los roedores eran las especies más utilizadas en este ámbito, algunas líneas de investigación han agotado la información que se puede extraer de ellos (CREBA, 2021).

Muchas son las áreas de investigación en donde los cerdos resultan ser útiles (Gadea y García 2010), sin embargo, son los avances tecnológicos en modificaciones genéticas, clonación mediante la transferencia de células somáticas y xenotrasplantes en donde el rango de aplicaciones de los modelos porcinos se ha incrementado marcadamente (Marinona *et al.*, 2018).

Dichos avances tecnológicos parten de la biotecnología de la reproducción, la cual incluye un conjunto muy diverso de técnicas, entre las que se encuentran: inseminación artificial (IA), transferencia de embriones, crioconservación de gametos y embriones, citometría de flujo para el sexaje de espermatozoides, producción *in vitro* de embriones (PIV), transferencia nuclear y microinyección de construcciones de ADN (Martínez, 2002).

El presente estudio está enfocado en la fertilización *in vitro* (FIV), la cual es una técnica de reproducción asistida basada en el co-cultivo de espermatozoides y ovocitos en condiciones controladas para generar cigotos que inicien el desarrollo embrionario con diversos fines (Fernández *et al.*, 2010).

ANTECEDENTES

a) El cerdo

Existen dos procesos paralelos de domesticación del cerdo, uno en oriente próximo hace 13,000 años y otro en China fechado en los 4,900 a.c. lo cual convierte al cerdo en uno de los primeros animales utilizados por el ser humano (INAES, 2018).

En México, hubo evidencia de que en 1519, tras la tercera invasión de los españoles a México liderados por Hernán Cortés, fue éste quien introdujo la especie porcina en nuestro país al traer cientos de cerdos desde Cuba, pues las tropas españolas basaban su alimentación en la carne de estos animales (Ogata, 2019).

Desde entonces y hasta la actualidad se desarrolló la porcicultura, la cual es una rama de la zootecnia que se encarga de la cría, reproducción y producción porcina, comprende todo el manejo alimenticio, sanitario y genético para producir carne de cerdo de la mejor calidad para el consumo humano (SADER, 2020).

La porcicultura es una actividad importante en México, proporciona una de las principales fuentes de proteína para la población mexicana. Por detrás del pollo, el cerdo es la segunda carne más consumida en el país (SENASICA, 2021). En 2019, el consumo per cápita de carne de cerdo a nivel nacional, fue de aproximadamente 18 kg (SIAP, 2019).

Sin embargo, el cerdo no sólo es utilizado en el ámbito de la producción, también ha sido de suma importancia en el área biomédica, gracias a sus similitudes con los humanos en términos de anatomía, inmunología, bioquímica, fisiología y genética (Soto *et al.*, 2019).

Dicho lo anterior, podemos entender porque el cerdo se utiliza en muchas y muy diversas áreas de investigación, como trasplantes, cirugía, enfermedades cardiovasculares, dermatológicas, degenerativas, infecciosas o tumorales, así como también para la validación de nuevos dispositivos médicos (CREBA, 2021).

Por ejemplo, en 1985 el grupo de Hammer y colaboradores en Estados Unidos publicó que habían logrado la generación de cerdos transgénicos mediante el empleo de técnicas de inyección pronuclear.

En el 2005 Rafael Valdes y David White realizaron trasplantes de islotes de cerdos combinados con células de Sertoli testiculares en niños con diabetes mellitus de tipo 1. Durante el seguimiento de más de un año, una niña de 17 años no requirió insulina ni otros medicamentos.

Por otro lado, Rogers y colaboradores en el 2008 realizaron una revisión bibliográfica en donde describen todas las características similares que tienen los cerdos con los humanos con respecto al estudio de la fibrosis quística y como es que este modelo biológico ayuda a obtener datos acerca de dicha enfermedad, los cuales posteriormente con su estudio, favorecerán el tratamiento de este padecimiento.

No obstante, muchas de las aplicaciones del cerdo son utilizadas gracias a la biotecnología reproductiva, tal y como lo mencionan Dongjin y colaboradores en 2023 donde señalan que la utilización de las células madre embrionarias derivadas de blastocistos de cerdos son herramientas poderosas para estudios preliminares sobre enfermedades humanas, sin embargo, para obtener estos blastocistos, se recurrió a una herramienta reproductiva específica, la fertilización *in vitro*.

b) Fertilización *in vitro*

La FIV, es un instrumento valioso en el campo de la investigación científica y ofrece una nueva área de biotecnología práctica en la reproducción animal asistida, como prueba de fertilidad en los animales reproductores y mejor aprovechamiento del potencial biológico que poseen, tanto las hembras como los machos de los animales de granja (Córdova *et al.*, 2011).

La historia de la FIV en mamíferos, se remonta a 120 años atrás, sin embargo, los primeros intentos exitosos de cultivar embriones de mamíferos preimplantados fueron realizados en 1913 por Albert Brachet, Director de la Escuela de Embriología

de Bruselas en el Instituto de Anatomía Warocqué (Revisado por Biggers, 2002) quien estudió la expansión del blastocisto de conejo *in vitro*.

No obstante, la tecnología actual de la FIV, se inició en 1959 cuando se observó a través del microscopio por primera vez éste fenómeno en gametos de conejo. Desde entonces, esta biotecnología, ha contribuido de manera definitiva al estudio de la reproducción en animales y en los seres humanos (Córdova *et al.*, 2011).

Sin embargo, en lo que respecta a humanos y a otras especies de mamíferos como los cerdos, la FIV ha sido aplicada satisfactoriamente desde fines de la década de 1970 (Muñoz, 2005), siendo el año de 1978 donde gracias a Patrick Steptoe, Robert Edwards y Jean Purdy se logró el primer nacimiento humano mediante FIV, dando paso a la “creación” de Louise Brown, “la primera niña FIV” (Mata y Vázquez, 2018).

A pesar de que, con el paso del tiempo ha habido grandes avances dentro de la FIV, no fue sino hasta el año 2015 que un grupo de investigadores de la Universidad de Cornell en Estados Unidos, logró obtener la primer camada de perros nacidos vivos por ésta técnica y posteriormente la transferencia de embriones.

Con lo que respecta a los cerdos, muchas han sido las investigaciones que se han realizado alrededor de la FIV y sus implicaciones, siendo una de las más destacadas la de Ducolomb y colaboradores, quienes en 2005 obtuvieron los primeros cerdos nacidos en México a partir de dicha tecnología, siendo un parteaguas para la especie y para futuras investigaciones dentro del área médica y de la producción.

c) Usos de la melatonina en la FIV

La melatonina es una hormona endógena soluble en lípidos, producida principalmente por la glándula pineal, proporcionando señales de sincronización estacional y circadiana (Langston *et al.*, 2021). Además, ha sido conocida como un potente antioxidante. El mecanismo de su desempeño incluye la eliminación de radicales libres, la inducción de enzimas antioxidantes, como la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa, así como la inhibición de la enzima prooxidasa óxido nítrico sintasa (Azarmehr *et al.*, 2023).

Además de su función como agente cronobiótico que actúa en la regulación de la temperatura, en la regulación del desarrollo sexual y en la del ciclo reproductor, la melatonina es un protector celular, potente antioxidante, agente oncostático e inmunoestimulante (Poza *et al.*, 2018).

Debido a que existen diferentes protocolos de investigación en temas reproductivos como la criopreservación de espermatozoides, se tiene información de la existencia de cambios fisiológicos que sufren éstas células, los cuales pueden ser producto de variaciones térmicas, osmóticas o bien, la producción excesiva de ROS (Medrano *et al.*, 2017). Prueba de ello, Martínez en el 2020, adicionó melatonina como antioxidante en la criopreservación de semen de perro teniendo resultados positivos dentro de su investigación.

Por otro lado, en la FIV con la especie porcina, la melatonina ha tenido un efecto positivo al adicionarse a los medios de maduración y desarrollo embrionario, mejorando los porcentajes de ovocitos en metafase II y de blastocistos (Shi *et al.*, 2009 y Do *et al.*, 2015).

MARCO TEÓRICO

Los gametos de muchas especies de mamíferos, han sido manipulados empleando una gran variedad de estrategias que tienen que ver especialmente con la infertilidad y en la producción de animales domésticos, así como también para entender los eventos fisiológicos y moleculares de los procesos reproductivos y del desarrollo.

Para lo anterior se requiere de la biotecnología de la reproducción, la cual es un conjunto de técnicas que van desde la inseminación artificial hasta la clonación, todas ellas encaminadas a aumentar la eficiencia reproductiva de los animales. En sí mismas son herramientas útiles para aplicar otras técnicas más modernas, como la transgénesis. La producción de embriones *in vivo* dio paso a la producción de embriones *in vitro*, y en su aplicación se incluyeron como herramientas la inseminación artificial y la transferencia de embriones (Ugalde, 2014).

Así pues, este tipo de tecnologías exigen ovocitos y embriones de buena calidad (Martínez *et al.*, 2022). Sin embargo históricamente, la producción *in vitro* de ovocitos y embriones de cerdo ha sido un proceso muy ineficiente con bajas tasas de desarrollo embrionario posterior (Redel *et al.*, 2019).

Lo anterior puede tener como justificación el que la capacidad de desarrollo de los embriones depende principalmente de la calidad de los ovocitos obtenidos (Zhao *et al.*, 2022), y dado que al realizar este tipo de técnicas se usa un ambiente artificial, probablemente las condiciones de cultivo ponen en peligro la homeostasis embrionaria, ya que la suplementación de los medios de cultivo con compuestos conocidos y no conocidos, así como la presencia de metales, el pH y la tensión del oxígeno atmosférico y la luz visible dan paso a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) los cuales son algunos de los factores que se han asociado a la frecuente alteración en la maduración del ovocito y posteriormente en el desarrollo embrionario *in vitro* (Camargo *et al.*, 1999).

Las tecnologías de reproducción asistida en el cerdo son críticas para la producción de cerdos modificados genéticamente como modelos de enfermedades humanas y para mejorar la producción agrícola (Redel *et al.*, 2019), por esta razón, la recuperación de cerdos con características especiales requieren una fuente confiable de embriones desarrollados correctamente (Muñoz, 2005).

Por lo anterior, una de las formas más seguras de conseguir ese tipo de embriones de calidad es recurriendo a la FIV.

Para fines prácticos, la FIV se divide en 3 etapas cruciales, las cuales son: maduración *in vitro* de ovocito, la fertilización *in vitro*, y el desarrollo embrionario temprano *in vitro*.

Maduración *in vitro*

La maduración de los ovocitos implica una serie de cambios nucleares y citoplasmáticos que dan como resultado la formación de un ovocito que es competente para sufrir la fertilización. El ovocito reanuda la primera división meiótica

y progresa desde la etapa de vesícula germinal (VG) hasta la maduración antes de detener la metafase de la meiosis II (MII) (Dalton *et al.*, 2013).

En la maduración *in vitro* se buscan replicar las condiciones ambientales a las que estaría sometido el complejo-ovocito-cúmulo (COC) *in vivo*, ya que, es obtenido y colocado dentro de un medio que promueve su maduración, lo que podemos distinguir una vez reanudada la meiosis.

Existen diferentes técnicas para la de obtención de los COC en cerdas de ovarios obtenidos del rastro, las técnicas más utilizadas son: la punción folicular (Figura 1), en la cual se realiza la punción de folículos mayores de 3 mm de diámetro (folículos secundarios) y; los cortes de la superficie folicular mejor conocido como “slicing”. Lorenzo y colaboradores en 2015 mencionan que ésta última técnica es la que permitió aprovechar mejor los ovarios de hembras prepúberes y además resulta ser una técnica más rápida (con respecto a la aspiración folicular) y donde se obtiene una mayor cantidad de COC por ovario, sin embargo, ellos mismos añaden que la técnica de punción folicular en cerdas permite la selección de los folículos a aspirar evitando la punción de vasos, folículos hemorrágicos, degenerados o excesivamente grandes.



Figura 1. Aspiración folicular en ovarios de cerda obtenidos de rastro (Foto propia, tomada en el laboratorio 2 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), FESC, UNAM 2023).

Por otro lado, un factor importante a considerar es el medio en donde se llevará a cabo la maduración de los COC. El medio más tradicional y empleado en la

maduración *in vitro* de COC es el TCM-199 (Tissue Culture Medium 199), que está compuesto por sales de Earle con bicarbonato, suplementado con piruvato, lactato, vitaminas, aminoácidos, purinas y proteínas (como la albúmina bovina o suero) (Ordóñez, 2014).

Fecundación *in vitro*

En esta etapa es donde se lleva a cabo la penetración de una célula espermática a un ovocito y la conservación de material genético, fuera del tracto genital (Mancias, 2020).

Este proceso engloba varios eventos, relacionados con la manipulación de los gametos masculinos y femeninos. Entre los eventos fisiológicos que ocurren en este periodo se encuentran la capacitación y penetración de los espermatozoides, la unión de los gametos y la formación de los pronúcleos (Salgado *et al.*, 2020).

Para esta etapa, lo más crucial es el estado de las células sexuales, así como el medio en el que se incubarán. Para poder fertilizar, un espermatozoide debe estar vivo, ser móvil y tener una morfología normal (Saacke, 2003), por lo que es imprescindible la evaluación del semen a utilizar apoyándonos de pruebas en laboratorio, como la evaluación de la motilidad masal, progresiva y la viabilidad. Además de definir la concentración espermática ya que para la FIV la relación de ovocitos y espermatozoides suele ser de 1:10,000 (Ward *et al.*, 2002).

En el caso de los ovocitos, éstos tendrán que estar en el momento de madurez oportuno, es decir, los ovocitos deben haber llegado al estado de metafase II, lo cual se evidencia con la extrusión del primer cuerpo polar. En tanto, la madurez citoplasmática se observa de una forma indirecta por la uniformidad del citoplasma, junto con el grado de expansión de las células del cúmulo y el aumento del espacio perivitelino (Tur *et al.*, 2007) (Figura 2).

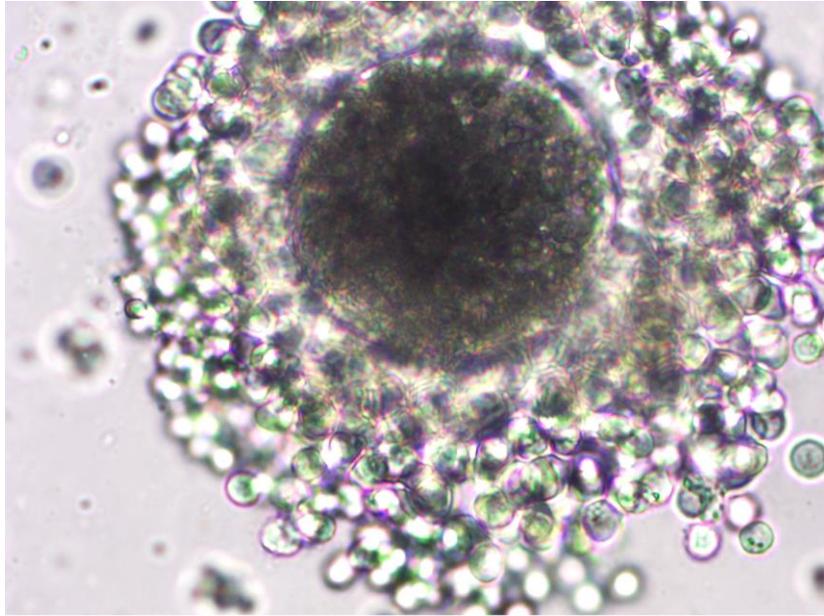


Figura 2. Fotografía de ovocito maduro con expansión de células de la granulosa. (Foto tomada en el laboratorio 2 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), FESC, UNAM, 2020).

Es de suma importancia mencionar, que uno de los aspectos clave es la elección de los medios, si bien de manera clásica el medio de FIV porcina utilizado es TCM-199, desde hace algunos años la tendencia es la preparación de medios más simples como por ejemplo TBM, TALP, DM, en el laboratorio, en un intento de controlar mejor la composición exacta y con esto evitar la formulación excesiva de componentes. Aunque los medios de cultivo empleados han sido numerosos, todos coinciden en su composición con ciertos elementos básicos que se podrían clasificar, brevemente, en una fuente de componentes orgánicos (proteínas, aminoácidos, sustratos energéticos), componentes electrolitos y otros suplementos, que han ido variando, dependiendo sobre todo del tipo de semen empleado para la FIV (Romar, 2001).

Desarrollo embrionario *in vitro*.

El objetivo de realizar el proceso de la FIV es lograr obtener embriones de calidad, por lo cual, el desarrollo embrionario *in vitro* comprende desde la primera división celular después de la fecundación (aproximadamente 20 horas después) hasta el

desarrollo de blastocisto tardío, el cual tendrá lugar entre los días 6 y 8 post fecundación.

Sin embargo los embriones de mamíferos, cuando son sometidos a cultivo, sufren un bloqueo en el desarrollo en un estado preciso que varía según la especie. En el caso del cerdo, este bloqueo tiene lugar cuando el embrión se encuentra en el estado de cuatro células, aunque gracias a Petters y Wells en 1993 se ha permitido llevar el desarrollo embrionario hasta el estado de blastocisto (Figura 3), esto por la introducción de tecnologías aplicadas en los medios de cultivo (García, 2005).

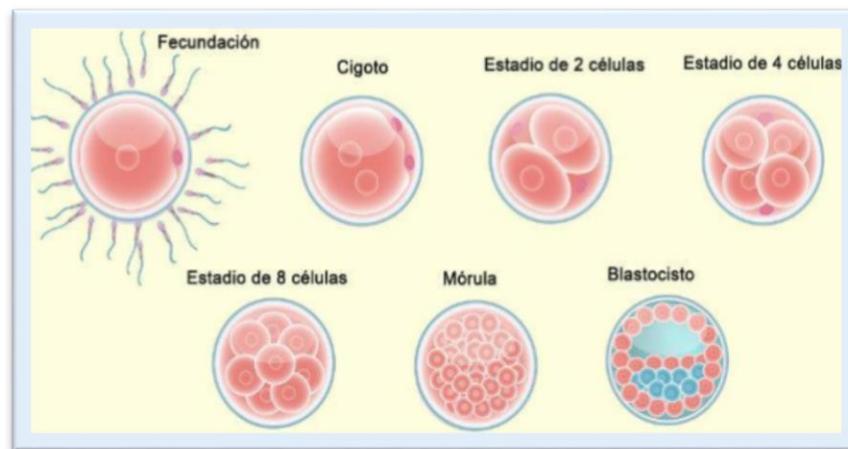


Figura 3. Esquema sobre los estadios del desarrollo embrionario.
(Colegio Alborada de Coyhaique, Chile 2011.)

Los medios capaces de sobrellevar el desarrollo de embriones porcinos más frecuentemente utilizados incluyen el medio de Whitten, el medio bicarbonato de Ringer de Krebs modificado, el medio NCSU-23, el medio de cultivo de embriones de Beltsville-3 y el medio de cigoto porcino (Marinona *et al.*, 2018; Menino *et al.*, 1982).

Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), es una neurohormona endógena que fue aislada por primera vez en 1959 en bovinos (Jara 2016). Se produce a partir del triptófano (un aminoácido esencial), mediante la transformación de serotonina a melatonina en la glándula pineal (Páramo, 2015) (Figura 4).

Este proceso comienza con la obtención de triptófano proveniente de la circulación sistémica el cuál pasa por una oxidación gracias a la enzima triptófano-hidroxilasa dando como resultado 5-hidroxitriptófano (5-HTP). Posteriormente es sometido a una descarboxilación por una enzima descarboxilasa obteniendo serotonina, la cual, a su vez es acetilada por la enzima N-acetiltransferasa (NAT), para que éste último paso pueda darse es necesaria la intervención de horas de oscuridad ya que la norepinefrina (NE) es liberada durante la noche de las terminaciones nerviosas simpáticas posganglionares y la cual va a interactuar con receptores α y β adrenérgicos situados en la membrana plasmática de los pinealocitos, induciendo con ellos la activación de la adenilatociclasa (AC) la cual promueve el aumento de niveles de adenosina 3'5' monofosfato cíclico (AMPC) promoviendo así la activación de la síntesis de NAT. Una vez que esto ocurre se retoma el ciclo con el resultado de la N-acetilserotonina (NAS) quien al ser O-metilada por la enzima hidroxiiindol-O-metiltransferasa (HIOMT) dará como producto final a la melatonina (Adaptado de Jara 2016; Oviedo 2021).

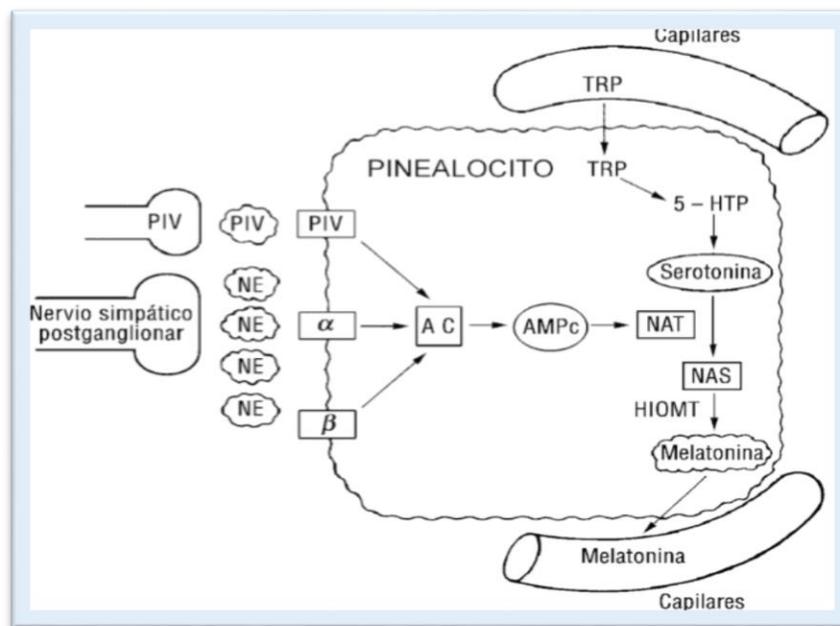


Figura 4. Esquema de la vía para la síntesis de melatonina.

Tomado y adaptado de Oviedo, 2021.

Una vez sintetizada, la melatonina se libera a la sangre y se distribuye por todos los fluidos corporales, accediendo a la saliva, a la orina, a los folículos preovulatorios, al semen, al líquido amniótico y a la leche materna. Se metaboliza fundamentalmente en el hígado, y sus metabolitos se eliminan por la orina. Su principal metabolito es la 6-sulfatoximelatonina, que puede encontrarse en sangre y en orina. En el cerebro la melatonina es oxidada a N1-acetil-N2-formil-5-metoxitriptamina, la cual es desmetilada a N1-acetil-5-metoxikinuramina y eliminada por la orina (Poza *et al.*, 2018).

Los mecanismos de acción de la melatonina son muy diversos, aunque fundamentalmente se pueden resumir en cuatro tipos:

1. Unión a receptores MT1 y MT2: El receptor MT1 está presente en prácticamente todos los tejidos del organismo, mientras que MT2 está más restringido. Son receptores acoplados a proteína G en la membrana.

2. Por su carácter lipofílico: Gracias a ello puede entrar fácilmente en la célula, llegando hasta el núcleo, habiéndose descrito receptores nucleares para la melatonina del tipo RZR/ROR.

3. Unión a proteínas citosólicas: Entre ellas se encuentran la calmodulina, PKC y MT3 (quinona reductasa 2)

4. Neutralización de radicales libres: Atrapa y neutraliza los hidroxilos libres.

En cuanto a las señales de transducción, la melatonina, en general, induce las siguientes vías de señalización al interaccionar con los diferentes receptores

- MT1. Inhibición de la actividad adenilato ciclasa (reducción de la formación de AMPc, de la activación de la proteína quinasa A y de la fosforilación del factor de transcripción CREB) y activación de la fosfolipasa C.

- MT2. Producción de fosfoinosítidos, inhibición de adenilato ciclasa, e inhibición de la vía de la guanilato ciclasa.

- MT3, o quinona reductasa 2. Ésta participa en el efecto protector frente al estrés oxidativo de la melatonina, previniendo las reacciones de transferencia de electrones de las quinonas (Argüelles y Bonmatí, 2015).

Funciones.

En 1958 fue aislada e identificada por Lerner y su equipo en el tejido de la glándula pineal bovina. La primera función de la melatonina que describieron consistía en aclarar la piel de los renacuajos (de ahí su nombre “melatonina”, ya que contraía los melanóforos de la piel de los anfibios) (Illnait, 2012; Argüelles y Bonmaty, 2015). Sin embargo, con el paso del tiempo se le han ido atribuyendo diversas funciones, en primer lugar, el de ser una hormona encargada de regular el ritmo circadiano, asimismo, el de actuar en favor del sistema inmunitario ya que aumenta la secreción de células natural killer (NK) y monocitos (es decir, activa la inmunidad no específica) (Ventoso 2017), además de participar en la modulación del citoesqueleto, tener una actividad oncostática y antioxidante, entre otras (Reyes *et al.*, 2009).

En la reproducción juega un papel sumamente importante en los animales de ciclos reproductivos estacionales, es decir, existen especies tales como los ovinos y caprinos los cuales se dice tienen un fotoperiodo negativo, esto significa que a menos horas luz, mayor es la actividad reproductiva, lo cual se traduce en un incremento de la melatonina en los días altamente reproductivos.

Además, en mujeres y cerdas está comprobado que la melatonina se produce en el ovario y ayuda en la maduración folicular y la preservación del ovocito antes y durante la ovulación. Asimismo en los espermatozoides ofrece protección frente al daño oxidativo preservando su viabilidad (Macedo, 2017).

JUSTIFICACIÓN

Gracias a los desarrollos tecnológicos en la biomedicina el empleo del cerdo, en sustitución de los roedores, como animal “modelo” por su mayor tamaño y sus características fisiológicas más cercanas a la especie humana, está incrementando la demanda de embriones porcinos para ser incluidos en distintos programas de tecnología transgénica y con ello, en un futuro, aumentar las posibilidades de una mejora en la calidad de vida para los seres humanos.

De igual forma, la producción *in vitro* efectiva de embriones porcinos nos permitiría obtener no sólo material para aplicaciones genéticas, sino también descubrir información sobre los mecanismos básicos de la fecundación y el desarrollo embrionario.

Asimismo, en cuanto a la técnica de FIV, se crearía un precedente para obtener un mayor porcentaje en la maduración de ovocitos y el desarrollo embrionario, pudiendo aportar otro punto de vista en cuanto a la suplementación de los medios de cultivo. En este caso usando la melatonina como coadyuvante, la cual, además de ser una sustancia más económica y accesible, tendría una mayor utilidad a lo largo de todo el proceso de FIV en comparación a otro tipo de hormonas que son relevantes únicamente en la primera parte del procedimiento (la maduración).

Además, algunos laboratorios dedicados a la FIV en humanos, tienen como protocolo el de suministrar vía oral la melatonina para así obtener óvulos de mejor calidad, sin embargo, esto suele causar desbalances hormonales a las mujeres, por lo tanto, al usar la melatonina directamente en los medios tanto de maduración como de desarrollo embrionario podríamos evitar los efectos secundarios que crea esta hormona directamente en los pacientes.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de melatonina (0, 1, 3 y 5 μM) en la maduración de COC y en el desarrollo de embriones de cerdo producidos *in vitro*.

Objetivos particulares

- Obtener los porcentajes de maduración *in vitro* hasta metafase II en los COC de cerda suplementando el medio de cultivo con concentraciones de 0, 1, 3 y 5 μM de melatonina.
- Obtener los porcentajes de viabilidad de los COC expuestos a 0, 1, 3 y 5 μM de melatonina.
- Evaluar la morfología embrionaria para predecir la calidad de los embriones de cerdo producidos *in vitro* expuestos a 0, 1, 3 y 5 μM de melatonina.
- Comparar los porcentajes de desarrollo embrionario *in vitro* en embriones en segmentación, mórulas y blastocistos de cerdo expuestos a 0, 1, 3 y 5 μM de melatonina.

HIPÓTESIS

Al suplementar los medios de maduración y de desarrollo embrionario *in vitro* con concentraciones crecientes de melatonina, mejorará la calidad de los COC y embriones de cerdo, lo cual se verá reflejado en un aumento en los porcentajes de maduración y desarrollo embrionario.

METODOLOGÍA

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Reproducción Animal (L2) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

De acuerdo a los objetivos planteados, la investigación fue dividida en dos etapas.

Primera etapa

En esta parte se tuvo como objetivo evaluar los COC hasta la etapa de maduración *in vitro* y su viabilidad.

Colección de ovarios

Los ovarios fueron obtenidos de cerdas pre púberes recién sacrificadas del rastro TIF 194, San Lorenzo, Estado de México. Posteriormente fueron colocados en un contenedor térmico que contenía solución salina fisiológica (SSF) al 0.9% (Cloruro de Sodio [NaCl]) a 38°C y transportados al laboratorio en menos de dos horas.

Obtención de complejo-ovocito-cúmulo (COC).

Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados 2 veces con SSF 0.9% a 38°C. Posteriormente fueron depositados en una charola de disección (Figura 5) y trabajados dentro de la campana de flujo laminar (TELSTAR-AV 30/70).

Los COC fueron obtenidos por aspiración del líquido folicular de folículos de 3 a 8 mm con una jeringa de 10 ml sin caucho en el émbolo (Norm-Ject®) y con una aguja de 18 g (SensiMedical®), el líquido folicular se depositó en tubos cónicos de 50 ml (SPL) previamente cubiertos con papel aluminio para protegerlos de la luz. Posteriormente, el líquido folicular se dejó sedimentar por 20 minutos dentro de una incubadora automática (SANYO MCO18AIC) a 38.5°C y una atmósfera de 5% de CO₂ y humedad al 100%. Trascurrido el tiempo se retiró el sobrenadante y se realizó un primer lavado con 3 ml de medio TL-HEPES-PVA (In Vitro), se dejó sedimentar durante 15 minutos adicionales, se retiró el sobrenadante y se realizó un segundo lavado en las mismas condiciones antes mencionadas, repitiendo una vez más (Figura 6) .



Figura 5. Ovarios de cerda en fresco obtenidos de rastro (Foto propia, tomada en el laboratorio 2 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), FESC, UNAM, 2023).



Figura 6. Líquido folicular dentro de tubo cónico de 50 ml (Foto propia, tomada en el laboratorio 2 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), FESC, UNAM, 2023).

La pastilla obtenida, fue colocada en una caja de Petri de 10x10 (BD), con ayuda de un microscopio estereoscópico (Leica) se seleccionaron los COC de calidad 1 y 2, según la clasificación de De Loos *et al.* (1989).

Maduración *in vitro*.

Los COC fueron lavados 3 veces en gotas de 500 μ l de medio de maduración TCM-199 con bicarbonato y sales de Earle (In Vitro) y depositados al azar en cajas de 4 pozos (NUNC), las cuales previamente fueron preparadas como se menciona a continuación.

Para ésta etapa se contó con 4 grupos experimentales: Grupo control (GC), el cual contiene 500 μ l de medio de maduración y 0 μ M de MLT. Grupo experimental 1 (GE1) con 500 μ l de medio de maduración y 1 μ M de MLT. Grupo experimental 2 (GE2), con 500 μ l de medio de maduración y 3 μ M de MLT y por último el grupo

experimental 3 (GE3) con 500 µl de medio de maduración y 5 µM de MLT. Todos los pozos fueron cubiertos con 200 µl de aceite mineral (SIGMA-ALDRICH) para evitar la deshidratación. La maduración *in vitro* se llevó a cabo en un ambiente de 38.5°C, con una atmósfera de 5% de CO₂ y humedad al 100% durante 44 horas.

Fijación para técnica de aceto-orceína (Maduración)

Después de la maduración *in vitro*, los COC fueron desnudados utilizando un agitador Vórtex análogo (Scientific Industries), para ello los COC de cada grupo fueron colocados en tubos cónicos de 15 ml (SPL-Life Sciences) con 1 ml de solución TL-HEPES-PVA a temperatura ambiente. Los tubos cónicos con los COC fueron colocados en el agitador vórtex durante 90 segundos a velocidad máxima. Una vez transcurrido el tiempo, los COC ya desnudados fueron colocados en cajas de Petri de 5x5 cm (BD). Se observaron debajo del microscopio estereoscópico (Leica) para poder recuperar los COC ya sin ninguna célula de la granulosa adherida.

Para observar el grado de maduración de los COC expuestos a diferentes concentraciones de MLT se utilizó la tinción de aceto-orceína al 1%. Aproximadamente 20 COC de cada grupo fueron colocados en un portaobjetos (LAUKA) con una gota de medio TL-HEPES-PVA y fueron cubiertos con un cubreobjetos (VELAB) mismo que en cada esquina tenía una mezcla de parafina y cera en proporción 3:1 la cual fungía como pegamento.

Los COC prensados fueron sumergidos en una solución de ácido acético glacial (JT Baker) y etanol (HIGH PURITY) a una proporción de 1:3 durante 48 horas, dentro de una campana de extracción.

Posteriormente los portaobjetos fueron secados por el reverso con papel absorbente y colocados en el microscopio óptico con el objetivo de 4x (Leica DM 1000 LED) para teñir los ovocitos con orceína al 1% (SIGMA-ALDRICH). A continuación se realizó con una solución de enjuague que contenía agua, ácido acético glacial y etanol a una proporción 3:1:1, y se deja reposar por 3 minutos, una vez transcurrido el tiempo se procedió a hacer el análisis de maduración.

Los ovocitos se clasificaron en cuatro categorías; vesícula germinal (VG), metafase I (MI), metafase II (MII) e indefinidos.

Tinción Azul Tripán (Viabilidad)

En esta etapa fueron denudados de 10 a 15 COC de cada grupo, utilizando el mismo procedimiento antes mencionado.

Posteriormente en una caja de Petri de 10x10 cm (BD) los ovocitos fueron colocados en una gota que contenía 10 µl de tinción azul tripán y 100 µl de medio de maduración (TCM-199) a 38°C, durante 5 minutos. Posteriormente, los ovocitos fueron lavados en una gota de medio de maduración durante 1 minuto.

Los ovocitos fueron colocados en un portaobjetos cubierto con un cubreobjetos y se observaron bajo un microscopio óptico (LEICA) a 10x y 20x.

Los ovocitos no viables presentaron una coloración azul en todas las estructuras mientras que los ovocitos viables mostraron un citoplasma traslúcido y la zona pelúcida presentó una ligera coloración azul.

Segunda parte

Una vez que se finalizó el análisis de la maduración *in vitro* en COC se llevó a cabo el trabajo hasta desarrollo embrionario. Para este fin, la primera parte hasta maduración del ovocito se llevó a cabo de la misma forma como fue descrita líneas arriba.

Fecundación *in vitro*

Transcurridas las 44 horas de maduración *in vitro*, los COC fueron denudados de forma mecánica utilizando una micropipeta eppendorf de 200 µl (GILSON). Posteriormente los COC fueron colocados en cajas de 4 pozos (una caja por tratamiento) con 500 µl de medio de fertilización (Medio mTBM) (In Vitro) adicionado con albúmina de suero bovino sin ácidos grasos al 4% (SIGMA-ALDRICH) y cubiertos por 200 µl de aceite mineral. Cabe señalar que para la fertilización *in vitro* el medio de fertilización no fue suplementado con melatonina.

Preparación del semen.

El semen fue adquirido del Centro Genético Porcino A.C., en el centro Ganadero de Cuautitlán Izcalli y conservado por 2 días a una temperatura promedio de 17°C.

La calidad de semen fue analizada por medio de la motilidad progresiva que presentaron los espermatozoides. Para ello, en una laminilla se colocó una gota de 10 µL de semen refrigerado previamente atemperado a 38°C utilizando un baño termostático. Con el microscopio óptico a 10X se obtuvo el porcentaje de motilidad progresiva. La muestra era utilizada sólo si presentaba el 60% o más de motilidad progresiva.

Posteriormente, en un tubo cónico de 15 ml se colocó 1 ml de semen y 1 ml de medio Sperm (In Vitro) y fue centrifugado a 700 gravedades por 20 minutos. Una vez finalizada la centrifugación se desechó el sobrenadante y la pastilla fue colocada en un tubo de vidrio de 5ml con medio de fertilización atemperado (In Vitro).

Para conocer la concentración espermática de la muestra se utilizó una cámara de Neubauer (Hausser Scientific). Se realizaron los conteos y por medio de una fórmula matemática se obtuvo el número de µl necesario para realizar la inseminación a una concentración de 1×10^6 espermatozoides/ ml.

La coincubación espermatozoides y COC se llevó a cabo durante 7 horas a una temperatura de 38.5°C, una atmósfera con 5% de CO₂ y humedad a saturación.

Desarrollo embrionario

Después de 7 horas de co-incubación entre espermatozoides y ovocitos, los posibles cigotos fueron colocados en medio de desarrollo NCSU (IN VITRO) suplementado con albúmina de suero bovino con ácidos grasos al 4% fracción V (SIGMA-ALDRICH) y melatonina, teniendo 4 grupos de estudio; Grupo control (GC) con 500 µl de medio de desarrollo y 0 µM de melatonina; Grupo experimental 1 (GE1) con 500 µl de medio de desarrollo y 1µM de MLT; Grupo experimental 2 (GE2) con 500 µl de medio de desarrollo y 3 µM de MLT y por último el grupo experimental

3 (GE3) con 500 µl de medio de desarrollo 5 µM de MLT. Todos los pozos fueron cubiertos con 200 µl de aceite mineral (IN VITRO).

El desarrollo embrionario *in vitro* se llevó a cabo en una temperatura de 38.5°C, con una atmosfera de 5% de CO₂ y 95% de aire y humedad al 100% durante 8 días

Evaluación del desarrollo embrionario *in vitro*.

Transcurridos los 8 días, los embriones fueron evaluados morfológicamente. Para considerar que un embrión fuera viable y de buena calidad, se verificó que el estadio de desarrollo correspondiera con el día de cultivo. Además, que la zona pelúcida estuviera intacta y que el citoplasma de cada blastómero fuera homogéneo. Con esto se obtuvieron los porcentajes de desarrollo embrionario en los estadios de segmentación (2,4,8 y 16 blastómeros), mórula y blastocistos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS v15.0 (2006, Chicago, USA)

Los datos fueron analizados mediante ANOVA y prueba de Tukey, las cuales ayudan a comparar la varianza entre las medias de diferentes grupos y, de ser el caso, comparar entre éstos las medias que difieren. Previamente, los datos fueron transformados al arcoseno para normalizarlos.

Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar de la media. El nivel de significancia fue establecido en $P < 0.05$.

RESULTADOS

Para evaluar el efecto de las 4 diferentes concentraciones de MLT utilizadas (0, 1, 3 y 5 μ M) durante la maduración, se llevaron a cabo 6 réplicas (n=1142 COC).

Los ovocitos en la etapa de maduración fueron clasificados de la siguiente forma:

- **Vesícula germinal:** Ovocitos con citoplasma homogéneo, zona pelúcida completa y homogénea y núcleo visible, redondeado y aumentado de tamaño, además de ser granuloso y estar posicionado en el centro (o más cerca de él) del citoplasma (Figura 7 A).
- **Metafase I:** Ovocitos con citoplasma homogéneo, zona pelúcida completa y homogénea y núcleo visible, redondeado, ligeramente aumentado de tamaño, granular y desplazado hacia la periferia sin llegar a tocar la membrana plasmática (Figura 7 B).
- **Metafase II:** Ovocitos con citoplasma homogéneo, zona pelúcida completa y homogénea y núcleo visible, compacto y desplazado hacia la periferia, puede o no estar en contacto con la membrana plasmática y se observa el primer cuerpo polar dentro o fuera de la membrana plasmática (en el espacio perivitelino) (Figura 7 C).
- **Ovocitos indefinidos:** Ovocitos con células de la granulosa adheridas a la superficie del ovocito que impiden observar el núcleo y citoplasma del

ovocito, ovocitos rotos, con el citoplasma y/o membrana plasmática y/o zona pelúcida rotos que no permiten observar el núcleo o sus características.

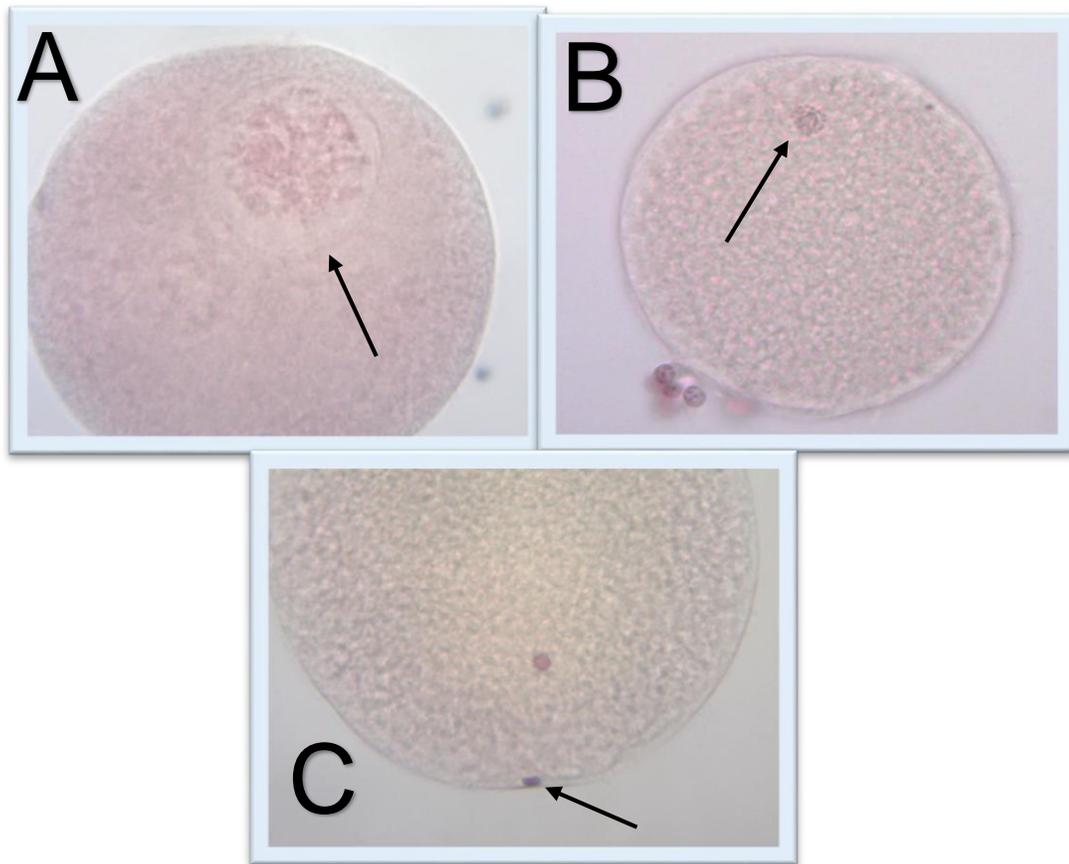


Figura 7. Ovocitos en diferentes etapas de maduración. Tinción de aceto-orceína al 1%.

A) Ovocito en vesícula germinal. 40x. La flecha señala el núcleo del ovocito en proceso de maduración.

B) Ovocito en metafase I. 20x. La flecha de color negro indica el núcleo del ovocito desplazado ligeramente a la periferia del citoplasma. La flecha de color azul indica el núcleo de las células de la granulosa.

C) Ovocito en Metafase II con cuerpo polar. 40x. La flecha señala el primer cuerpo polar, signo de maduración del ovocito.

(Foto propia, tomada en el laboratorio 2 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), FESC, UNAM, 2023).

En la tabla 1 se muestran los porcentajes de maduración *in vitro* de COC expuestos a las diferentes concentraciones (0, 1, 3 y 5 μM) de MLT y tal como lo podemos observar, estadísticamente, no se obtuvieron diferencias significativas en ninguna de las variables examinadas ($p < 0.05$) entre los diferentes tratamientos.

Tabla 1. Porcentaje de maduración *in vitro* de COC de cerdas expuestos a diferentes concentraciones de MLT.

GRUPO	n	VG	MI	MII	INDEFINIDOS
GC 0 μM	269	8.7 \pm 1.72	29.8 \pm 2.58	34.5 \pm 2.46	26.8 \pm 5.62
GE1 1 μM	289	6.2 \pm 1.25	33.7 \pm 1.98	45.9 \pm 5.70	14 \pm 5.18
GE2 3 μM	306	8.6 \pm 1.22	35.2 \pm 1.73	40.7 \pm 4.7	15.2 \pm 3.10
GE3 5 μM	278	10.3 \pm 2.60	29.5 \pm 4.41	43.7 \pm 6.46	16.3 \pm 6.78

n= Número de COC analizados por grupo.

VG= Vesícula germinal, MI= Metafase I, MII= Metafase II.

Los valores son expresados como media \pm error estándar. No se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos.

En el caso de la viabilidad, los resultados fueron obtenidos después de 7 réplicas (n=365 ovocitos).

Para esta etapa, los ovocitos, se clasificaron en los siguientes dos grupos:

- **Ovocitos no viables:** Ovocitos que al estar en contacto con la tinción Azul Tripán su citoplasma fue teñido por completo debido al daño en la membrana plasmática (Figura 8 A).
- **Ovocitos viables:** Ovocitos que al estar en contacto con la tinción Azul Tripán su citoplasma no era teñido, ya que el colorante no penetró considerando una membrana plasmática intacta. (Figura 8 B).

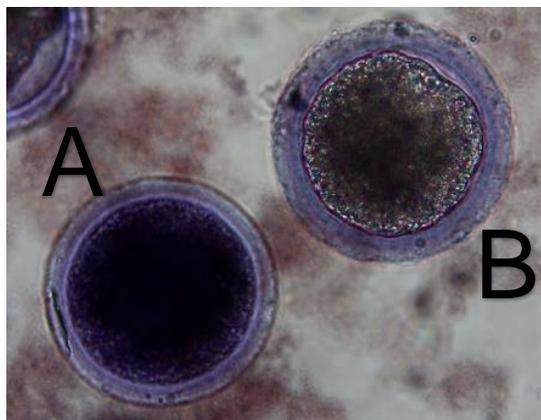


Figura 8. Ovocitos teñidos con azul tripán después de 44 horas de maduración. Objetivo 10x. A. Ovocito no viable. B. Ovocito viable. (Foto propia, tomada en el laboratorio 2 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), FESC, UNAM, 2023).

La tabla 2 muestra los resultados en los porcentajes de viabilidad, en donde no se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos con el uso de la MLT a diferentes concentraciones.

Tabla 2. Porcentaje de viabilidad en ovocitos de cerda expuestos a diferentes concentraciones de MLT.		
Grupo	N	Porcentaje de viabilidad
GC (0 μM)	87	85.4 \pm 4.02
GE1 (1 μM)	95	80.9 \pm 4.94
GE2 (3 μM)	87	84.4 \pm 4.43
GE3 (5 μM)	96	85.0 \pm 4.0

n= Número de COC incubados por grupo.

Los valores están expresados como media \pm error estándar. No se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes tratamientos.

Para la segunda etapa de la investigación, que consistió en exponer a los embriones a diferentes concentraciones de MLT (0, 1, 3 y 5 μM) durante 7 días, se realizaron 6 réplicas (N= 1312 embriones), y se obtuvieron los porcentajes de desarrollo embrionario *in vitro*.

Los estadios que se pueden encontrar a lo largo del desarrollo embrionario son:

- **Ovocitos no fertilizados y degenerados:** Ovocitos que no lograron ser fertilizados por los espermatozoides, comúnmente están rodeados de éstos últimos (Figura 9 A).
- **Mórulas tempranas:** Embriones que constan de diferente número de blastómeros y un citoplasma homogéneo. Los blastómeros deben ser del mismo tamaño entre ellos y la zona pelúcida permanece intacta. Estos embriones son comúnmente encontrados en los primeros días (2-5 días aproximadamente) después de la fertilización *in vitro*, encontrarlos en días posteriores indica que se quedaron detenidos en esa fase y que posiblemente no son viables (Figura 9 B).
- **Mórulas tardías:** Embriones donde los blastómeros no pueden ser contados a simple vista, ocupan la mayor cantidad en el espacio citoplasmático y cuentan con una zona pelúcida transparente, homogénea e intacta.
- **Blastocistos:** Embriones cuyos blastómeros son más compactos. Existen dos tipos de blastocistos; los tempranos (figura 9 C) cuyos blastómeros comienzan a agruparse pero que aún están ocupando la mayor parte del espacio citoplasmático; y los tardíos, donde se puede observar con más detalle el grupo de blastómeros que dará paso a la masa celular interna.

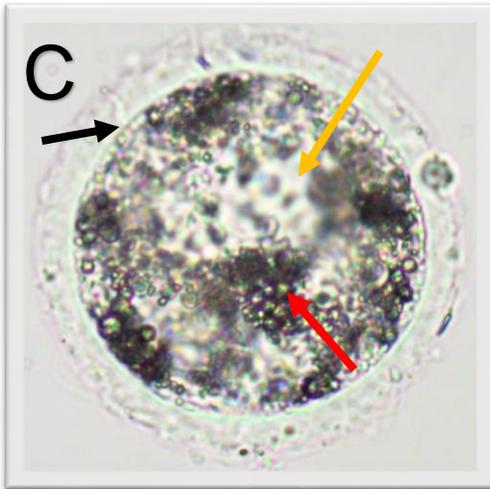
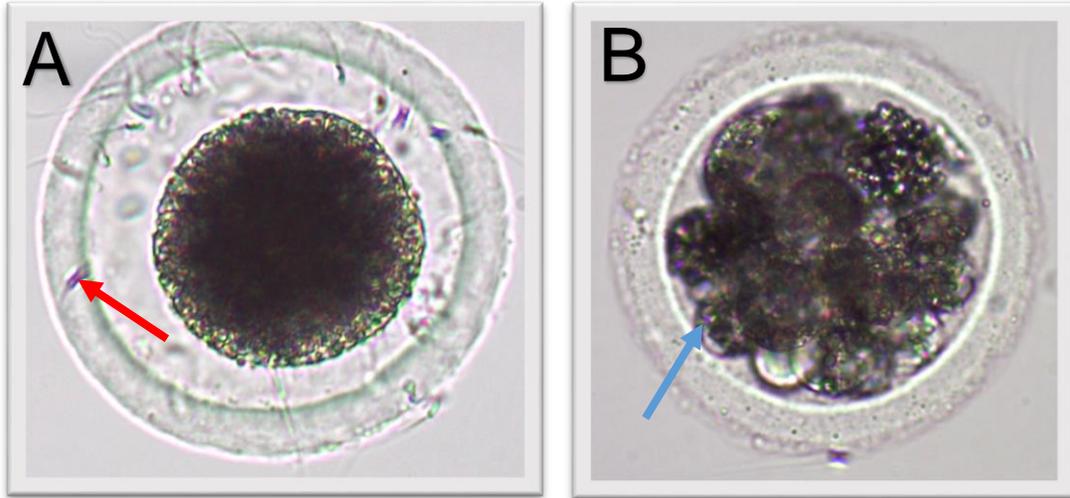


Figura 9. Ovocito no fertilizado y diferentes estadios embrionarios en cerdo. 20x.
 A. Ovocito no fertilizado. La flecha roja señala la cabeza de un espermatozoide que no logró fecundar al ovocito.
 B. Mórula temprana. La flecha azul señala a uno de los blastómeros del embrión.
 C. Blastocisto temprano: La flecha negra señala la línea de células del trofoblasto. La flecha naranja señala el espacio que formará el blastocele. La flecha roja señala el conjunto de células que dará paso a la masa celular interna. (Foto propia, tomada en el laboratorio 2 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), FESC, UNAM, 2023).

En la etapa de desarrollo embrionario, en donde cada grupo fue suplementado con las diferentes concentraciones de MLT, el porcentaje de embriones que llegaron hasta blastocisto y mórulas no fueron diferentes significativamente ($p < 0.05$), tal como se muestra a continuación en la tabla 3.

Tabla 3. Porcentaje de fertilización y desarrollo embrionario en posibles cigotos de cerdo expuestos a diferentes concentraciones de MLT.

Grupo	Segmentación	Mórulas	Blastocitos
GC (0 µM) n=336	17.7 ± 4.53	16.6 ± 6.37	14.4 ± 2.33
GE1 (1µM) n=340	12.1 ± 4.03	16.7 ± 4.36	26.9 ± 9.57
GE2 (3 µM) n=316	18.8 ± 4.53	11.9 ± 2.21	21.2 ± 4.43
GE3 (5 µM) n=320	7.9 ± 3.92	11.5 ± 2.52	15.9 ± 3.11

n= Número de COC incubados por grupo.

Los valores están expresados en promedio ± error estándar. No se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos suplementados con diferentes concentraciones de MLT.

DISCUSIÓN

La producción de embriones mediante FIV puede ofrecer una gran ayuda a los programas de mejora y conservación del patrimonio genético, al permitir la utilización de gametos que, de otro modo, serían inviables (Gadea *et al.*, 1998).

En la ganadería y la medicina veterinaria, la industria porcina es considerablemente importante, siendo la gestión de la productividad de los cerdos un aspecto clave en esta última categoría (Dongjin *et al.*, 2023). Además, los cerdos producidos *in vitro* también pueden servir como donantes de órganos adecuados en la medicina regenerativa y los modelos de enfermedades humanas debido a las similitudes genéticas, anatómicas y fisiológicas entre ellos y los humanos (Hryhorowicz *et al.*, 2017).

Sin embargo, se sabe que el micro ambiente en el que se encuentran incubados tanto los COC como los embriones de cualquier especie, puede ser afectado debido a la presencia de múltiples factores estresantes no fisiológicos, uno de los ejemplos más comunes es el de la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Brown *et al.*, 2017). Por lo tanto, para tratar de contrarrestar este tipo de efectos adversos, diversos autores sugieren la adición de sustancias antioxidantes para que los daños causados por los ROS disminuyan.

Como se ha demostrado, la melatonina, además de ser una hormona esencial para la regulación del ritmo circadiano y circanual, ésta ha sido descrita en diversos trabajos por sus funciones como captador directo de radicales libres, es decir, como antioxidante (De Teresa *et al.*, 2008, Medrano *et al.*, 2017, Martínez 2020).

Aunque la melatonina se describió por primera vez como una hormona secretada por la glándula pineal (Illnait, 2012), se tiene registro de que ésta hormona es producida en diversos órganos, tal es el caso del ovario, en donde ayuda en la maduración folicular y la preservación del ovocito antes y durante la ovulación (Macedo, 2017).

Shi y colaboradores (2009) realizaron un estudio para conocer las concentraciones de melatonina dentro de los folículos de cerda, para lo cual clasificaron los folículos

en 3 grupos según el diámetro folicular, los folículos más pequeños (3 mm) tuvieron un promedio de 20 pg/ml, los folículos medianos (4-8 mm), tuvieron un promedio de 11 pg/ml de MLT y los folículos más grandes (>8mm) tuvieron concentraciones promedio de 10 pg/ml de MLT.

Gracias a la información anterior y tomando en cuenta que la MLT es necesaria para la maduración del COC, en el presente trabajo se investigaron los posibles efectos de la melatonina a las concentraciones de 0, 1, 3 y 5 μM , en las etapas de maduración *in vitro* del COC y durante el desarrollo embrionario *in vitro*, ya que sabemos que son fases cruciales si el objetivo final es el de obtener embriones de buena calidad.

Zhao y colaboradores (2022), mencionan que en cerdos, la capacidad de desarrollo de los embriones depende principalmente de la calidad de los COC. Por lo tanto, la menor tasa de desarrollo de los COC derivados de la maduración *in vitro* indica que habrá una menor tasa de blastocistos desarrollados. Por lo anterior, en ésta investigación sólo fueron seleccionados los COC de mejor calidad, de acuerdo a la clasificación De Loos *et al.* (1989).

Sin embargo, las concentraciones utilizadas en el presente trabajo han demostrado no tener ningún efecto significativo con respecto al porcentaje de maduración del ovocito, tal como lo indican Takada *et al.*, (2010), Pirela *et al.* (2017), y Méndez *et al.*, (2020), respectivamente, quienes, aún adicionando cantidades menores de melatonina (0.01 μM) en sus experimentos sobre la maduración *in vitro* y la tasa de escisión de embriones bovinos no obtuvieron resultados significativos. Si bien, bovinos y cerdos no son la misma especie, la melatonina está presente en ambos mamíferos (así como en algunos otros como los equinos, ovinos y caprinos, etc.) de forma natural como una de las hormonas reguladoras de la GnRH (Gigli *et al.*, 2006) por lo tanto, se cree que su uso dentro de la FIV formaría parte importante dentro de la mejora en el aumento de la maduración del COC principalmente.

En cambio, un experimento realizado con ovocitos de ovejas por Casao y colaboradores (2010), demostraron que adicionando al medio de maduración una concentración igual (10^{-6} M) al GE1 de la presente investigación, obtuvieron un

mayor porcentaje de maduración con respecto a su grupo control (82.5% vs 73.7%), siendo 45.9% de maduración el porcentaje obtenido en nuestra investigación. Sin embargo, en esa misma investigación, los autores mencionan que una cantidad más alta de melatonina en el medio de maduración (10^{-5}M) no tuvo ninguna diferencia significativa entre tratamientos. Además, Soto (2019), reitera que el efecto de la adición de la melatonina al medio de maduración es positivo, tal como lo mencionó Casao, sin embargo, Soto en su experimento con la especie ovina, adicionó una concentración más baja de melatonina (10^{-7}M) en donde se pudo observar su efecto hasta el desarrollo embrionario, pues obtuvieron un mayor porcentaje de embriones que llegaron a dividirse hasta la etapa de blastocisto con respecto al grupo control (28.9% vs. 11.7%). A diferencia de lo que hicieron Casao y Soto, en este trabajo evaluamos el porcentaje de maduración, antes de realizar la fertilización y el desarrollo embrionario.

En cuanto a la especie porcina, estudios realizados por Shi *et al.* (2009) y Do *et al.* (2015), tuvieron diferencias significativas en la tasa de blastocistos al adicionar a los medios de maduración y fertilización MLT. En el primer caso, el mayor porcentaje de blastocistos obtenidos fue con la concentración de 10^{-9}M de MLT adicionada tanto en el medio de maduración como en el de fertilización, con respecto al grupo control ($34 \pm 6.2\%$ vs $19 \pm 2.2\%$). Mientras que Do y colaboradores (2015), al agregar 10^{-11}M de MLT al medio de maduración obtuvieron un porcentaje de 10.7% de blastocistos contra 4.2% de blastocistos en el grupo control (con ausencia de melatonina). Si bien, en la presente investigación no se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos, al utilizar la concentración de $1 \mu\text{M}$ (10^{-6}M) obtuvimos el mayor porcentaje de blastocistos ($26.9 \pm 9.57\%$) el cual es superior con respecto a los datos de Do y colaboradores, sin embargo, hay que tomar en cuenta que dicho autor sólo utilizó la MLT en el medio de maduración, mientras que nosotros la añadimos tanto en el medio de maduración como en el de desarrollo embrionario.

Cabe resaltar que ambos autores (Shi *et al.*, 2009 y Do *et al.*, 2015), obtuvieron embriones partenogénéticos, es decir, no utilizaron la fertilización *in vitro*

convencional, por lo tanto, no tuvieron la variable del estado del espermatozoide, lo cual afectaría directamente el porcentaje del desarrollo embrionario.

Además de lo anterior, en ésta investigación el porcentaje más alto de maduración de los COC fue de 45% y se obtuvo del GE1 en donde el medio de maduración fue adicionado con 1 μM de MLT, siendo un porcentaje muy bajo con respecto al experimento que realizaron Ducolomb y colaboradores (2005), quienes, sin la adición de MLT obtuvieron poco más del 80% de maduración ovocitaria completa. Cabe destacar que en ésta investigación no se usaron ningún otro tipo de hormonas (como LH y FSH) como en el caso del trabajo presentado por Ducolomb, esto con la finalidad de saber si la MLT por si sola podía causar un efecto positivo directo sobre el ovocito (y posteriormente el embrión) sin la adición de alguna otra hormona y así poder evitar el uso de éstas últimas para un mayor aprovechamiento de los recursos.

Con respecto a la viabilidad del ovocito después de la maduración, en la actualidad, no hay estudios en donde, al adicionar MLT, se haya tomado en cuenta ésta variable, y, aunque al realizarlo en ésta investigación, tampoco existió diferencia significativa entre grupos, se sugiere que al tener un porcentaje mayor del 85% de viabilidad dentro de los mismos, la MLT pudo ejercer algún tipo de acción antioxidante o citoprotectora dentro del ovocito para aumentar su viabilidad.

Debido a que la mayoría de los experimentos antes mencionados que obtuvieron una diferencia significativa positiva con la adición de la MLT al medio de maduración, tenían concentraciones de ésta hormona menores a las utilizadas en la presente investigación, podemos sugerir que un aumento en la concentración de melatonina afecta negativamente en la maduración del ovocito.

Lo anterior se puede sustentar ya que probablemente, la MLT, al ser un antioxidante, actuó de manera abrupta disminuyendo por completo (o muy por debajo de las concentraciones fisiológicas) los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que, si tomamos en cuenta lo mencionado por Agarwal y colaboradores en 2005, los ROS a nivel fisiológico tienen un papel en la modulación

de funciones reproductivas fisiológicas, como la maduración de ovocitos, la esteroidogénesis ovárica, la función del cuerpo lúteo y la luteólisis.

Es importante destacar que la melatonina como antioxidante tiene 3 mecanismos de acción en mamíferos los cuales son: unirse directamente a sus receptores (MT1 [expresado en tejido nervioso, órganos como testículo y ovarios, así como en las células del cúmulo de ovocitos], MT2 [se expresa en el núcleo supraquiasmático, hipotálamo, hipófisis, testículos, retina y glándula mamaria] y MT3 [encontrado en hígado, riñón, corazón, tejido adiposo, cerebro y retina]), actuar mediado por la interacción con proteínas intracelulares y el de secuestrar directamente a los radicales libres mediante la donación de electrones (Tan *et al.*, 2002 y Sánchez, 2014).

En el caso de los ratones, al suplementar el medio de desarrollo embrionario con una concentración igual a la utilizada en el GE1 del presente experimento mejoró significativamente el porcentaje de desarrollo hasta blastocisto con respecto al grupo control (17.5 vs 8.8%), sin embargo, con esa misma concentración nuestros resultados fueron mayores (26.9%) en cuanto al porcentaje de blastocistos obtenidos (Ishizuka *et al.*, 2002).

De igual forma, en la producción *in vitro* de embriones caprinos, Chaya en 2016 adicionó a los medios de maduración y desarrollo embrionario *in vitro* una concentración más baja de MLT (10^{-9} M) que las utilizadas en éste experimento, teniendo como resultado un aumento significativo en el porcentaje de blastocistos que fueron incubados con MLT con respecto al grupo control (34,57% vs. 17,39%). Comparando esos datos con los obtenidos en ésta investigación nos damos cuenta que el porcentaje más alto de blastocistos fue del 26.9%, siendo menor que el de dicho autor.

Autores como Currin y colaboradores en 2022, también obtuvieron altas tasas de escisión y de desarrollo embrionario hasta blastocisto en porcinos con respecto a su grupo control (83.2% vs 67%) utilizando una concentración de MLT de 100 nM. Tomando en cuenta que la concentración es 10 veces menor a la concentración más baja utilizada en la presente investigación, se puede suponer que esa haya

sido la razón por la cual obtuvimos un porcentaje más bajo de blastulación al saturar los medios con dicha hormona.

Para finalizar, debemos tomar en cuenta que las células de la granulosa poseen receptores específicos para MLT (Casao, 2011), por lo tanto podríamos pensar que ese sea el mecanismo de acción por el cual actúa dicha hormona en la etapa de maduración, sin embargo, para el caso del desarrollo embrionario al no existir receptores para MLT en las estructuras del embrión, se sugieren dos vías de acción; o bien, actúa la MLT como secuestrador directo de los ROS dentro del medio de desarrollo embrionario, o, ejerce un efecto directo y específico en el interior de la mitocondria, ya que, al ser la mitocondria un organelo captador de MLT, ésta actúa disminuyendo el consumo de oxígeno en la mitocondria, manteniendo el control respiratorio aumentando la actividad de los complejos respiratorios y por lo tanto elevando el ATP disminuyendo con eso el escape de electrones y de producción de O_2 y de H_2O_2 (Acuña *et al.*, 2009) actuando así como un citoprotector mitocondrial, lo cual beneficiaría al embrión directamente. Traspolando la misma información hacia la viabilidad del COC, podemos especular que sea ésta la vía por la cual actuó la MLT y que gracias a ello los porcentajes de viabilidad ovocitaria obtenidos en este trabajo fueron altos.

CONCLUSIONES

Las diferentes concentraciones de MLT utilizadas en ésta investigación (0,1, 3 y 5 μM) no tuvieron ningún efecto al utilizarse como suplemento dentro de los medios durante de las etapas de maduración *in vitro* y el desarrollo embrionario en cerdos.

Sin embargo, no se descarta que el uso de la MLT favorezca a los COC o embriones de cerdo, esto por su potencial acción antioxidante durante cualquiera de las etapas de la FIV. Por lo tanto, es necesario realizar más estudios para conocer la concentración ideal de Melatonina, que permita aumentar los porcentajes de maduración y desarrollo embrionario *in vitro* en cerdos, así como el conocer su función fisiológica en el COC y en el embrión. .

REFERENCIAS

Acuña C.D., Escames G., López L.C., Ortiz F., López A., García J.A. 2009. Evidencias de la utilidad de la melatonina frente al envejecimiento y los procesos neurodegenerativos. *Psicogeriatría*. 1(3): 3-21.

Agarwal A., Gupta S., K Sharma R. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 3(28): 4-20.

Argüelles R., Bonmatí M. A. 2015. Melatonina, la hormona de la noche. *Revista Eubacteria, especial de cronobiología*. 33: 16-21.

Azarmehr N., Porhemat R., Roustaei N., Radmanesh E., Moslemi Z., Vanda R., Barmoudeh Z., Eslamnik P., Hossein A. 2023. Melatonin-Attenuated Oxidative Stress in High-Risk Pregnant Women Receiving Enoxaparin and Aspirin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 202: 1-6.

Biggers JD, Racowsky C. 2002. The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in KSOM(AA) medium: is a two-step protocol necessary? *Reprod Biomed*. 5:133-140.

Brown H., Dunning K., Sutton M., Gilchrist R., Thompson J., Russell D., Failure to Launch: Aberrant cumulus gene expression during oocyte *in vitro* maturation. *Reproduccion*. 153(3). 109-120.

Camargo, O., Ramírez, J., Olivera, M. 1999. Radicales libres y desarrollo embrionario. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 12 (2). 108-118.

Casao A., Abecia JA., Cebrián Pérez JA., Muiño Blanco T., Vázquez MI., Forcada F. 2010. The effects of melatonin on *in vitro* oocyte competence and embryo development in sheep. *Spanish Journal of Agricultural Reserch*. 8(1): 35-41.

Casao A., Pérez P. R., Forcada F., Abecia J.A., Muiño-Blanco T., Cebrián-Pérez J.A. 2011. Inmunolocalización de receptores para melatonina MT1 en células del *cúmulus* ovinas. XIV Jornadas sobre Producción Animal. Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA). Tomo I. 359-361.

Chayaa, A.Y. 2016 *Produção in vitro* de embriões caprinos pré-púberes: efeito da melatonina nos meios de maturação *in vitro* e cultivo *in vitro* embrionário. Tesis de Doctorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Pp. 80.

Colegio Alborada de Coyhaique, Chile, 2011. Disponible en: <https://colegioalboradacoyhaique.cl/wp-content/uploads/2020/03/4.2ME-clase-desarrollo-embrionario-4-medio-electivo.pdf> [Consultado el 11/07/2023]

Córdova I.A., Ruiz L.C.G., Xolalpa Campos V., Córdova J.M., Córdoba J.C.A. 2011. Biotecnologías de Reproducción animal con posibilidad de aplicación para optimizar

el potencial reproductivo y productivo de los animales. Una revisión. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. 5(2): 1-10.

CREBA (Centro de Recerca Experimental Biomédica Aplicada). 2021. ¿Qué aporta el modelo porcino a la investigación biomédica?. Disponible en: <https://www.creballeida.org/es/aporta-modelo-porcino-la-investigacion-biomedica/> [Consultado 22/06/2023]

Currin L., Glanzner W., Gutiérrez K., De Macedo M., Guay V., Baldassarre H., Bordignon V. 2022. Optimizing swine *in vitro* embryo production with growth factor and antioxidant supplementation during oocyte maturation. Theriogenology. 194: 133-143

Dalton C.M., Szabadkai G., Carrol J. 2013. Measurement of ATP in Single Oocytes: Impact of Maturation and Cumulus Cells on Levels and Consumption. Journal of Cellular Physiology. 229. 353-361.

De Loos F., Vliet C., Maurik P., Kruij M. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. Gamete Res. 24. 197-204.

De Teresa Galván C., Guisado Barrilao R., García MC., Ochoa J., Ocaña Wilhelmi J. 2008. Antioxidantes y ejercicio físico: Funciones de la melatonina. Revista Andaluza de Medicina del Deporte. 1(2) 61-72.

Do, LTK., Shibata, Y., Taniguchi, M., Nii, M., Nguyen, TV., Tanihara, F., Takagi, M., Otoi, T. 2015. Melatonin Supplementation During *In Vitro* Maturation and Development Supports the Development of Porcine Embryos. Reproduction in Domestic Animals. 50: 1054-1058.

Dongjin OH., Hyerin Choi., Kim M., Lian C., Joohyeong Lee., Jawad A., Sohee K., Haomiao Z., Gabsang L., Jeon Y., Sang-Hwan. 2023. La interleucina-7 mejora el desarrollo *in vitro* y la calidad del blastocisto en embriones partenogénicos porcinos. Frente. Veterinario. Ciencia. Disponible en: <https://axoncomunicacion.net/la-interleucina-7-mejora-el-desarrollo-in-vitro-y-la-calidad-de-la-blastocisto-en-embriones-partenogeneticos-porcinos/> [Consultado 22/06/2023].

Ducolomb, Y., Romo, S., Balcázar, J., Rodarte, L., Casas, E., Fragoso, G., Sciutto, E., Betancourt, M. 2005. Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos *in vitro*. Técnica Pecuaria en México. 43(3): 425-432.

Fernández, R., Hernández, P., Reyes, F. 2010. Maduración y Fertilización *in vitro* de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos. Revista de Salud Animal 32 (2): 78-83.

Gadea J., Coy P., Poto A., Peinado B., Romar R., Campos I., Zubillaga O. 1998. Fecundación *in vitro* con semen congelado en la especie porcina. Archivos de Zootecnia. 47: 299-304.

Gadea J., García-Vázquez FA. 2010. Aplicaciones de los cerdos transgénicos en biomedicina y producción animal. *Información Técnica Económica Agraria*. 106(1): 30-45.

García M.E., Salvador I., Silvestre M.A. 2005. Producción *in vitro* de embriones de porcino: Problemas y aplicaciones. *Información Técnica Económica Agraria*. Revista de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario. 26 (Tomo I) 395-397.

Gigli I. Russo A., Agüero A. 2006. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *Investigación veterinaria*. 8(1): 183-203.

Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad C.E. Jr, Wall R.J., Bolt D.J., Ebert K.M., Palmiter R.D., Brinster R.L. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*. 315: 680-683

Hryhorowicz M., Zeyland J., Słomski R., Lipiński D. 2017. Cerdos modificados genéticamente como donantes de órganos para xenotrasplante. *Molecular Biotechnology*. 59: 435-44.

Illiniat F. J. 2012. Melatonina: actualidad de una hormona olvidada. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. (En línea) 43:3. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181226874007> [Consultado 20/06/2023]

INAES (Instituto Nacional de la Economía Social). 2018. Porcicultura, una actividad milenaria. Gobierno de México. Disponible en: <https://www.gob.mx/inaes/articulos/porcicultura-una-actividad-milenaria?idiom=es#:~:text=Existen%20dos%20procesos%20paralelos%20de,utilizados%20por%20el%20ser%20humano> [Consultado 22/06/2023]

Ishizuka B., Kuribayashi Y., Murai K., Amemiya A., T. Itoh M. 2000. The effect of melatonin on *in vitro* fertilization and embryo development in mice. *Journal Pineal Research*. 28(1): 48-51.

Jara G. R. 2016. Las funciones de la melatonina. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza. España. Pp.14-19.

Kim E.H., Kim G.A., Taweechaipaisankul A., Lee S.H., Qasim M., Ahn C., Lee B.C. 2019. Melatonin enhances porcine embryo development via the Nrf2/ARE signaling pathway. *Journal of Molecular Endocrinology*. 63:3. 175-185.

Langston-Cox A., Marshall S.A., Lu D., Palmer K.R., Wallace E.M. 2021. Melatonin for the Management of Preeclampsia: A Review. *National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information*. 10(3): 376.

Lorenzo M.S., Tello M.F., Fischman M.L., Claver J., Lombardo D.M. 2015. Comparación de dos técnicas para la obtención de complejos cumulus ovocito porcinos. *Investigación Veterinaria*. 17(1): 25-34.

Macedo M. M. 2017. Papel de la melatonina en el estado oxidativo del líquido folicular y su relación con la calidad de los oocitos en mujeres con problemas de fertilidad. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura. Pp.38-39.

Mancias Andrade O. V. 2020. Producción *in vitro* y transferencia de embriones porcinos: Revisión de Literatura. Tesis licenciatura. Escuela Agrícola Panamericana. Honduras. Pp.8.

Marinona A.L., Kaiser G., Hozbor F., Mucci N. 2018. Biotécnicas reproductivas en la especie porcina: pasado, presente y futuro. Revista de investigaciones agropecuarias. 44 (2). 25-38.

Martínez A.C., Cuello C., Parrilla I., Maside C., Ramis G., Cambra M.J., Vázquez M.J., Martínez R.H., Gil M.A. Martínez A.E. 2022. Exogenous Melatonin in the Culture Medium Does Not Affect the Development of In Vivo-Derived Pig Embryos but Substantially Improves the Quality of *In Vitro*-Produced Embryos. Open Global Trusted, 11(6): 1177

Martínez Madrid B. 2002 Estudio de la fecundación *In vitro* en porcino: Reducción de la poliespermia y optimización de la producción *In vitro* de embriones. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España. Pp. 2-3.

Martínez-Rodríguez JA. 2020. Efecto de la melatonina como antioxidante sobre la criosupervivencia de espermatozoides de perro. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Pp. 18.

Mata-Miranda MM., Vázquez-Zapién GJ. 2018. La fecundación *in vitro*: Louise Brown, a cuatro décadas de su nacimiento. Mediagraphic. 72(5): 363-365.

Medrano A., Contreras CF., Herrera F., Alcantar-Rodriguez A. 2017. Melatonin as an antioxidant preserving sperm from domestic animals. Asian Pacific Journal of Reproduction. 6(6): 241-246.

Méndez M. S., Argudo D. E., Soria M. E., Galarza L. R., Perea F. P., 2020. Effect of the addition of melatonin in the oocyte maturation and/or vitrification medium on *in vitro* production of bovine embryos. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 31(1): 1-6.

Menino A.R., Wright R. W. 1982. Desarrollo de embriones porcinos de una célula en dos sistemas de cultivo. Scielo. 54(8): 583.

Muñoz, M. 2005. Fertilización *in vitro* en cerdos. (Tesis de posgrado en biología molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica). IPICYT. Pp.1-2.

Ogata N., 2019. 1519, Hernán Cortés y el cerdo en México. Diversidad Biológica y Cultural Trópico Americano. Universidad Veracruzana. Disponible en:

http://etnoecologia.uv.mx/diversidad_biocultural/cerdo-pelon-mexicano/
[Consultado 22/06/2023]

Ordóñez León E. A. 2014. Evaluación del desarrollo embrionario y la presencia de lípidos intracitoplasmáticos durante la maduración y desarrollo *in vitro* de embriones bovinos suplementados con 3 fuentes proteicas diferentes. Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 44.

Oviedo N.J., Camejo M.I. 2021 Melatonin: A posible therapeutic agent? *Interciencia*. 26: 103-107.

Páramo M. Melatonina, ¿Qué es? [En línea]. 09-30-2015. Disponible en: <https://www.normon.es/articulo-blog/melatonina-que-es> [Consultado 20/06/2023]

Petters, R. M., Wells, K. D. 1993. Culture of pig embryos. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement, 48: 61–73.

Pirela A. A., Hernández H. J., Osorio C. C., Urdaneta A., Aranguren J., Hernández J. P., Mosquera J., 2017. Efecto de la melatonina sobre la competencia ovocitaria de ovocitos bovinos. *MASKANA, Producción animal*. 8: 129-131.

Poza J.J., Pujol M., Ortega-Albas J.J., Romero O. 2018. Melatonina en los trastornos del sueño. *Neurología*. 38. 575-585.

Redel K.B., Spate D.L., Prather S.R. 2019 *In vitro* Maturation, Fertilization, and Culture of Pigs Oocytes and Embryos. *Methods in Molecular Biology*, book series MIMB. 2006: 93-103.

Reyes P.B.M., Velázquez P.M., Prieto G.B. 2009. Melatonina y neuropatologías. *Revista Facultad de Medicina UNAM*. 52.105-109.

Rogers CS, Abraham WM, Brogden KA, Engelhardt JF, Fisher JT, McCray PB, McLennan G., Meyerholz D., Namati E., Ostedgaard LS., Prather RS., Anthony Stoltz D., Zabner J., Welsh MJ. 2008. The porcine lung as a potential model for cystic fibrosis. *American Journal of Physiology*. 295(2): 240-263.

Romar A.R. 2001. Efecto de las células oviductuales y del *cumulus oophorus* sobre diferentes parámetros biológicos relacionados con la fecundación *in vitro* en la especie porcina. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. pp. 13.

Saacke RG. 2003. Fertilidad del toro: una opinión sobre su estado actual y perspectivas. *Taurus*, Buenos Aires. 5(19):18-28.

SADER 2020. El cerdo, base culinaria en México. Gobierno de México. Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/el-cerdo-base-culinaria-en-mexico>
[Consultado 22/06/2023]

Salgado C.E., Lopera V.R. 2020. Aspectos esenciales sobre las técnicas de fertilización *in vitro* en bovinos. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 31(3). 171.

Sánchez C.M.I. 2014 Efecto de la luz nocturna sobre la gestación y el sistema reproductor de la descendencia. Tesis de maestría. Universidad de Oviedo. Pp 14.

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) 2019. Bases estadísticas porcinas 2009-2019. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos_p.php [Consultado 22/06/2023]

SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2021. Estudio para determinar el Impacto Económico de la PPC en México. Disponible en: https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2021/enero/An%C3%A1lisisSocioecon%C3%B3micoFPC_876a8d25-0d1b-4fa8-94e4-18d59e932257.pdf [Consultado 22/06/2023]

Shi J.M., Tian X., Zhou G.B., Wang L., Gao C., Zhu S.E., Zeng S.M., Tian J.H., Liu G.S. 2009. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves *in vitro* maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. Journal of Pineal Research. 47:318-323.

Soto H.S. 2019. Oocyte competence: Study of melatonin and meiotic inhibitors to improve *in vitro* embryo production in juvenile goats. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Pp:91-93.

Soto M.A., Ramírez E.C., Reyes L.C.A., Salazar G.G., Ledesma A.J., Vega L.M.A. 2019. El cerdo como un modelo traslacional para enfermedades humanas: el asma como ejemplo. Porcicultura. Disponible en: <https://www.porcicultura.com/destacado/%3Cp%3EEI-cerdo-como-un-modelo-traslacional-para-enfermedades-humanas:-el-asma-como-ejemplo%3C%2%B0p%3E> [Consultado 22/06/2023]

Takada L., Martins J.A., Zoccal M.G., Carvalho B.J.C., Alencar C.L. 2010. Melatonin in maturation media fails to improve oocyte maturation, embryo development rates and DNA damage of bovine embryos. Scientia Agricola. 67(4): 393-398.

Tan D.X., Reiter R., Manchester L., Yan M., El-Sawi M., Sainz R. 2002. Chemical and physical properties and potential mecanismos: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. Curr Top Med Chem. 2: 181-197.

Tur R., Martínez F., Arroyo G., Carreras O., Belil I., Coroleu B., Veiga A. 2007. Estado actual de la maduración *in vitro* (MIV). Revista Iberoamericana de Fertilidad. 24(2): 114-115.

Ugalde JR. 2014. Biotecnologías reproductivas para el siglo XXI. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 48(1): 33-34.

Valdés-González RA., Dorantes LM., Garibay G., Bracho-Blanchet E., Mendez J., Dávila-Pérez R. 2005 Xenotransplantation of porcine neonatal islets of Langerhans and Sertoli cells: a 4-year study. *European Journal of Endocrinology*. 153: 419-427

Ventoso B. G. 2017. Nutrición y cáncer: Empleo de la melatonina en terapia nutricional anticancerígena. *Revista 3 Ciencias*. 12: 9-10.

Ward F., Enight B., Rizos D., Boland M., Lonergan P. 2002. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: Effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*. 57: 2105-2117.

Zhao, H., Dong Y., Zhang Y., Wu X., Zhang X., Liang Y., Li Y., Zeng F., Shi, J., Zhou, R. 2022. Supplementation of SDF1 during Pig Oocyte *In Vitro* Maturation Improves Subsequent Embryo Development. *Molecules*. 27(20): 2-17.