



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
REPRODUCCIÓN EQUINA

EFFECTO DE LA MELATONINA DURANTE LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS EQUINOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

PRESENTA

LAURO EMMANUEL CONTRERAS NAVARRO

T.P- ANA MYRIAM BOETA ACOSTA (FMVZ-UNAM)
C.T- HILDA MORAYMA GUERRERO NETRO (FMVZ-UNAM)
ÁNGEL ADRIÁN MUTTO (IIB- INTECH / UNSAM-CONICET)

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD, MX. ABRIL 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dedicatoria

A Dios por permitir que esto ocurriera

A mis padres por apoyar mis sueños

A Ana por su inmensurable apoyo y amor (Te amo)

A Jacob y Job por ser mi inspiración y fuerza (Los amo)

Ana, Jacob y Job ¡Lo logramos mis amores!

MUCHAS GRACIAS

Agradecimientos

A CONACYT-México por brindarme la beca escolar nacional y en el extranjero. A PAEP-UNAM por apoyarme a presentar parte de mis resultados en la reunión anual número 77 de la Sociedad de Biología del Desarrollo efectuada en Portland Oregón USA, cubriendo los gastos de transporte e inscripciones a la reunión. A movilidad para alumnos de posgrado UNAM por permitirme viajar a Buenos Aires Argentina a las Segundas Jornadas Internacionales de Biotecnologías Reproductivas en Equinos.

A mi *alma mater* la UNAM que me cobijó durante esta etapa, ofreciéndome excelentes instalaciones y profesores. A la Universidad de Montreal por financiar parte de la investigación y abrirme las puertas del Centro de Investigación de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria lo que cambiaría mi vida y abriría mi corazón hacia la ciencia. Al Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría que me abrazó durante algunos meses.

A mi tutora principal, la Dra. Ana Myriam Boeta Acosta, que ha impulsado mis sueños y me ha brindado apoyo en todo momento. A los miembros de mi comité tutor, la Dra Hilda Guerrero y el Dr. Adrián Mutto por brindarme su apoyo, consejo y oportunidades de crecimiento previo y durante esta etapa. Esto no hubiese sido posible sin su confianza. Al Dr. Mohamadou Diaw por confiar en este proyecto, buscar financiamiento, brindarme apoyo académico, moral y apoyarme a crecer profesionalmente. Al Dr. Francisco Jiménez Trejo por permitirme trabajar junto a él, por cuestionarme, retarme y demostrarme el valor de la rectitud y responsabilidad, por su amistad. Al Dr. Luis Alberto Zarco Quintero por la revisión de este trabajo y su apoyo en el análisis de datos.

A todos mis compañeros de posgrado y especialmente a Lizet Veloz, Adriana Delgado y Rodrigo Gonzáles.

Resumen

La maduración *in vitro* (MIV) del complejo cúmulo-ovocito (COC) equino continúa siendo un procedimiento de éxito relativamente bajo debido al estrés oxidante y apoptosis que son promovidos por el ambiente *in vitro* en el que se cultiva el COC. Un agente antioxidante y antiapoptótico prominente en el ovario de los mamíferos es la melatonina. Sin embargo, en equinos poco se sabe sobre su rol en el ovario y no se han publicado datos sobre su efecto durante la maduración del COC. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de componentes melatoninérgicos en el folículo equino y evaluar el efecto de la adición de MT al medio de cultivo durante la MIV del COC. A partir de tejido ovárico y células foliculares recuperadas de ovarios de matadero se maduraron COCs en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de melatonina (0, 10, 100 o 1000 ng/ml) durante 10, 20 o 30 h. Se evaluó en el folículo la expresión (qPCR), síntesis (inmunotransferencia) y localización (inmunofluorescencia) de los receptores MT1, MT2 y de la enzima ASMT; Se determinaron los efectos antioxidante, antiapoptótico y sobre la expansión del COC de la melatonina durante la MIV. Para ello se midió la expresión (qPCR) de PRDX2, GSTM3, GLRX BCL2, BAX, AREG, EREG, PTGS2, TNFAIP6, HAS2 y ADAMST1; la producción de H₂O₂ (carboxy-H₂ difluorofluorescein diacetate); la apoptosis (FACS- inmunofluorescencia) y la expansión del cúmulo (estereoscopia). Los resultados indican que las células foliculares sintetizan elementos melatoninérgicos, sugiriendo que la melatonina se sintetiza de manera intrínseca en los folículos, posiblemente desempeñando un rol durante el desarrollo folicular y la maduración del COC. La adición de melatonina a protocolos de MIV de COCs equinos promovió mecanismos de respuesta antioxidante y no alteró la expresión de genes relacionados con la expansión del cúmulo. Además la adición de 10 ng/mL incrementó la supervivencia del COC; por lo que su adición a protocolos de MIV puede ser beneficiosa.

Melatonina, COC, Ovocito, Equino, MIV, ROS, Apoptosis

Abstract

In vitro maturation (IVM) of the equine cumulus-oocyte complex (COC) continues to be a relatively low success procedure due to the oxidative stress and apoptosis promoted by the *in vitro* environment during maturation of the COC. A prominent antioxidant and antiapoptotic agent in the ovaries of mammals is melatonin. However, little is known about its role in the ovary in horses, and no data have been published on its effect during COC maturation. The objective of this work was to determine the presence of melatoninergetic components in the equine follicle and the effects of the addition of MT to the culture medium during IVM of COC. Ovarian tissue and follicular cells were recovered from slaughterhouse ovaries. COCs were matured in culture media supplemented with melatonin (0, 10, 100 or 1000 ng / ml) for 10, 20 or 30 h. The expression (qPCR), synthesis (immunoblot) and location (immunofluorescence) of the receptors MT1, MT2 and the enzyme ASMT were evaluated in the follicle. The antioxidant, antiapoptotic and melatonin cumulus expansion effects on COC during MIV were determined by measuring the expression (qPCR) of PRDX2, GSTM3, GLRX BCL2, BAX, AREG, EREG, PTGS2, TNFAIP6, HAS2 and ADAMST1; the production of H₂O₂ (carboxy-H₂ difluorofluorescein diacetate); apoptosis (FACS-immunofluorescence); and cumulus expansion (stereoscopic microscopy). Results indicate that follicular cells synthesize melatoninergetic elements, suggesting that melatonin is synthesized intrinsically in the follicles, possibly playing a role during follicular development and COC maturation. The addition of melatonin promoted antioxidant response mechanisms and did not alter the expression of genes related to cumulus expansion. Further the addition of 10 ng/mL of melatonin increased COC survival; so that its addition to MIV protocols can be beneficial.

Melatonin, COC, Oocyte, Equine, IVM, ROS, Apoptosis

Contenido (Índice)

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Resumen	iv
Abstract	v
Contenido (Índice)	vi
Lista de Cuadros	ix
Lista de Figuras	ix
Introducción	1
Justificación	2
Objetivo general	3
Objetivos particulares	3
Revisión de literatura	4
Producción <i>in vitro</i> de embriones equinos: <i>Del ovocito al embrión</i>	4
El complejo cúmulo-ovocito	4
Morfología del complejo cúmulo-ovocito.....	4
Clasificación morfológica del complejo cúmulo-ovocito	5
Recuperación del complejo cúmulo-ovocito	6
Aspiración por flanco de folículos maduros.....	6
Aspiración transvaginal (TVA) guiada por ultrasonografía folicular.....	7
Raspado o aspiración folicular de tejido ovárico post mortem	7
Maduración del ovocito	8
Arresto meiótico del ovocito	9
Maduración nuclear; eventos entre la interrupción del primer arresto meiótico y el segundo arresto meiótico.	10
Maduración citoplasmática: modificaciones ultra-estructurales y biológicas del ovocito.	12
Expansión del cúmulo: más que la formación de matriz extracelular.....	13
Maduración <i>in vitro</i> del ovocito: un ambiente lejos del nicho folicular.....	15
Fertilización y activación del desarrollo.....	17
Cultivo embrionario y activación del genoma embrionario	18

Realidades de la producción <i>in vitro</i> de embriones equinos	19
Obstáculos para la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos	19
Melatonina; <i>molécula indispensable en la reproducción</i>	21
Melatonina; <i>molécula con funciones biológica en los mamíferos</i>	21
Melatonina en el ovario	21
Melatonina; <i>favorece la maduración competente del ovocito y la producción de embriones en ambientes in vitro</i>	24
Materiales y Métodos	27
Recolección de tejido ovárico y células foliculares	27
Análisis de la expresión génica.....	28
Identificación de los receptores MT1/MT2 en células de la granulosa, células de la teca y células lúteas por inmunotrasferencia.....	29
Identificación de receptores MT1/MT2 en tejido ovárico por inmunofluorescencia	30
Maduración <i>In Vitro</i>	31
Evaluación de la expansión del cúmulo	32
Evaluación de la producción H ₂ O ₂ por los ovocitos mediante DCHFDA	32
Evaluación de la supervivencia celular y la apoptosis por el ensayo de Annexin V-FICT	33
Evaluación de la apoptosis por inmunofluorescencia de caspasa 3 escindida	33
Análisis estadístico	33
Resultados	35
Expresión de receptores MT1-MT2 y la enzima ASMT en células foliculares.....	35
Síntesis de receptores MT1/MT2 en células de la granulosa, teca y cuerpo lúteo.....	35
Localización de los receptores MT1/MT2 durante el desarrollo folicular, cuerpo hemorrágico y cuerpo lúteo	36
Efecto de la melatonina sobre la expresión de MT1 y MT2 en las CC durante la maduración <i>in vitro</i> del COC.....	38
Efecto de la melatonina en la expresión de genes relacionados con el metabolismo antioxidante en las CC durante la maduración <i>in vitro</i> del COC.....	39
Melatonina reduce la producción de H ₂ O ₂ en los ovocitos durante la maduración <i>in vitro</i> del COC 40	
Efecto de la melatonina sobre la expresión de BAX, BCL2 y proporción BAX:BCL2 en CC durante la maduración <i>in vitro</i> del COC.....	41

Efecto de la melatonina sobre la supervivencia celular y apoptosis en las CC durante la maduración <i>in vitro</i> del COC.....	42
Efecto de la melatonina sobre los niveles de caspasa 3 escindida en los ovocitos durante la maduración <i>in vitro</i> del COC.....	43
Efecto de la melatonina en la expresión de AREG, EREG y genes relacionados con la expansión del cúmulo durante la maduración <i>in vitro</i> del COC	44
Efecto de la melatonina sobre la transición del cúmulo de CP a EX	45
Discusión	46
Conclusión	54
Referencias	55
Anexos	68
1 Manual de maduración <i>in vitro</i> de COCs equinos	68
Materiales.....	68
Métodos	70
2 Efecto de la melatonina sobre la expresión de MT1 y MT2 en las CC durante la maduración <i>in vitro</i> del COC.....	78
3 Efecto de la melatonina en la expresión de genes relacionados con el metabolismo antioxidante en las CC durante la maduración <i>in vitro</i> del COC	79
4 Efecto de la melatonina sobre la expresión de BAX, BCL2 y proporción BAX:BCL2 en CC durante la maduración <i>in vitro</i> del COC	80
5 Efecto de la melatonina sobre la supervivencia celular y apoptosis temprana en las CC durante la maduración <i>in vitro</i> del COC	81
6 Efecto de la melatonina sobre los niveles de caspasa 3 escindida en los ovocitos durante la maduración <i>in vitro</i> del COC.....	82
7 Efecto de la melatonina en la expresión de AREG, EREG y genes relacionados con la expansión del cúmulo durante la maduración <i>in vitro</i> del COC	83

Lista de Cuadros

Cuadro 1 Reportes sobre los efectos de la adición de melatonina a los medios de cultivo de ovocitos y embriones en mamíferos domésticos.....	25
Cuadro 2 Primers usados en el PCR en tiempo real.	28
Cuadro 3 Expresión de ASMT y de los receptores MT1 and MT2 en células foliculares ováricas de la yegua	35

Lista de Figuras

Figura 1 Representación esquemática del folículo equino.	4
Figura 2 Morfología del Complejo Cúmulo-Ovocito COC.	4
Figura 3 Representación gráfica de la clasificación de COCs equinos.	6
Figura 4 Eventos fisiológicos que debe atravesar el ovocito para alcanzar un estado de competencia para el desarrollo embrionario.	8
Figura 5 Modelo representativo del arresto meiótico del ovocito por nucleótidos cíclicos..	9
Figura 6 Modelo representativo de la reanudación de la maduración del ovocito por reducción nucleótidos cíclicos.....	10
Figura 7 Ovocitos con reorganización de organelos..	13
Figura 8 Representación esquemática de la regulación autócrina de AREG y EREG en las CC y la reanudación de la meiosis del ovocito por HA.	14
Figura 9 Representación esquemática de la generación de especies reactivas a oxígeno (ROS) y sus principales acciones perjudiciales en las células.	20
Figura 10 Vista tridimensional de la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina).....	21
Figura 11 Representación esquemática de la síntesis de melatonina a partir del aminoácido triptófano.....	23
Figura 12 Colección de tejido y células ováricas para su posterior procesamiento y evaluación.....	31
Figura 13 Síntesis de los receptores MT1 y MT2.....	36
Figura 14 Localización de los receptores MT1 y MT2 en los folículos, cuerpo hemorrágico y cuerpo lúteo.....	37
Figura 15. Expresión de receptores MT1 y MT2 en células del cúmulo durante la maduración <i>in vitro</i> del COC adicionado con MT.....	38
Figura 16 Expresión de GST M3, PRDX2 en células del cúmulo durante la maduración <i>in vitro</i> del COC adicionado con MT.	39
Figura 17 Producción de H ₂ O ₂ en los ovocitos durante la maduración <i>in vitro</i> del COC adicionado con MT.....	40
Figura 18 Expresión de BAX y BCL2 en células del cúmulo durante la maduración <i>in vitro</i> del COC adicionado con MT.....	41
Figura 19 El efecto de la MT sobre la sobrevivencia y apoptosis de las CC.	42
Figura 20 Niveles de caspasa 3 escindida en ovocitos durante la maduración <i>in vitro</i> del COC adicionado con MT.	43

Figura 21 Expresión de AREG, EREG y genes relacionados con la expansión del cúmulo durante la maduración <i>in vitro</i> del COC adicionado con MT	44
Figura 22 Transición (T) de los cúmulos de CP a EX.....	45
Figura 23 Imagen propuesta de la distribución de la inmunotinción de MT1/MT2 durante el desarrollo folicular.	47
Figura 24 Aproximación esquemática que muestra un posible modelo de regulación autocrina en CC que conduce a la expansión del cúmulo por ligandos similares a EGF.	52
Figura 25. Expresión de receptores MT1 y MT2 en células del cúmulo durante la maduración <i>in vitro</i> del COC adicionado con MT.....	78
Figura 26 Expresión de genes relacionados con el metabolismo antioxidante en células del cúmulo durante la maduración <i>in vitro</i> del COC adicionado con MT	79
Figura 27 Expresión de BAX, BCL2 y la proporción BAX:BCL2 en células del cúmulo durante la maduración <i>in vitro</i> del COC adicionado con MT	80
Figura 28 El efecto de la MT sobre la sobrevivencia y apoptosis de las CC.	81
Figura 29 Niveles de caspasa 3 escindida en ovocitos durante la maduración <i>in vitro</i> del COC adicionado con MT.....	82
Figura 30 Expresión de AREG, EREG y genes relacionados con la expansión del cúmulo durante la maduración <i>in vitro</i> del COC adicionado con MT	84

Introducción

*“El destino no es asunto de casualidad, es una decisión”
-W.J. Bryan*

En las últimas dos décadas, la reproducción asistida en equinos ha tenido progresos notables, sin embargo su eficacia se ve limitada por la dificultad en la maduración de ovocitos *in vitro* y su posterior fertilización (Katrin Hinrichs 2010b; K. Hinrichs 2010; Choi et al. 2013; Carnevale 2016)

Para lograr la maduración, el ovocito debe experimentar cambios nucleares y citoplásmicos, así como una expansión adecuada del cúmulo. La sincronía entre estos cambios es necesaria para la fertilización futura y el desarrollo embrionario posterior (Landim-Alvarenga and Maziero 2014). *In vivo*, la maduración de los ovocitos, la expansión del cúmulo y la expulsión del complejo cúmulo-ovocito (COC) son inducidos por el aumento preovulatorio de los niveles de hormona luteinizante (Procházka et al. 2011). Algunos de los efectos de la elevación preovulatoria de LH son mediados por factores parecidos al factor de crecimiento epidérmico (EGF-L), como la anfiregulina (AREG), la epirregulina (EREG) y la betacelulina (BTC) (Park 2004). En el COC, estos EGF-L estimulan la transcripción de genes implicados en la regulación de la expansión del cúmulo y la reanudación de la meiosis, incluidos el factor de necrosis tumoral alfa inducido por la proteína 6 (TNFAIP6), la prostaglandina endoperóxido sintasa 2 (PTGS2) y la hialuronano sintasa 2 (HAS2) (Ashkenazi et al. 2005; Ben-Ami et al. 2006; Shimada et al. 2006).

Sin embargo el ambiente de maduración *in vitro* (IVM) puede afectar los cambios morfológicos y funcionales mencionados anteriormente debido a la presencia de múltiples factores estresantes no fisiológicos como la producción excesiva de especies reactivas a oxígeno (ROS), como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), aniones súper óxido (O_2^-) y radicales hidroxilo (*OH) (Brown et al. 2017; Virant-Klun et al. 2018; Tamura et al. 2012a). Cabe mencionar que las ROS tienen la capacidad de regular funciones celulares. No obstante, su producción en exceso puede provocar estrés oxidativo en el COC, que al no ser controlado puede dañar a los lípidos de la membrana celular, causando daño mitocondrial y fragmentación del ADN, lo que lleva a la célula a sufrir apoptosis (Tiwari et al. 2015). El proceso de apoptosis es activado por diferentes vías, entre ellas el daño mitocondrial

caracterizado por la acumulación de la proteína de señalización apoptótica BAX, la supresión de BCL2 y la activación de caspasas (Susnow et al. 2009).

In vivo, el estrés oxidativo está regulado por antioxidantes endógenos secretados al fluido folicular por las células de la teca (CT), las células de la granulosa (CG) y las células de cúmulo (CC), creando condiciones óptimas para el desarrollo del COC (Kala, Shaikh, and Nivsarkar 2017; Virant-Klun et al. 2018). Se ha sugerido que la adición de componentes antioxidantes al medio de MIV puede minimizar la producción de ROS y limitar la apoptosis celular (Kang et al. 2009). Un agente antioxidante y antiapoptótico que prevalece en el folículo es la melatonina (MT), una hormona que se sintetiza principalmente en la glándula pineal y participa en numerosas funciones fisiológicas en los mamíferos (Tamura et al. 2012a). Los efectos de la MT incluyen el secuestro de radicales libres de manera directa, la estimulación de enzimas antioxidantes y la activación de receptores de membrana específicos MT1 y MT2 (Dubocovich y Markowska 2005; Cruz et al. 2014).

La importancia de la MT en el desarrollo folicular y maduración del ovocito *in vivo* se ha evidenciado por los siguientes hallazgos: (i) La presencia de la MT en el líquido folicular de mujer, vaca y cerda; (ii) la síntesis de N-acetil serotonina O-metiltransferasa, (enzima asociada a la producción de MT) en el COC de vaca; y (iii) la identificación de los receptores MT1 y MT2 en las CG de mujer, el folículo antral y el cuerpo lúteo (CL) de rata y en las CG y COC de vaca. Además, se ha identificado el receptor MT1 en GC y CC de la cerda, así como en el folículo antral y células lúteas de la yegua (Brzezinski et al. 1987; Shi et al. 2009; Tian et al. 2014; El-Raey et al. 2011; Yie, Niles, and Younglai 1995; Soares et al. 2003; S. J. Wang et al. 2012; Kang et al. 2009; Pedreros, Ratto, and Guerra 2011). Debido a lo anterior, se ha incluido la MT en los protocolos de MIV de ratones, ovejas, cabras, cerdos, bovinos, búfalos y conejos; con resultados favorables (Adriaens et al. 2006; Kang et al. 2009; Manjunatha et al. 2009; Vázquez et al. 2010; El-Raey et al. 2011; F. Wang et al. 2013; Fu et al. 2014; Mehaisen and Saeed 2014).

Justificación

En equinos se sabe poco sobre el efecto de la MT en el ovario (Pedreros, Ratto y Guerra, 2011) y hasta la fecha no se han publicado datos sobre su efecto durante la maduración

del COC. Debido a esto, esta investigación pretende identificar componentes melatoninérgicos en el ovario equino y evaluar los efectos de la adición de MT al medio de MIV sobre la expansión del cúmulo en el COC, el daño oxidativo y la apoptosis.

Objetivo general

Determinar la presencia de componentes melatoninérgicos en el folículo equino y el efecto de la adición de MT al medio de cultivo durante la MIV del COC equino.

Objetivos particulares

Identificar la expresión, síntesis y localización de MT1, MT2 y ASMT (componentes melatoninérgicos) en las células foliculares del equino.

Evaluar la expresión de los receptores MT1 y MT2 en CC de COCs equinos madurados *in vitro* en medios enriquecidos con MT.

Evaluar el efecto de la adición de MT sobre el estrés oxidativo del COC equino durante su MIV.

Evaluar el efecto de la adición de MT sobre la apoptosis del COC equino durante su MIV.

Evaluar el efecto de la adición de MT sobre la expansión del cúmulo del COC equino durante su MIV.

Revisión de literatura

"La nueva información hace posible las nuevas ideas"
-Zig Ziglar

Producción *in vitro* de embriones equinos: *Del ovocito al embrión*

El complejo cúmulo-ovocito

El ovocito es la célula que junto con su homólogo masculino, el espermatozoide, son los actores principales de la reproducción sexual en mamíferos. Sin embargo para que el ovocito logre un estado competente y llegue a ser un embrión viable, necesita la participación de células foliculares del cúmulo (CC), granulosa (CG) y teca (CT)) con las cuales establece una comunicación bilateral para coordinar el desarrollo folicular y con ello su propio crecimiento, maduración y ovulación (Zuccotti et al. 2011; Palma et al. 2012). Dentro de las células foliculares, las CC son de gran importancia debido a su estrecha asociación con el ovocito, con el que forman un complejo morfo-funcional conocido como complejo cúmulo-ovocito (COC) (Zuccotti et al. 2011).

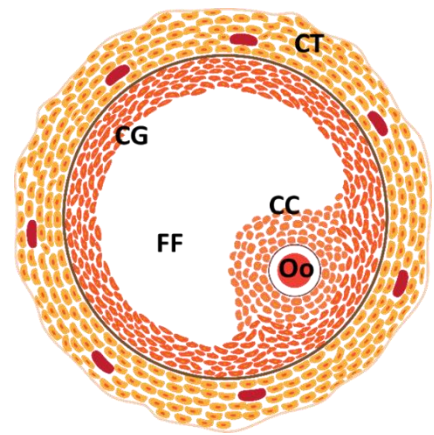


Figura 1 Representación esquemática del folículo equino. Oo ovocito, CC células del cúmulo, CG células de la granulosa, CT células de la teca, FF líquido folicular. Figura propia.

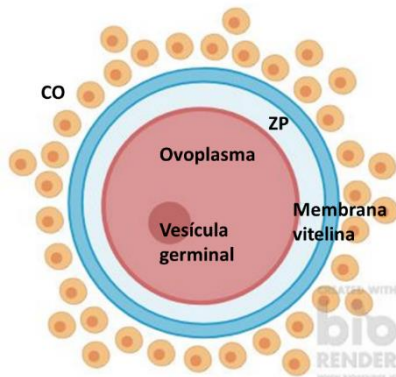


Figura 2 Morfología del Complejo Cúmulo-Ovocito COC. CO cúmulo ooforus, ZP zona pelúcida. Figura propia.

Morfología del complejo cúmulo-ovocito

La morfología del ovocito, asociado a las CC (COC) ha sido muy estudiada debido a: i) su importancia biológica, ii) su uso en la reproducción asistida y iii) la relación entre el grado de maduración de los ovocitos y el potencial de desarrollo embrionario (Balaban and Urman 2006). El ovocito equino es una estructura esférica con un diámetro que oscila entre 120 y 160 μm , encontrándose rodeado por la zona pelúcida (ZP). Mugnier y colaboradores., (2009) describen que la ZP equina es una estructura compacta similar a una malla

con poros pequeños, con un espesor de $9.9 \pm 1.2 \mu\text{m}$ para ovocitos inmaduros y $15.1 \pm 1.7 \mu\text{m}$ para ovocitos madurados *in vivo*. Esta capa está conformada principalmente por cuatro glicoproteínas (ZPA/ZP2, ZPB/ZP4, ZPC/ZP3 y ZP1), con una composición muy similar a la descrita en humanos, ratas, macacos, chimpancés y hámsters. La ZP se encuentra rodeada por una o más capas de CC unidas por su matriz extracelular (ECM), conformando la estructura llamada cúmulo o corona radiada. La primera capa de CC se asocia mediante uniones gap con la ZP-ovocito y forma al cúmulo oophorus. (figura 2) (Fair, Hyttel, and Greve 1995). A diferencia de los bovinos, Hawley, Enders y Hinrichs, (1995) describen que: el cúmulo de la yegua es más delgado y con una cantidad menor de fenestraciones (mayor integridad), sobresale menos de la lámina basal y cuenta con una base de unión más amplia a las células de la granulosa mural, presentando procesos celulares que se extienden para unirse con una almohadilla existente en la teca interna. Se ha sugerido que estas diferencias con respecto al bovino pueden ser la razón de la baja tasa de recuperación de COC equino.

Clasificación morfológica del complejo cúmulo-ovocito

El COC equino ha sido clasificado de acuerdo a su morfología por varios investigadores, siendo ampliamente aceptada la clasificación de Hinrichs *et al.*, (1993) y Hinrichs y Williams, (1997), quienes categorizan el grado de expansión del cúmulo en dos grupos a) compactos CP y b) expandidos EX, subdividiéndose cada uno de estos en dos subgrupos CP1: cúmulo compacto de apariencia lisa y CP2: cúmulo compacto de apariencia granular; EX1: cúmulo con expansión ligera a moderada con células del cúmulo individuales visibles y EX2: cúmulo expandido completamente, donde la matriz extracelular es visible entre las células (figura 3). Como se ha descrito anteriormente, la clasificación del COC equino determinará en gran medida el futuro del ovocito, diversos estudios han establecido que los COCs expandidos logran rangos más altos de maduración en esta especie (60% aproximadamente), contrario a lo observado en bovinos (Katrin Hinrichs 2010a).

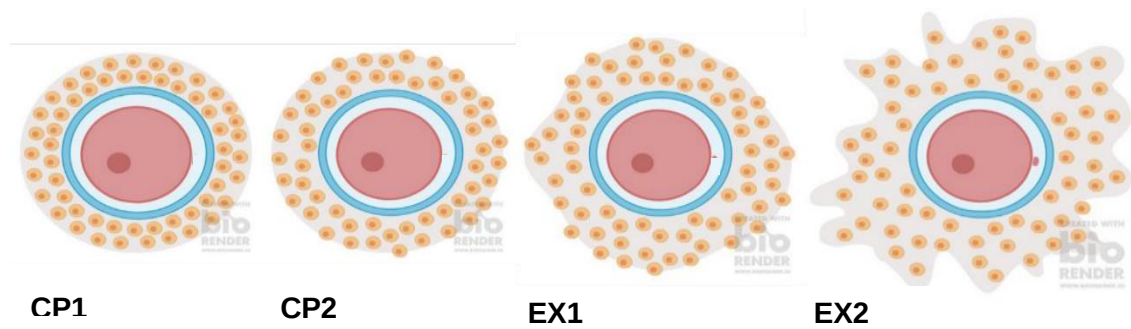


Figura 3 Representación gráfica de la clasificación de COCs equinos. Adaptado de Hinrichs (1997) CP1 compacto 1, CP2 compacto 2, EX1 expandido 1, EX2 expandido 2.

Recuperación del complejo cúmulo-ovocito

La producción *in vitro* de embriones equinos comienza con la recuperación del COC. Existen tres técnicas para realizar esta operación i) aspiración a través del flanco de folículos maduros (estimulados con hCG o análogos de GnRH) ii) aspiración trans-vaginal (TVA) guiada por ultrasonografía de folículos presentes en forma natural en el ovario y iii) aspiración o curetaje folicular de tejido ovárico post mortem (Carnevale 2016). Como se describe a continuación, cada técnica tiene sus particularidades, así como ventajas y desventajas.

Aspiración por flanco de folículos maduros

El complejo cúmulo-ovocito recuperado de un folículo pre-ovulatorio que ha sido estimulado con hCG o con análogos de GnRH (Deslorelina o Histerelina), generalmente se encuentra expandido y su recuperación es relativamente fácil debido a que la integridad de la unión de COC con la pared folicular se encuentra debilitada por el proceso de preparación para la ovulación en la que se encuentra el folículo al momento de la aspiración. Por esta razón la tasa de recuperación a partir de estos folículos es alta (65% a 80%). Una ventaja de aspirar folículos maduros es que son grandes (más de 35mm) lo que posibilita realizar un procedimiento rápido de aspiración folicular por el flanco de la yegua, manipulando al ovario a través del recto y utilizando equipos simples (aguja y jeringa). La gran desventaja que tiene esta técnica es que por la conformación y fisiología del ovario de la yegua solamente se puede recuperar uno o dos COCs cada ciclo estral (K. Hinrichs 2010).

Aspiración transvaginal (TVA) guiada por ultrasonografía folicular

Esta técnica permite recuperar COCs compactos e inmaduros, los cuales deben ser sometidos a maduración *in vitro* e inyección intra-citoplasmática de espermatozoides (ICSI) para la producción de embriones. Con esta técnica se logra un bajo porcentaje de recuperación de COCs debido a que en los folículos inmaduros existe una unión estrecha y fuerte entre las células de la pared folicular y el COC. Aunque la tasa de recuperación en algunos laboratorios llega hasta el 58% utilizando técnicas de aspiración que incluyen ocho lavados por folículo, la tasa típica de recuperación es del 30%. A pesar de lo anterior, como en esta técnica se aspira un número mayor de folículos, el número total de COCs que se puede recuperar por cada ciclo estral es mayor que con la aspiración de folículos maduros, siendo esta una de las principales ventajas de la TVA. En el 2010, Jacobson reportó que por cada procedimiento de TVA de folículos presentes en el ovario recuperó en promedio 3.8 COCs, de los cuales 0.63 resultaron en un blastocito. En contraste, por cada aspiración de folículos maduros se reporta una recuperación de 0.8 COCs, de los cuales 0.33 resultaron en un blastocito. Sin embargo, el éxito de la TVA de folículos inmaduros requiere de un sofisticado equipo que consta de una bomba de aspiración acoplada a un equipo de ultrasonografía transvaginal con guía para aguja, así como de personal capacitado para realizar la técnica (K. Hinrichs 2010).

Raspado o aspiración folicular de tejido ovárico post mortem

La tercera técnica consiste en la recuperación post mortem de COCs a partir de tejido ovárico de yeguas sacrificadas en el rastro o sometidas a eutanasia después de un evento catastrófico (Carnevale 2016). Los COCs obtenidos del tejido ovárico de rastro han sido un excelente recurso para investigación y clonación equina. La obtención del COC bajo estas circunstancias se ha realizado por raspado o curetaje de las paredes foliculares con una cureta para hueso después de hacer una incisión sobre el folículo. Una variante de esta técnica es la aspiración de las paredes foliculares con una aguja de calibre 14 acoplada a una bomba de aspiración (Diaw et al. 2018). Esta variante presenta como ventaja la reducción del tiempo empleado por ovario, pero la tasa de recuperación se disminuye a la mitad con respecto al raspado (Dell'Aquila et al. 2001; K. Hinrichs 2010). Otro inconveniente es la pérdida de capas de células del cúmulo, lo que dificulta la clasificación morfológica de los COCs. La progresión de los COCs obtenidos a partir de ovarios post

mortem a embriones viables está determinada en gran medida por el tiempo entre el sacrificio y la recuperación, el cual no debe sobrepasar las 6 horas (Katrin Hinrichs 2010a).

Maduración del ovocito

La maduración del ovocito se lleva a cabo *in vivo* antes de la recuperación del COC a partir de folículos preovulatorios estimulados con hCG o análogos de GnRH. En cambio, en el caso de los ovocitos recuperados en un estado inmaduro, su maduración se debe llevar a cabo *in vitro*. En cualquiera de los dos ambientes, *in vivo* o *in vitro*, la meta del ovocito es madurar para adquirir la competencia requerida para una fertilización exitosa y un desarrollo embrionario adecuado (Lonergan and Trudee 2016). Para lograr este estado de maduración competente, el ovocito debe llevar a cabo una maduración nuclear y citoplasmática, que deben ser acompañadas por una adecuada expansión del cúmulo (*figura 4*) (Landim-Alvarenga and Maziero 2014). Los mecanismos por los cuales el ovocito equino adquiere una maduración competente *in vivo* e *in vitro* aún distan mucho de comprenderse por completo. Sin embargo, de manera general se han aceptado diferentes modelos que proponen mecanismos de maduración. Conocer y comprender si estos modelos se ajustan al ovocito equino permitirá incrementar la eficiencia en las técnicas de asistencia reproductiva, por lo que a continuación se describirán los procesos generales por los que atraviesa el ovocito durante su maduración *in vivo*

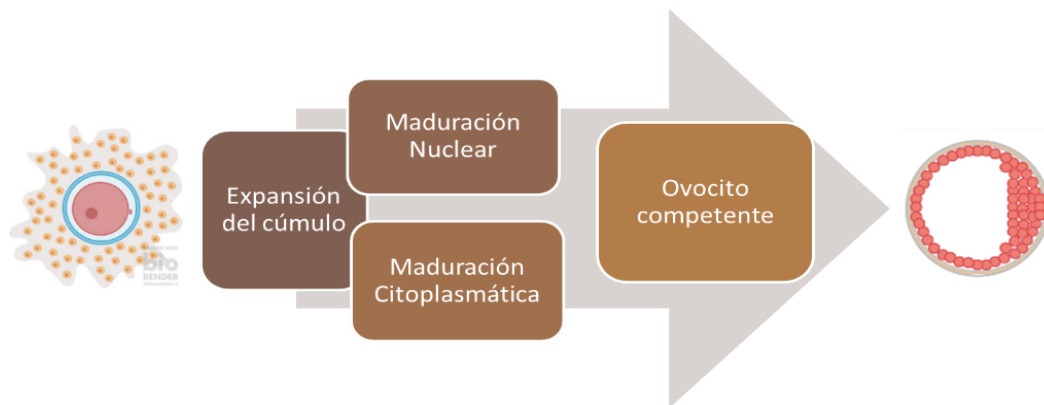


Figura 4 Eventos fisiológicos que debe atravesar el ovocito para alcanzar un estado de competencia para el desarrollo embrionario.

Arresto meiótico del ovocito

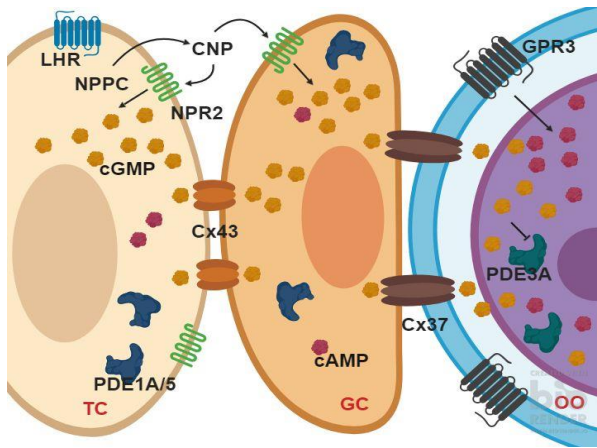


Figura 5 Modelo representativo del arresto meiótico del ovocito por nucleótidos cíclicos. Figura modificada de Conti et al. (2012).

Antes de la recuperación de un COC inmaduro el folículo se encuentra en los primeros estadios del folículo antral y el ovocito está en un estado de arresto meiótico por su interacción con las células foliculares, fase conocida como etapa de vesícula germinal (diploteno de la profase I) (Landim-Alvarenga and Maziero 2014). Se ha sugerido que el mecanismo mediante el cual las células foliculares mantienen al ovocito en arresto meiótico es por el paso de i) guanosin monofosfato cíclico (*GMPc*) de las CG a las CC y ii)

adenosin monofosfato cíclico (*AMPc*) y *GMPc* de las CG y CC al ovocito, a través de uniones gap (Conti et al. 2012; Gilchrist et al. 2016). El paso de estos nucleótidos cíclicos al ovocito junto con la síntesis endógena de *AMPc* por actividad de la proteína 3 rica en glicina (GRP3) permiten mantener niveles intra-ovocitarios altos de *AMPc*, lo que induce a través de mecanismos dependientes de proteína cinasa A (*PKA*) la supresión de la actividad del factor promotor de la maduración (*MPF*), por lo que se mantiene el arresto de la meiosis. Cabe señalar que el *GMPc* contribuye a mantener altos los niveles intra-ovocitarios de *AMPc* debido a que inhibe a la enzima encargada de la degradación del *AMPc*, la fosfodiesterasa 3 (*PDE3*) (figura 5) (Conti et al. 2012; Gilchrist et al. 2016). *In vivo*, el arresto meiótico del ovocito se mantiene hasta que el ovocito alcanza su tamaño final, evento que ocurre paralelamente con la disminución de los niveles de *AMPc*. Cabe señalar que una vez alcanzado su tamaño final el ovocito es transcripcionalmente inactivo, por lo que los procesos de maduración, fertilización, activación y desarrollo embrionario temprano ocurren en ausencia de transcripción, por lo que la acumulación de ARN materno y su posterior traducción a proteínas es esencial para estas etapas.

Los mecanismos exactos mediante los cuales el ovocito reinicia la meiosis no han sido esclarecidos por completo. Sin embargo, se ha sugerido que eventos que promuevan la disrupción de las uniones gap entre las células del cúmulo y el ovocito podrían promover

el reinicio de la meiosis (Lonergan and Trudee 2016). Un evento *in vivo* que induce la disrupción de las uniones gap en el ovocito es el efecto del aumento de la hormona luteinizante (LH) sobre los folículos preovulatorios (Palma et al. 2012). La disrupción de las uniones gap también ocurre cuando se remueven ovocitos inmaduros de su ambiente folicular (Lonergan and Trudee 2016).

Maduración nuclear; eventos entre la interrupción del primer arresto meiótico y el segundo arresto meiótico.

La *maduración nuclear* se caracteriza por estados alternados de desarrollo y arrestos de la meiosis. Este proceso tiene como finalidad generar una célula haploide a partir de la expulsión del primer cuerpo polar. La maduración nuclear inicia con la interrupción del primer arresto de la meiosis (diploteno de la profase I) y termina en el segundo arresto meiótico (metafase II) (Lonergan and Trudee 2016). La interrupción del primer arresto meiótico *in vivo* se ha descrito como consecuencia de la disrupción de las

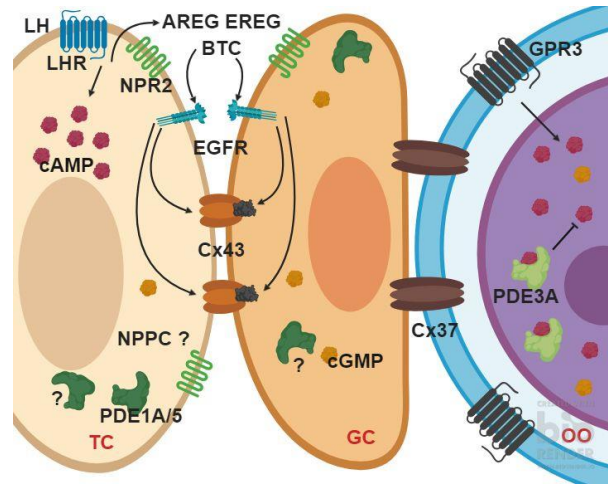


Figura 6 Modelo representativo de la reanudación de la maduración del ovocito por reducción de nucleótidos cíclicos. Figura modificada de Conti et al. (2012).

uniones gap inducida por el aumento preovulatorio de LH. En roedores y bovinos todo inicia cuando esta hormona se une a sus receptores (LHR) los cuales son expresados principalmente en CT y CG mural. La unión de LH a LHR provoca la expresión de diferentes factores que actúan como señales parácrinas para mantener la comunicación intracelular con el COC, debido a que este no expresa los LHR necesarios para responder directamente al aumento de LH (Park 2004). Algunos de estos factores son los ligandos del receptor de factores de crecimiento epidermal (*EGF-ligands*): anfiregulina (*AREG*), epiregulina (*EREG*) y betacelulina (*BTC*). Estos EGF-ligands después de sufrir una escisión proteolítica por los miembros de la familia de desintegrinas y metaloproteinasas (*ADAM*), se liberan e inducen la disrupción de las uniones gap en las CG y CC (*figura 6*) (Ben-Ami et al. 2006). Esta disrupción se debe a la disminución de la *conexina 43*, (proteína que forma la mayor parte de las uniones gap) inducida por LH/EGFR. Adicionalmente, en

roedores la LH disminuye la síntesis de GMPc en las CC como consecuencia de la reducción en la expresión de los receptores del péptido natriurético tipo C (*NPR2*), los cuales al unirse con el péptido natriurético tipo C (*NPPC*) en CG influyen en la síntesis de GMPc. Como resultado de la disrupción de las uniones gap y la reducción en la expresión de *NPR2*, los niveles de PDE3 aumentan, provocando una abrupta caída de los niveles AMPc en el ovocito. La disminución de los niveles de AMPc resulta en una reducción en la actividad de PKA, lo que impide la fosforilación de *Cdc25* y la cinasa *Wee1B*. Esto permite que la fosfatasa *Cdc25* se transfiera del citoplasma al núcleo y se acumule en este, provocando la activación del factor promotor de la meiosis (MPF) y el transporte de *Wee1B* al citoplasma (Tan et al. 2009). A medida que se reinicia la meiosis, *Wee1B* se inactiva mientras que *Cdc25* se activa promoviendo un aumento de la actividad de ciclina dependiente de cinasa 1 (*CDK1*) (Conti et al. 2012). *CDK1*, subunidad catalítica de MPF, regula la actividad de este factor para que inicie una cascada de fosforilaciones, las cuales son importantes para la ocurrencia de diversos procesos para la reanudación de la meiosis, como la condensación de los cromosomas, polimerización de los microtúbulos del huso, ruptura de la vesícula germinal y el desensamblaje de las proteínas laminares (David Vantman and Margarita Vega 2010). Posterior a la ruptura de la vesícula germinal se ha sugerido que variaciones en las concentraciones de AMPc y en la actividad de PKA activan a las proteínas cinasas activadas por mitógenos (*MAPKs*), proteínas involucradas en la progresión de la meiosis (Landim-Alvarenga and Maziero 2014). Uno de los primeros eventos que ocurren después de la reactivación de la meiosis es la migración de la vesícula germinativa desde una posición central o subcentral en el citoplasma hacia la región cortical del ovocito, hasta llegar a una localización muy cercana a la membrana plasmática. La migración constituye el primer signo morfológico de maduración ovocitaria. Luego ocurre la ruptura de la vesícula germinativa, la recondensación de los cromosomas y la progresión del proceso meiótico hasta metafase I y luego a metafase II sin la ocurrencia de profase II, lo que resulta en la expulsión del primer corpúsculo polar. Recientemente se ha descrito que el segundo arresto meiótico se debe a la actividad de una Ser/Thr quinasa llamada Mos quinasa, la cual impide el desensamblaje del huso meiótico y la descondensación de la cromatina, entre otras acciones. El mecanismo de acción de Mos quinasa es a través de la activación de la vía de las MAPK, provocando la reorganización de los microtúbulos del

huso meiótico de metafase I y la estabilización del huso meiótico en metafase II (David Vantman and Margarita Vega 2010).

Maduración citoplasmática: *modificaciones ultra-estructurales y biológicas del ovocito*

La *maduración citoplasmática* se caracteriza por modificaciones ultraestructurales y biológicas del ovocito. Estas modificaciones incluyen; la redistribución de organelos, la degradación y reclutamiento de ARNs maternos y el incremento de reservas de calcio principalmente (Landim-Alvarenga and Maziero 2014; Carneiro et al. 2002). Su correcta ejecución es crítica para determinar la capacidad de desarrollo del ovocito luego de la fecundación. Por ello, no todos los ovocitos que lograron la maduración nuclear son competentes para su posterior desarrollo a blastocito, y muchos de estos procesos no logran llevarse a cabo adecuadamente en el ambiente de maduración *in vitro*. La redistribución de organelos en el citoplasma es posible por la acción de los microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto que inician una intensa reorganización con la reanudación de la meiosis. Uno de los organelos que experimenta redistribución son las mitocondrias, que cambian de una posición periférica a dispersarse por todo el ovocito conforme transcurre la maduración. Se ha sugerido que esta redistribución responde a las demandas energéticas del ovocito (El-Raey et al. 2011). En roedores el retículo endoplasmático, que se distribuía uniformemente en el citoplasma en un estado inmaduro del ovocito también experimenta una redistribución con la maduración, migrando a la región cortical. Este organelo sufre también modificaciones bioquímicas esenciales para un funcionamiento satisfactorio de la regulación de calcio durante la maduración, activación y fertilización del ovocito principalmente vía 1,4,5 inositol trifosfato (IP3) y su receptor IP3R (Landim-Alvarenga and Maziero 2014). Los gránulos corticales que se originan del aparato de Golgi; organelos exclusivos del ovocito, también modifican su distribución al finalizar la maduración, momento en que la MII es alcanzada. Los gránulos corticales que se encontraban distribuidos en racimos en el citoplasma se redistribuyen cerca de la superficie interna de la membrana celular de los ovocitos. Este patrón de distribución es estratégico para preparar al ovocito para la llegada de los espermatozoides y su posterior activación. La exocitosis de los gránulos corticales (reacción cortical) es uno de los mecanismos usados por el ovocito para impedir la polispermia (Carneiro et al. 2002; Coticchio et al. 2015; Landim-Alvarenga and Maziero 2014).

Otros cambios biológicos considerados como parte de la maduración molecular del ovocito son la transcripción, almacenamiento y el procesamiento de ARN materno que será utilizado para la síntesis de las proteínas que influyen directamente en sucesos celulares posteriores, como la fertilización, la formación del pronúcleo y el comienzo de la embriogénesis. Recordemos que el ovocito después de haber alcanzado su tamaño final es transcripcionalmente inactivo y los procesos de maduración, fecundación, activación y desarrollo embrionario temprano ocurren en ausencia de transcripción, hasta que el nuevo genoma del embrión comienza a sintetizar su propio ARN (ARN embrionario), evento conocido como activación de genoma embrionario (AGE). Cabe destacar que los ARN maternos son más estables que los ARNs convencionales, sin embargo, iniciada la maduración esta estabilidad se reduce y como consecuencia algunos ARN maternos se degradan. Otros ARN maternos por lo contrario son seleccionados y reclutados para la síntesis de proteínas (ARN maternos durmientes). El balance entre la degradación y selección para su posterior traducción resulta fundamental para permitir una adecuada AGE y consecuentemente el posterior desarrollo embrionario (Svobode y col, 2015).

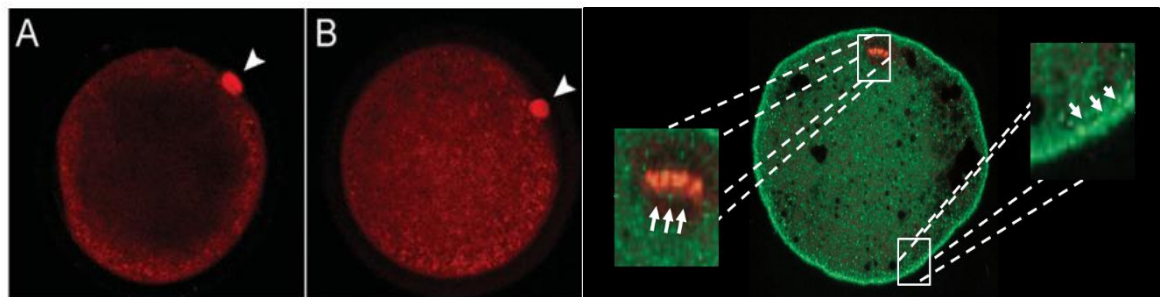


Figura 7 Ovocitos con reorganización de organelos. A y B migración mitocondrial, C migración de granulos corticales. A. Las mitocondrias se encuentran en la periferia en un ovocito inmaduro. B después de la reanudación meiótica las mitocondrias se distribuyen en el ovocito. C los gránulos corticales migran a la periferia en ovocitos maduros, mientras que los cromosomas se alinean. Figuras tomadas de Carneiro *et al.*, 2002 a y b y El-Raey *et al.*, 2011 c.

Expansión del cúmulo: *más que la formación de matriz extracelular*

Los eventos de maduración nuclear, citoplasmática y molecular que experimenta el ovocito no pueden llevarse a cabo sin una comunicación entre los ovocitos y las células del cúmulo que lo rodean (Zuccotti et al. 2011). Esta comunicación permite que tanto el ovocito como las células del cúmulo experimenten modificaciones a fin de lograr maduración con competencia embrionaria. Las principales modificaciones durante la maduración del ovocito que experimentan las CC son morfológicas y de actividad metabólica, lo que

permite la síntesis de una gran cantidad de matriz extracelular que resulta en el crecimiento del COC, fenómeno conocido como expansión del cúmulo. *In vivo* este fenómeno ocurre poco tiempo antes de la ovulación, mientras que *in vitro* ocurre durante la maduración nuclear. La expansión del cúmulo consiste en la síntesis de masa extracelular compuesta por proteoglicanos, los cuales son creados a partir de proteínas de la membrana de las CC y glicosaminoglicanos (GAGs: Sulfato de condroitina, keratan sulfato, heparán sulfato y ácido hialurónico). Entre los glicosaminoglicanos más abundantes en la matriz extracelular del cúmulo expandido se encuentra el ácido hialurónico (HA). Este glicosaminoglicano (HA) juega un importante papel en la fisiología, actuando como una molécula estructural y de señalización. El HA participa en la regulación de la maduración meiótica del ovocito, la expansión del cúmulo, la ovulación y fertilización del ovocito, así como en la anidación embrionaria en la membrana mucosa del útero y en la morfogénesis fetal. Se ha reportado que la síntesis del HA en cerdos y bovinos es catalizada por isoformas de la enzima hialuronan sintasa (HAS), que son reguladas por gonadotropinas. La LH y la FSH, junto con la prostaglandina E2 (PGE2) y hormonas esteroides, inducen una cascada de señalización endócrina que influye en el metabolismo de las células de la granulosa y participa en la regulación parácrina de la expansión del

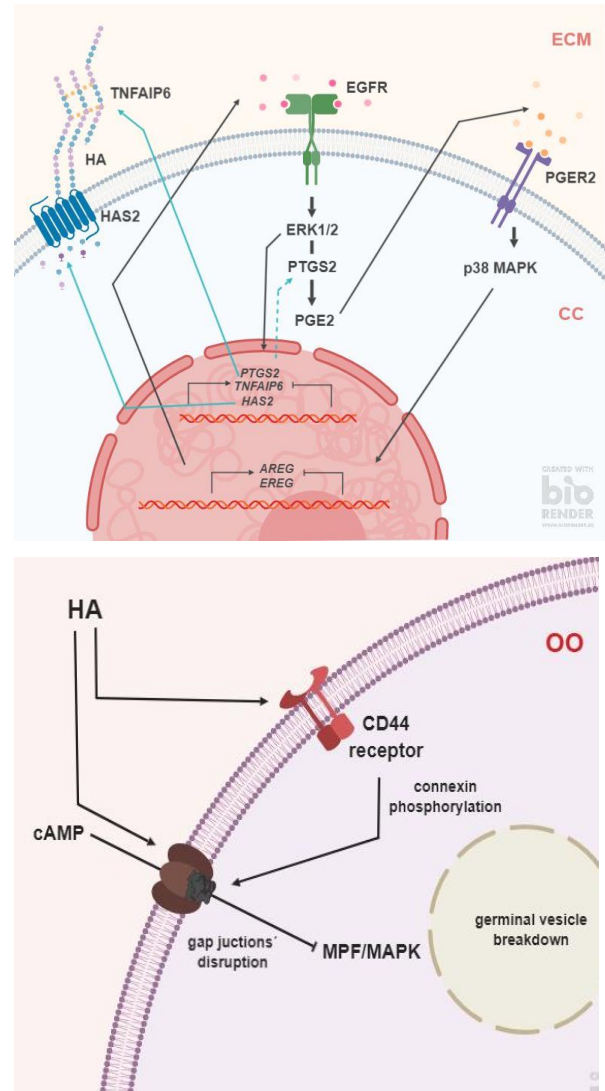


Figura 8 Representación esquemática de la regulación autocrina de AREG y EREG en las CC y la reanudación de la meiosis del ovocito por HA. ECM Matriz Extracelular, CC Células del cúmulo, OO Ovocito. Adaptado de Shimada et al. 2006 y Nevoral et al. 2015

cúmulo en el folículo. Se ha descrito que la regulación parácrina depende de factores de crecimiento epidermal (EGF) y factores de crecimiento parecidos a insulina (IGF-1) principalmente (Nevoral et al. 2015). La secuencia propuesta es la siguiente: la unión de los ligandos AREG y EREG a los receptores de EGF, activa a ERK1 / 2 e induce la expresión de PTGS2; El aumento en la expresión de PTGS2 conduce al aumento de la síntesis de prostaglandinas (PG, PGE) que se unen al receptor de prostaglandina E2 (PTGER2), provocando la activación de p38MAPK e induciendo la transcripción de ARNm para AREG y EREG. La inducción autócrina de la síntesis de mRNA para AREG y EREG por la vía PGE / PTGER2 estimula la expresión de los genes PTGS2, HAS2 y TNFAIP6, involucrados en la expansión del cúmulo (Shimada et al. 2006). La síntesis de HA por HAS estimula la producción de miembros de las proteínas ligadas al ácido hialurónico (HABPs) que contribuyen a la formación de la matriz extracelular en el cúmulo expandido junto con otros elementos. Un elemento importante es el factor de necrosis tumoral alfa inducido por proteína 6 (TNFAIP6), debido a que estabiliza las cadenas de HA. Ya formada, la matriz extracelular expandida del cúmulo cumple un rol importante en la regulación de la maduración del ovocito (Nevoral et al. 2015). Se ha descrito que esta regulación inicia a partir de la unión del HA a sus receptores, lo que estimula la expresión y creación de HBP, entre ellos el receptor de membrana CD44 localizado en CC y ovocitos. Este receptor CD44 durante la maduración del ovocito es intensamente sintetizado por estímulo del receptor de HA y gonadotropinas. Subsecuentemente el receptor CD44 se activa por la unión del HA y forma parte de la comunicación entre el ovocito y las CC. La activación de CD44 además de la comunicación celular en cerdos y posiblemente en la mayoría de mamíferos es necesaria para la maduración nuclear, al participar en la fosforilación de las proteínas de unión estrecha gap, cerrando la conexión celular e interrumpiendo el flujo de AMPc de las CC al ovocito. Los ambientes en los que exista insuficiente interacción de CD44 con HA, como el ocurrido durante la maduración *in vitro* puede provocar una insatisfactoria maduración del ovocito, fertilización y desarrollo embrionario (Yokoo et al. 2007).

Maduración *in vitro* del ovocito: *un ambiente lejos del nicho folicular*

Conociendo de manera general los procesos que experimenta el COC durante su maduración *in vivo*, es posible revisar las diferencias en los mismos procesos durante la maduración *in vitro* a partir del momento en que los COCs recuperados son colocados en gotas de medio para cultivo e inician su maduración bajo condiciones *in vitro*, lejos de su

ambiente y protección folicular. El panorama para los COCs es incierto, pues muchas variables pueden afectar la maduración nuclear, citoplasmática, molecular y la expansión del cúmulo bajo estas condiciones. Consecuencia de ello, un porcentaje de alrededor del 40% al 60% de ovocitos sometidos a maduración *in vitro* no lograran adquirir una maduración con competencia embrionaria (K. Hinrichs 2010). La maduración bajo estas condiciones inicia al retirar al ovocito de su ambiente folicular, provocando que el bloqueo inducido por el albergue del ovocito en el folículo se elimine; cabe señalar que el ovocito equino reanuda su maduración más lentamente que el ovocito bovino, por lo que el manejo post recuperación del COC varía entre especies y el uso de holdings, que en bovinos es de suma importancia, en equinos puede evitarse si los ovocitos se colocan en medio de cultivo en poco tiempo (Lonergan and Trudee 2016). El progreso de la maduración de los ovocitos después de colocarlos en el medio de cultivo será dependiente del medio, condiciones *in vitro* y factores intrínsecos del ovocito, por lo que deben buscarse ambientes de maduración *in vitro* parecidos al ambiente folicular para mejorar los porcentajes de maduración. Entre los medios que se han utilizado con efectividad en la maduración *in vitro* de ovocitos equinos se encuentra el M199 con sales de Earles, el medio de maduración equino (EMMI) y el medio Dulbecco modificado Eagle/F12. A estos medios se les ha adicionado piruvato, antibióticos, suero y albúmina principalmente (Carnevale 2016). Las condiciones de cultivo comúnmente son en una atmósfera humidificada con el 5% de CO₂ en el aire a 38.2°C, aunque se ha reportado cultivos en atmosferas humidificadas al 5%, con 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂. La temperatura de cultivo se ha reportado que va de 37.9 a 38.5°C (Diaw et al. 2018; K. Hinrichs 2010; Canesin et al. 2017). Por otro lado el tiempo óptimo de cultivo dependerá de la clasificación del COC, siendo un tiempo óptimo para COCs Ex de 24 a 30 horas. Mientras que los COCs Cp requerirán de más tiempo, que va de 30 a 36 horas (K. Hinrichs 2010). Como se ha mencionado a lo largo del escrito, en equinos los COCs Ex muestran una mayor capacidad para madurar que los Cp, Sin embargo, si los ovocitos logran madurar, independientemente de su clasificación inicial, podrán adquirir competencia embrionaria. Otro factor importante que se ha reportado es el tiempo de recuperación y manipulación. Los COCs recuperados de ovarios extraídos de yeguas de matadero después de 6 horas suelen presentar menores porcentajes de maduración (Diaw et al. 2018; Ribeiro et al. 2008). Diferentes autores trabajando con diversas especies reportan que el estrés oxidante al que son sometidos los ovocitos

durante su recuperación y maduración puede provocar la muerte de numerosas capas de CC, lo que afecta la calidad del ovocito. Posterior a la maduración *in vitro* el ovocito debe de ser evaluado y por tanto despojado de las CC. En el equino esto representa un problema debido a la morfología del COC ya descrita, pero una opción es la remoción mecánica por pipeteo o con ayuda enzimática. La hialuronidasa ha sido de mucha ayuda para desnudar ovocitos maduros, mientras que en ovocitos inmaduros la adición de tripsina/EDTA en un medio libre de calcio y magnesio puede ser de mayor ayuda (K. Hinrichs 2010).

Fertilización y activación del desarrollo

La fertilización y activación del desarrollo inician con el ingreso del espermatozoide al ovocito. *In vivo*, el ingreso del espermatozoide activa a la fosofolipasa C zeta, la que inicia una cascada de señalización que finaliza con la producción de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3), el cual se une a receptores específicos del retículo endoplasmático rugoso, lo que resulta en la liberación de calcio al citoplasma. Esto provoca la reanudación de la meiosis, la liberación de los gránulos corticales, la formación de pronúcleos y el reclutamiento de ARN materno (Schmitt and Nebreda 2002; Evsikov and De Evsikova 2009).

En humanos y en otras especies animales la fertilización *in vitro* por cocultivo ha sido empleada con éxito para la producción *in vitro* de embriones, en equinos no ha sido satisfactoria (Canesin et al. 2017). McPartlin y colaboradores (2009) describieron un protocolo que inducía hiperactivación de los espermatozoides usando procaína, logrando buenos porcentajes de fertilización, pero no evaluaron el desarrollo embrionario. Se ha propuesto que las tasa tan bajas de éxito pueden deberse a una inadecuada maduración del ovocito o a una inadecuada capacitación de los espermatozoides (Katrin Hinrichs 2010a). Actualmente, a pesar de los esfuerzos por mejorar la repetitividad de la FIV por cocultivo la técnica sigue sin porcentajes de éxito aceptables, razón por lo que la fertilización en equinos es realizada usando la técnica de inyección intra-citoplasmática de espermatozoides (ICSI), la cual ha demostrado buenos porcentajes de éxito en la producción de embriones *in vitro* (25 al 35% de los ovocitos inyectados en algunos laboratorios) (K Hinrichs et al. 2007). Esta técnica consiste en la fecundación de los ovocitos por medio de la inyección de un espermatozoide en su citoplasma con una micro-pipeta, previa obtención y preparación de los gametos con el fin de obtener embriones que puedan transferirse al útero materno. Con esta técnica se prescinde de la reacción

acrosómica. Para realizar esta técnica es necesario el uso de un micro manipulador asociado a un Piezo drill (Lagutina et al. 2005; Choi et al. 2004). Es recomendable si existe interés en el tema consultar el artículo de Choi y colaboradores (2004) en donde se describe la técnica a detalle. La activación ovocitaria que se observa en la ICSI, sugiere que ciertos componentes espermáticos pueden desencadenarla aun en ausencia de interacciones de membrana. Sin embargo, existen diferencias en los eventos de activación cuando se comparan con los descritos en FIV. Una de ellas es que el inicio de las oscilaciones de calcio se retrasa entre 30 minutos y varias horas. Este hallazgo es consistente con la observación de otros eventos, como la emisión del segundo cuerpo polar y la formación de pronúcleos después de intervalos altamente variables entre ovocitos que son inyectados en momentos similares. El retraso puede ser explicado por el mayor tiempo requerido para romper la membrana plasmática del espermatozoide y remover el acrosoma para exponer el factor espermático activador del ovocito que está presente dentro de la teca perinuclear (Tesarik, Sousa, and Testart 1994).

Cultivo embrionario y activación del genoma embrionario

Posterior a la ICSI, una vez que los cromosomas están empaquetados en histonas y que el genoma ha sido replicado, ocurre la singamia. En este momento, tanto el pronúcleo femenino como el masculino se encuentran muy próximos el uno del otro, de forma tal que ambas membranas nucleares comienzan a interdigitarse. Posterior a esto, la membrana nuclear se rompe dando oportunidad para que los microtúbulos del huso mitótico se unan al centrómero de los cromosomas y se lleve a cabo la primera división mitótica. Paralelamente comienza una degradación masiva de los RNAm maternos, lo que es clave para que se dé una adecuada activación del genoma embrionario (transcripción de genoma propio del embrión) dando lugar a los procesos necesarios para el desarrollo embrionario (Burrola-Barraza and González-Rodríguez 2015). Poco se sabe acerca del efecto que tienen los medios de cultivo embrionario en el desarrollo temprano de los embriones equinos, sin embargo varios reportes indican que el medio DMEM/F-12 con 10% de suero fetal bovino a un radio de 1uL de medio por embrión mantiene buenos porcentajes de desarrollo a blastocito, generalmente los embriones son cultivados en una atmosfera de gases mezclados al 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂ a 38,2°C. El cultivo comúnmente puede durar de 7 hasta 10 días, tiempo requerido para que el embrión se desarrolle hasta

la etapa de blastocito (K. Hinrichs 2010). Muy pocos de estos embriones darán origen a un potro y la mayoría lamentablemente morirán en el intento.

Realidades de la producción *in vitro* de embriones equinos

Como se ha revisado en párrafos anteriores, la maduración *in vitro* de ovocitos equinos debe superar muchas complicaciones y retos, a pesar de lo cual diversos grupos de especialistas han logrado obtener miles de gestaciones equinas de esta forma, y por si fuera poco los equinos son una de las especies domésticas con más individuos clonados (Lagutina et al. 2005). Por ejemplo. La mayoría de los caballos empleados para el juego de polo de alto desempeño son producto de transferencias embrionarias y clonación. El panorama de la industria crece aceleradamente pero las técnicas de asistencia reproductiva distan mucho aun de ser eficientes. Al revisar los porcentajes de éxito reportados por diversos investigadores y considerando panoramas optimistas tenemos que de 10 ovocitos recuperados, solo 6 alcanzaran una maduración competente, y solo 2.1 de ellos continuaran su desarrollo a blastocitos que al ser transferidos logran producir 1.7 gestaciones exitosas (K. Hinrichs 2010; Canesin et al. 2017). Se ha asumido que estos porcentajes tan bajos de éxito se deben a la falta de estandarización de las técnicas y principalmente a la alta susceptibilidad del ovocito a ambientes *in vitro* que demeritan su calidad y provocan fallos en el subsecuente desarrollo embrionario, siendo procesos críticos la maduración y cultivo de blastocitos *in vitro* (K. Hinrichs 2010; Canesin et al. 2017; Katrin Hinrichs 2010a; Maria Helena Coelho Cruz et al. 2014). En los siguientes párrafos se enfatiza la maduración *in vitro* debido a que es una técnica limitante para la producción de embriones *in vitro*, por lo que mejorar sus porcentajes de éxito implicaría mejorar la eficiencia en la producción de embriones.

Obstáculos para la maduración *in vitro* de ovocitos

Como se ha mencionado en párrafos anteriores el ambiente *in vitro* no provee el mejor ambiente para la maduración de los ovocitos, razón por la cual múltiples ovocitos no alcanzan a completar los cambios morfológicos y funcionales requeridos para lograr una maduración competente y producir un embrión viable. Se han descrito múltiples factores que pueden afectar la calidad del ovocito, uno de los más importantes es el estrés oxidante ocasionado por la producción excesiva de especies reactivas a oxígeno (ROS) en ambientes *in vitro* (Brown et al. 2017; Virant-Klun et al. 2018; Tamura et al. 2012a). Las ROS se forman debido a la fuga de electrones de la membrana mitocondrial interna

durante la fosforilación oxidativa y la generación de ATP. A consecuencia de la adición secuencial de estos electrones a las moléculas de oxígeno, se forman aniones súper oxido (O_2^-) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y en presencia de hierro férrico se originan radicales hidroxilo (*OH) (figura 9). En el ovario las ROS tienen la capacidad de regular funciones celulares y participan en el desarrollo folicular y ovulación. No obstante, su producción puede verse incrementada a niveles indeseables bajo condiciones de manejo y de cultivo

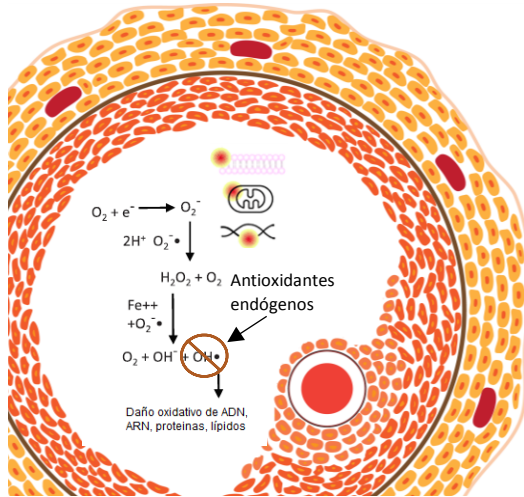


Figura 9 Representación esquemática de la generación de especies reactivas a oxígeno (ROS) y sus principales acciones perjudiciales en las células. Dentro del folículo el estrés oxidante está regulado por antioxidantes endógenos

in vitro, resultado de eventos tales como: la exposición a la luz, elevadas concentraciones de oxígeno y concentraciones inusuales de metabolitos y sustratos, aunado a la privación de antioxidantes presentes endógenamente en el folículo y que trabajan para combatir el exceso de ROS (Devine, Perreault, and Luderer 2012). Estos factores provocan estrés oxidante, que si no logra ser controlado puede dañar a los lípidos de la membrana celular, causar daño mitocondrial y fragmentación del ADN, lo que lleva a la célula a la apoptosis (Tiwari et al. 2015). El proceso de apoptosis es activado por diferentes vías, entre ellas por el

daño mitocondrial caracterizado por la acumulación de la proteína de señalización apoptótica BAX, la supresión de BCL2 y la activación de caspasas (Susnow et al. 2009). *In vivo*, el estrés oxidativo está regulado por antioxidantes endógenos secretados al fluido folicular por las células de la teca (CT), las células de la granulosa (CG) y las células de cúmulo (CC), creando condiciones óptimas para el desarrollo del COC (Kala, Shaikh, and Nivsarkar 2017; Virant-Klun et al. 2018). Por esta razón se ha sugerido que la adición de componentes antioxidantes al medio de MIV puede minimizar la producción de ROS y limitar la apoptosis celular (Kang et al. 2009). Un agente antioxidante y antiapoptótico de importancia en el folículo es la melatonina (MT), elemento que podría apoyar al ovocito y a sus células del cúmulo para completar adecuadamente su maduración.

Melatonina; *molécula indispensable en la reproducción*

Melatonina; *molécula con funciones biológica en los mamíferos*

La melatonina (MT) es una molécula de acción heterogénea con un conjunto de funciones excepcionalmente grande (Reiter et al. 2013). Se aisló de glándulas pineales bovinas por primera vez en 1958 por Lerner y colaboradores (Maria Helena Coelho Cruz et al. 2014) y por algún tiempo se pensó que su producción era exclusiva de esa glándula. Sin embargo, tiempo después se descubrió que se produce en muchos órganos (quizás en todas las células del cuerpo). Sus acciones descritas inicialmente vincularon a la MT con la regulación del ritmo circadiano y circanual, pero estudios posteriores demostraron que esta molécula tiene una amplia gama de funciones, las cuales a nivel molecular que son moduladas a través de sus receptores de membrana (MT1, MT2), así como mediante sitios de unión en el núcleo, citosol y mitocondrias. Además, la melatonina tiene funciones como captador directo de radicales libres, no requieren ningún receptor o sitio de unión. Inicialmente se pensó que la MT *per se* explicaba todas las acciones observadas asociadas con esta indolamina; sin embargo, la MT también es un profármaco, ya que sus metabolitos tienen acciones adicionales a las de molécula madre (Reiter et al. 2013).

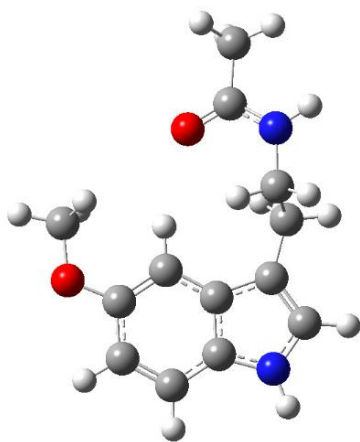


Figura 10 Vista tridimensional de la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina). Reiter et al., 2013

Como se mencionó en el párrafo anterior la MT históricamente fue considerada una molécula cuya función principal era la regulación de ciclos circanuales y circadianos, por lo que en reproducción su estudio se centró inicialmente a determinar su participación en la estacionalidad reproductiva. Años después, gracias a diversos descubrimientos esta indolamida cobraría importancia no solo como moduladora de la estacionalidad reproductiva si no como un elemento con múltiple actividad en las gónadas y órganos genitales, lo que permite el mantenimiento de la función óptima del sistema reproductivo de diversos mamíferos (Tamura

et al. 2008; Reiter et al. 2013; M. H C Cruz et al. 2014).

Melatonina en el ovario

La importancia de la MT en el ovario se ha evidenciado mayormente por los siguientes hallazgos:

(i) Presencia de la MT en el líquido folicular de la mujer, vaca y cerda.

La identificación de la presencia de esta hormona en el líquido folicular impulsó a efectuar diversos estudios que demostraron la importancia de la MT en el ovario y en el desarrollo folicular. Uno de los primeros trabajos con MT en el ovario fue reportado por Brzezinski *et al.*, (1987), quienes observaron en mujeres que las concentraciones de MT en el líquido folicular eran 3 veces mayores a las registradas en la sangre (36.5 frente a 10.1 pg./mL, respectivamente). Años después se descubrió en mujeres que las concentraciones de MT aumentan en el invierno a comparación con el verano. Un análisis más detallado de las concentraciones de MT en el líquido folicular en humanos mostró que los niveles eran dos veces más altos en los folículos humanos grandes justo antes de la ovulación en comparación con los de los folículos antrales más pequeños e inmaduros (Reiter *et al.* 2013). Estos estudios permitieron sugerir a diferentes grupos de investigación que la mayor concentración de MT en el folículo que en la sangre y el incremento en las concentraciones de MT durante el desarrollo folicular pueden favorecer al ovocito y a las células foliculares debido que su potente acción antioxidante protegería a estas células durante el proceso de la ovulación, que ha sido comparado con el proceso de inflamación, que se asocia con una alta producción de radicales libres (ROS). Estudios posteriores demostraron la síntesis y presencia de MT en folículos de vacas y cerdas (El-Raey *et al.* 2011; Shi *et al.* 2009), lo que apoya la hipótesis de que la MT juega un papel importante en la fisiología folicular en mamíferos.

(ii) Síntesis de N-acetil serotonina O-metiltransferasa, (enzima asociada a la producción de MT) en las CC de vaca

Después de identificar la presencia de MT en el folículo la siguiente pregunta fue ¿Cuál es su origen? Diversos autores sugirieron que su origen era exclusivamente el resultado de su captación activa desde la sangre en contra de su gradiente de concentración. Sin embargo, tiempo después se encontró que existen células ováricas que sintetizan melatonina y que, obviamente, podrían liberarla hacia el líquido folicular. Una de las enzimas evaluadas e identificadas en el cúmulo bovino fue la enzima acetil- serotonina metil transferasa (ASMT) enzima final en la síntesis de la MT por lo que se sugirió que su presencia en estas células les brinda la capacidad de producir esta indolamida. Si bien todavía existe un debate sobre este tema, a menudo se cree que la ASMT es la enzima limitante de la velocidad en la síntesis de MT. Si la MT se produce en células de cúmulos

bovinos, es poco probable que sea una característica de una sola especie; por lo tanto, es fácil imaginar que la melatonina en el líquido folicular puede ser sintetizada en el folículo de los mamíferos (El-Raey et al. 2011).

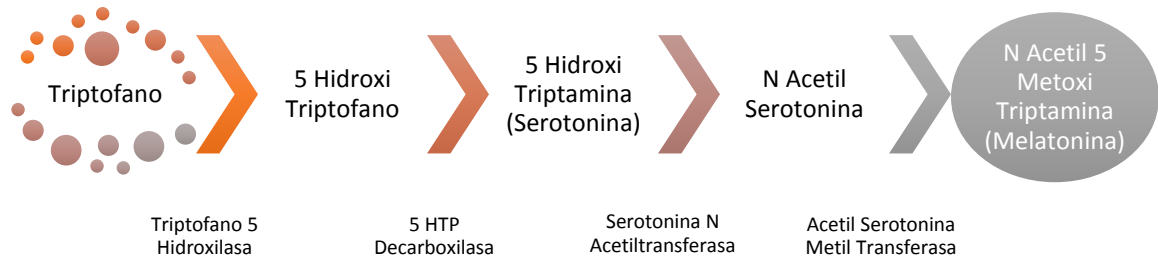


Figura 11 Representación esquemática de la síntesis de melatonina a partir del aminoácido triptófano. El triptófano, que se extrae de la sangre, a través del esquema de la vía de cuatro pasos, se convierte en N-acetil-5-metoxitriptamina (melatonina).

- (iii) Identificación de los receptores MT1 y MT2 en las CG de mujer, el folículo antral y cuerpo lúteo (CL) de rata y en las CG y COC de vaca.

Al igual que en otros órganos, en el ovario la MT lleva a cabo sus acciones mediante sus receptores de membrana MT1/MT2 y se ha sugerido que posiblemente también a través de la superfamilia del receptor nuclear RZR/ROR. La cascada de transducción de señales de los receptores MT1 / MT2 a menudo resulta en la inhibición de la producción AMPc, lo que conduce a una reducción de la actividad de la proteína quinasa A. Si bien esta es una regla general, los receptores de MT también se han asociado con otras vías de señalización. Los receptores MT1 y MT2 en el ovario se han localizado específicamente en las CG y CL en el ser humano, en las células foliculares antrales y lúteas de la rata y en las CG y COC de la vaca. Además, se ha identificado el receptor MT1 en GC y CC de la cerda, así como en el folículo antral y células lúteas de la yegua. (El-Raey et al. 2011; Yie, Niles, and Younglai 1995; Soares et al. 2003; S. J. Wang et al. 2012; Kang et al. 2009; Pedreros, Ratto, and Guerra 2011)

Alrededor de los hallazgos descritos anteriormente se han generado muchas preguntas y una de las más importantes ha sido ¿Cuál es el papel de la MT en el ovario?; la respuesta se ha ido enriqueciendo cada día más con cada investigación nueva. De manera general se ha sugerido que esta la MT regula diferentes vías de señalización en el folículo,

principalmente en las células de la granulosa y el ovocito. La acción de la MT en estas células esta mediada principalmente por los receptores de membrana MT1 y MT2 y posiblemente por sitios de unión en el núcleo y el citoplasma. Además de las acciones mediadas por su receptor, la MT también actúa de manera directa captando los radicales libres, lo que reduce los niveles de estrés oxidante en el folículo y principalmente en el ovocito. Esta hormona además de tener un efecto directo como antioxidante puede también estimular enzimas que participan en el metabolismo de radicales libres, reduciendo la presencia de estos productos tóxicos (Tamura et al. 2012a). Gracias al conocimiento del papel que desempeña la MT en el ovario y en el desarrollo folicular en condiciones *in vivo*, esta hormona se ha incluido en los protocolos de MIV y/o cultivo embrionario de ratones, ovejas, cabras, cerdos, bovinos, búfalos y conejos; con resultados favorables (Adriaens et al. 2006; Kang et al. 2009; Manjunatha et al. 2009; Vázquez et al. 2010; El-Raey et al. 2011; F. Wang et al. 2013; Fu et al. 2014; Mehaisen and Saeed 2014).

Melatonina; favorece la maduración competente del ovocito y la producción de embriones en ambientes in vitro

La adición de MT a protocolos de MIV y cultivo embrionario ha tenido un impacto positivo en diferentes especies. De manera general ha contribuido a incrementar el número de ovocitos que llegan a un estado competente y ha mejorado la eficiencia en la producción de embriones *in vitro*. Como se observar en el [cuadro 1](#); la adición de MT a los medios de MIV mostró principalmente los siguientes efectos: i) citoprotección: reduciendo el estrés oxidante y limitando la apoptosis y ii) modulación genética, controlando el reinicio de la maduración nuclear, la maduración citoplasmática, la expansión del cúmulo y otros eventos. Durante el cultivo embrionario esta hormona igualmente mostró efectos citoprotectores, de modulación genética y de reprogramación epigenética. Tal y como ocurre en el ovario sus acciones en condiciones *in vitro* están mediadas por sus receptores o por acción directa sobre los radicales libres.

En equinos poco se sabe sobre el efecto de la MT en el ovario (Pedreros, Ratto y Guerra, 2011) y hasta la fecha no se han publicado datos sobre su efecto durante la MIV. Sin embargo basados en los reportes previos es posible que esta hormona sea un elemento importante en este proceso y que contribuya a que el COC equino madure adecuadamente.

Cuadro 1 Reportes sobre los efectos de la adición de melatonina a los medios de cultivo de ovocitos y embriones en mamíferos domésticos.

Autor	Técnica	Principales efectos de la adición de melatonina
Saeedabadi et al., 2007	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos caprinos	Afecta el patrón de metilación del ADN, lo que conduce a una mejora en la competencia de desarrollo de los ovocitos
Rodriguez-Osorio et al., 2007	Producción de embriones <i>in vitro</i> en cerdos	Efecto positivo sobre las tasa de escisión del embrión y el número total de células del blastocito y protege contra el estrés por calor
Tamura et al., 2008	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos humanos	Protege a los ovocitos del estrés oxidativo
Manjunatha et al., 2009	Producción de embriones <i>in vitro</i> en búfalos	Disminuye el estrés oxidativo lo que mejora la eficiencia de producción de embriones <i>in vitro</i>
Kang et al., 2009	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos porcinos	Mejora la maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos. Sus efectos pueden modularse con o sin la unión a sus receptores
Shi et al., 2009	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos porcinos	Puede mejorar la maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos porcinos y su desarrollo embrionario partenogenético.
El-Raey et al., 2011	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos bovinos	Reduce el nivel de producción de especies reactivas a oxígeno y regula la maduración de los ovocitos
Nakano, Kato and Tsunoda, 2012	Producción de embriones <i>in vitro</i> en cerdos	La MT disminuye las especies reactivas a oxígeno en embriones clonados
Takada et al., 2012	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos bovinos	Protege a las CC del daño del ADN, pero no influyó en el desarrollo del embrión <i>in vitro</i>
Pang et al., 2013	Producción de embriones <i>in vitro</i> en cerdos	Mejora el desarrollo de embriones clonados y mejora la calidad del embrión al inhibir la vía apoptótica mediada por p53
Lord et al., 2013	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos murinos	Retrasa el inicio de la apoptosis de ovocitos post-ovulatorio; mejora la calidad de los blastocitos resultantes
Mehaisen and Saeed, 2014	Producción de embriones <i>in vitro</i> en conejos	Mejora el desarrollo de las mórulas; dosis altas (10^{-3} M) afecta el desarrollo embrionario
Tian et al., 2014	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos bovinos	Promueve la expresión de genes asociados con la maduración y expansión del cúmulo y participa en la reprogramación epigenética.

Li <i>et al.</i> , 2015	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos porcinos	Protege a los ovocitos contra el estrés térmico
Su <i>et al.</i> , 2015	Producción de embriones <i>in vitro</i> en bovinos	Reduce la apoptosis y la producción de ROS en embriones clonados, mejora la calidad del blastocito. Mejora la eficiencia de la clonación bovina.
Rodrigues-Cunha <i>et al.</i> , 2016	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos bovinos	Estimula la reanudación de la meiosis y el desarrollo posterior del embrión. Muestra efectos citoprotectores sobre los complejos cúmulo-ovocito
Liang <i>et al.</i> , 2017	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos bovinos	Mejora la calidad de ovocitos bovinos envejecidos y la capacidad de desarrollo de los embriones tempranos.
Zhao <i>et al.</i> , 2018	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos bovinos	Regula eventos de maduración citoplasmática

Materiales y Métodos

“No es sobre las ideas. Sino hacer que éstas se vuelvan realidad”

- Scott Belsky

A menos que se especifique lo contrario, todos los productos químicos y reactivos se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.).

Recolección de tejido ovárico y células foliculares

Para identificar los componentes del sistema melatoninérgico en el folículo equino y evaluar los efectos de la MT en COC durante su MIV, se obtuvieron ovarios de yeguas adultas durante la época ovulatoria, sin tomar en cuenta la etapa del ciclo estral en que se encontraran. Los ovarios se obtuvieron en dos rastros diferentes; uno cerca de la ciudad de México y otro cerca de St-Hyacinthe, Montreal, Canadá. En ambos sitios los ovarios fueron transportados dentro de los primeros 90 minutos después de su obtención al laboratorio correspondiente, a una temperatura de 22°C en contenedores aislantes. El tejido ovárico se diseccionó cuidadosamente para acceder a folículos clasificados de acuerdo a su diámetro (con un diámetro menor de 15mm, mayores de 15mm pero menores de 30 y mayores de 30mm), cuerpos hemorrágicos (CH) y cuerpos lúteos (CL), para procesarlos para inmunofluorescencia. Tanto las CG como las CT se obtuvieron a partir de folículos de entre 15 y 30 mm de diámetro. Las CG se obtuvieron por disección de acuerdo a lo descrito por Zeebaree *et al.*, (2018), mientras que las CT se colectaron con el sistema descrito por Roberts y Skinner (1990). Ambos tipos de células foliculares se procesaron después de su recolección para la extracción de ARNm y proteína. Las células lúteas fueron colectadas de cuerpos lúteos con diámetro superior a los 30 mm y se procesaron para la extracción de proteína. Los COC se recuperaron por aspiración de las paredes de folículos menores a 30 mm con una bomba de succión (aproximadamente 40 mL/min) y se colocaron en un medio de recuperación de ovocitos (EquiPro OPU; MOFA Global, Verona, WI, EE. UU.) de acuerdo a lo descrito por Diaw *et al.*, (2018). Solo los COC conformados por un ovocito con citoplasma homogéneo y con más de una capa de CC fueron utilizados para MIV ([anexo 7](#)) o desnudados por pipeteo en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para separar las CC del ovocito para su análisis genético ([figura 12](#)).

Cuadro 2 Primers usados en el PCR en tiempo real.

Genes	Secuencias de Primers		Tamaño de Fragmento (bp)
	Adelante (5'-3')	Reversa (5'-3')	
<i>MT1</i>	TGC CCA ACT TGC ATA TCG GA	AAC TGA CAG ACT GGG CGA AC	75
<i>MT2</i>	TCC GGA ACC CAG GTA ATT TGT T	CAC AAG AAT TAG GGG GTA GGG G	93
<i>ASMT</i>	CTT CGA CCT GTC GTC GTT CC	CCA GAA CAG CCA GCT TAC GG	147
<i>AREG</i>	TCC TCG GCT CAG CCC ATT AT	ACAGGGGAGATCTCACTTCCTGA	129
<i>EREG</i>	ACA ATC CAC GTG TGG CTC AA	AAC CCA CTT CAC ACC TGC AA	126
<i>HAS2</i>	ATT TTG GAA ACT GCC CGC CA	CAC AAT GCA TCT TGT TCA GCT CT	91
<i>PTGS2</i>	CCC CCA GGG CAC AAA TAT GA	TGA CTT AAA TCC ACC CCG TGA C	126
<i>TNFAIP6</i>	GAA GGC GGT GTG TGA ATA CGA	GGCTTCACAATGGGGTATCCA	137
<i>ADAMTS1</i>	TCT CAC CAA AGG ACA GGT GC	CCA TCT ACC ACC TTG GGC TG	85
<i>GSTM3</i>	GCA CAA TAT GTG TGG CGA GA	CAG TTG CAT GCG GAA ATC CA	85
<i>PRDX2</i>	CCA CCT GGC TTG GAT CAA CA	ATC GTG GGA CAA GCT TCT GG	97
<i>GLRX</i>	AGG AGC CAG AAC GGT ACC TC	TGC CCA CTC TGA TGC ATG TT	87
<i>BCL2</i>	GGA TTG GTG GAA TCT TTG CCT	GTC TAC TTC CTC TGT GAT GTT GTA T	109
<i>BAX</i>	ATC ATG AGC CAC CTC AGT TCC	TGG ATG AAA CCC TGA AGC AAA AGG	137
<i>GAPDH</i>	TGA TTC CAC CCA TGG CAA GT	CAT CGC CCC ATT TGA TGT TG	122
<i>ACTB</i>	GCA CCA GGG CGT GAT GG	TCG ATG GGG TAC TTG AGG GT	89

Análisis de la expresión génica

El ARN de las CG y CT se extrajo con TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Mientras que el ARN de las CC y ovocitos se extrajo usando el kit de extracción de ARN PicoPure (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración del ARN total se determinó midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm utilizando un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.). La transcripción inversa de 100 ng de ARN se llevó a cabo utilizando SuperScript IV VILO master mix (Invitrogen). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real se llevó a cabo en un volumen de reacción de 15 µL, utilizando 2× SsoAdvanced universal SYBR Green supermix y el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX-96 (Bio-Rad Laboratories Ltd., CA, EE. UU.). Los primers específicos para equinos utilizados para el análisis de expresión de genes blanco se proporcionan en el [Cuadro 2](#). Antes de su uso los primers fueron evaluados para verificar

su identidad, eficiencia y repetitividad. La identidad fue corroborada por la secuenciación de los productos de los pares de primers. Las eficiencias de amplificación de los primers estuvieron entre el 95% y el 108%, dependiendo del par evaluado. Los genes de referencia utilizados, ACTB y GAPDH, se determinaron utilizando el software geNorm (Ramakers et al., 2003). Los valores del ciclo de cuantificación (Cq) de ACTB y GAPDH no difirieron con los tratamientos informados en el estudio actual. Las condiciones del ciclo térmico fueron de 3 minutos a 95°C; seguido de 40 ciclos de 15s a 95°C, 30s a 60°C y 30s a 72°C. Las muestras se analizaron por duplicado y los datos se normalizaron con la media geométrica de los genes de referencia mediante el método $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$ (Pfaffl 2001). Se analizaron cuatro réplicas de cada experimento en la misma placa. Los coeficientes de variación promedio fueron 0.1% y 11% para los valores de Cq y $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$, respectivamente.

Identificación de los receptores MT1/MT2 en células de la granulosa, células de la teca y células lúteas por inmunotransferencia

Después de la recolección de las CG, CT y CL, las células fueron lavadas en PBS frío, se lisaron en buffer RIPA frío (Tris-HCl Ph 25 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 1%, SDS al 0,1%, Orovanadato de sodio 1 mM, y cóctel inhibidor de proteasa). Después de la adición del buffer, las células fueron sujetas a un procedimiento de lisis para obtener la proteína con un taladro especial (Politron PT-MR2100, Kinematica AG, Luzen, Switzerland). Todos los procedimientos se llevaron a cabo en condiciones de temperatura baja de 4 a 6°C para prevenir la desnaturalización proteica. Una vez que las proteínas fueron obtenidas por la lisis, las muestras fueron centrifugadas a 6,000 g durante 25 min a 4°C. El sobrenadante resultante se conservó y almacenó a -20 °C. Las muestras fueron diluidas en solución Laemmli y se corrieron electroforéticamente en geles de SDS-poliacrilamida al 12% durante dos horas a 120-150 V (15 µL de proteína total por pozo). Para determinar la movilidad relativa de las proteínas, se utilizaron marcadores de peso molecular pre teñidos (BIO-RAD Laboratories Inc. Hercules, CA, USA). Después de la electroforesis, los geles fueron equilibrados en buffer de transferencia y las proteínas se transfirieron electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa en un aparato de celda de transferencia húmeda Bio-Rad por una hora a 300 mA (buffer de transferencia: glicina 39 mM, base Tris 48 mM, 1% SDS, metanol al 20%, pH 8,3). Después

de la transferencia, las membranas se bloquearon con 5% de leche descremada y 1% albumina de suero bovino (BSA) disueltos en TTBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,1%, pH 7,5) durante 2h a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron durante la noche con anticuerpos primarios contra MT1/MT2 de ratón (SC398788; Santa Cruz Biotechnology) diluido en TTBS/ 5% de leche descremada / 1% BSA a 4 °C (1:300). Después de lavar tres veces con TBS, las membranas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con IgG conjugada con HRP de conejo (GE Healthcare) diluida 1:10000 en TTBS. Después de cinco lavados en TTBS, las bandas de proteínas se revelaron mediante el agregado de diaminobencidina. Se utilizó tejido de tallo cerebral (brainstem) de rata adulta como control positivo para la inmunotinción de los receptores MT1/MT2.

Identificación de receptores MT1/MT2 en tejido ovárico por inmunofluorescencia

Antes de realizar la inmunofluorescencia, el tejido ovárico se fijó en paraformaldehído al 4% durante 24 horas. Después de lavar el tejido en PBS, fue embebido en parafina para obtener las secciones de tejido que se montaron sobre portaobjetos. Las secciones de tejido después de la eliminación de la parafina se colocaron en un buffer de citrato con pH de 6 a 60 °C durante 20 minutos, posteriormente se bloquearon con PBS al 5% de BSA. Las secciones se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-MT1/MT2 de ratón (SC398788; Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:50, en PBS al 1% de BSA. Posteriormente las secciones se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo anti-ratón IgG-Alexa 546 (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EE. UU.), diluido 1:750 en PBS al 1% de BSA. Después de enjuagar en PBS, los portaobjetos se montaron con Antifade Slow Fade (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EE. UU.). Se utilizó tejido de tallo cerebral de rata adulta como control positivo para la inmunotinción de los receptores MT1/2. Las laminillas se observaron y fotografiaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51 equipado con una cámara digital Olympus DP70 (Olympus America, Inc.). Las imágenes se digitalizaron y se elaboraron las figuras utilizando el software Adobe Photoshop 5.1 (Adobe Systems Incorporated, San José, CA, EE. UU.).

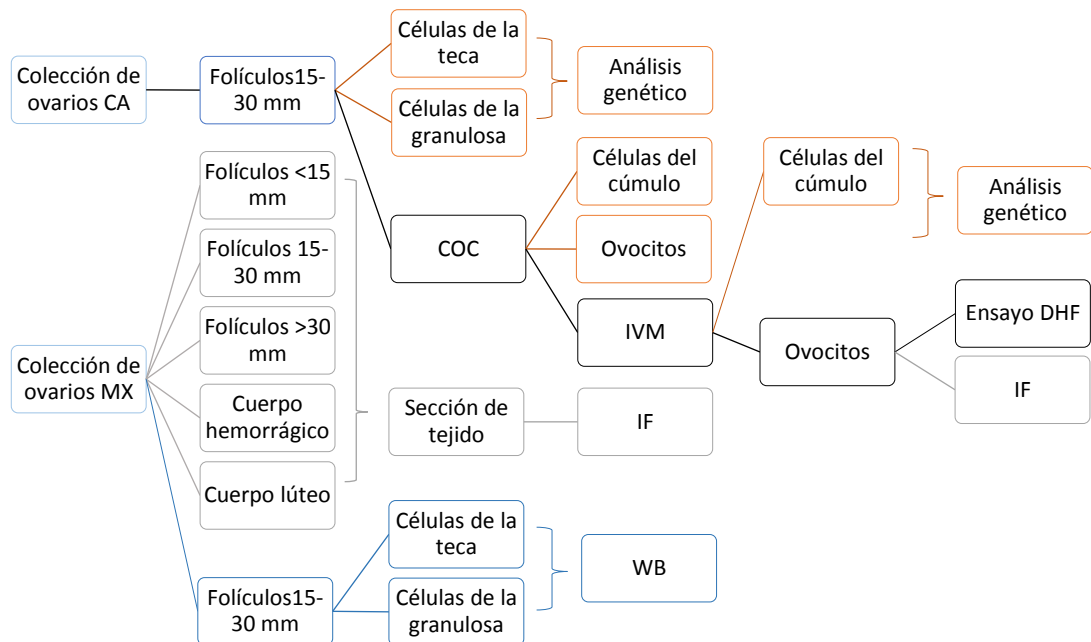


Figura 12 Colección de tejido y células ováricas para su posterior procesamiento y evaluación. Se recuperaron 272 ovarios en Canadá de los cuales se colectaron COC, CG y CT. Mientras que el México se recuperaron 54 ovarios de los cuales se colectó tejido ovárico, CG y CT. El tejido y células foliculares fueron procesados para cumplir con los objetivos del estudio (Análisis genético, inmunotransferencia, inmunofluorescencia, ensayo de diacetato de diclorohidrofluoresceína).

Maduración *In Vitro*

Después de su recuperación, los COCs se transfirieron a placas de Petri de 35 mm precalentadas a 38,2 °C y se lavaron con medio de maduración equilibrado (medio M199 con sales de Earle, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) Suplementado con SFB al 10% (Invitrogen), hormona folículo estimulante (FSH) 5 mU (Sioux Biochemicals, Sioux Center, IA, EE. UU.) y 25 µg/ml de gentamicina (Gibco, Life Technologies, NY, EE. UU.]. Posteriormente, grupos de 10 COCs se colocaron aleatoriamente en gotas de 100 µL de medio de maduración equilibrado suplementado con MT (N-acetil-5-metoxitriptamina; 10, 100 o 1000 ng/ml) o vehículo (etanol). Las gotas se cubrieron con aceite mineral (Sage, *In-Vitro* Fertilization, Inc., Trumbull, CT, EE. UU.) y se incubaron a 38.2°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ en aire, durante 10, 20 o 30 h dependiendo del experimento. Los COCs fueron desnudados por pipeteo en PBS para separar las CC del ovocito a las 10, 20 ó 30 h iniciada la MIV para su posterior evaluación ([anexo 7](#)).

Evaluación de la expansión del cúmulo

La expansión del cúmulo del COC se evaluó mediante un microscopio estereoscópico (Stemi 305 ZEISS) antes y después de las 20 y 30 h de iniciada la MIV. Esto con la finalidad de evaluar la transición del cúmulo compacto (CP) a expandido (EX). El grado de expansión del cúmulo se evaluó basándose en un sistema de clasificación descrito anteriormente por Hinrichs *et al.*, (1993). Los COC se clasificaron como CP o EX; la transición de cúmulos de CP a EX se determinó en función de la diferencia entre el número de CP al final del cultivo y el número de CP al comienzo del cultivo *in vitro*.

Evaluación de la producción H₂O₂ por los ovocitos mediante DCHFDA

El nivel de H₂O₂ en cada ovocito se examinó de acuerdo al ensayo de diacetato de diclorohidrofluoresceína (DCHFDA: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como se describió por El-Raey y colaboradores (2011) con ligeras modificaciones que se describen posteriormente. A las 10, 20 y 30h iniciada la MIV, los ovocitos se transfirieron a gotas de 100 µL de medio de cultivo que contenían 10 µM de DCHFDA. Después de 15 minutos de incubación, los ovocitos se lavaron en PBS y se transfirieron a gotas de 20 µL de PBS en Cell Imaging Dishes de 35mm (Eppendorf, NY, EE. UU) para examinarlos inmediatamente en una habitación oscura a 22°C. La intensidad de la fluorescencia se midió utilizando un microscopio epifluorescente (PALM MicroBeam Zeiss). Las fotografías de cada grupo de cultivo después de la excitación a una longitud de onda de 510 a 560 nm fueron tomadas con una cámara digital (AxioCAM MRC Zeiss). La intensidad de fluorescencia media y el área de superficie de cada ovocito se midieron usando el software NIH Image J (v. 1.40). La fluorescencia total se calculó como la fluorescencia media ("valor de gris medio") multiplicada por la superficie del ovocito ("área"). Las imágenes se digitalizaron y se elaboraron las figuras utilizando el software Adobe Photoshop 5.1 (Adobe Systems Incorporated, San José, CA, EE. UU.)

Evaluación de la supervivencia celular y la apoptosis por el ensayo de Annexin V-FICT

A las 30 h de iniciada la MIV se recuperaron las CC para la evaluación de la supervivencia celular y la apoptosis mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Las CC se tiñeron con yoduro de propidio y anexina (utilizando el kit de detección de apoptosis con anexina V-FITC de Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se evaluaron al menos 500 células por muestra utilizando un sistema FACSVantage SE (BD Biosciences, Oakville, ON, Canadá) y se analizaron utilizando el software Cell Quest Pro (BD Biosciences).

Evaluación de la apoptosis por inmunofluorescencia de caspasa 3 escindida

A las 20 y 30h de iniciada la MIV, los ovocitos se recuperaron para evaluar la activación de la caspasa 3 por inmunofluorescencia. Los ovocitos se fijaron en paraformaldehído al 4%, se lavaron en solución Triton-X al 2% y en solución tween al 0,05%, se bloquearon con PBS/5% BSA y se incubaron con el anticuerpo policlonal de conejo contra caspasa 3 escindida (dilución 1: 300; 9661S, 9661S, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). Después de la incubación con los anticuerpos primarios, los ovocitos se lavaron en PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con Cy3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE. UU.). Los ovocitos se examinaron bajo un microscopio epifluorescente PALM MicroBeam Zeiss. Las fotografías de cada grupo de cultivo después de la excitación a una longitud de onda de 600 a 700 nm fueron capturadas con una cámara digital (AxioCAM MRC Zeiss). La fluorescencia de Cy3 se cuantificó utilizando el software ImageJ (versión 1.40; NIH of Health, Bethesda, MD, EE. UU.). Las imágenes se digitalizaron y se elaboraron las figuras utilizando el software Adobe Photoshop 5.1 (Adobe Systems Incorporated, San José, CA, EE. UU.).

Análisis estadístico

Todos los datos de porcentaje se sometieron a transformación de arcoseno antes del análisis estadístico. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía, seguido de HSD

de Tukey a las 10, 20 y/o 30 horas dependiendo del ensayo. Todos los análisis y gráficos se generaron con el paquete de software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EE. UU.). Los resultados se presentan como la media + desviación estándar (DS), todos los experimentos se repitieron al menos cuatro veces. Las diferencias se consideraron significativas en * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

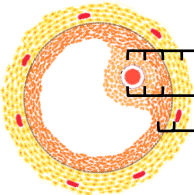
Resultados

“Está bien celebrar el éxito pero es más importante prestar atención a las lecciones del fracaso”.
-Bill Gates

Expresión de receptores MT1-MT2 y la enzima ASMT en células foliculares

La expresión de mRNA codificante para los receptores MT1 y MT2, y la enzima ASMT fue detectada diferencialmente en células foliculares de folículos entre 15 a 30 mm de diámetro. El ovocito al igual que las CC expresan mRNA codificante para los receptores de melatonina MT1 (ovocitos Ct 31; CC Ct 32) y MT2 (ovocitos Ct 25; CC Ct 26). Sin embargo, los ovocitos y las CC no mostraron expresión para la enzima ASMT (*Cuadro 3; Ovocito, Cúmulo*). Las CG expresan mRNA codificante para los receptores de melatonina MT1 (Ct 26), MT2 (Ct 31) y para la enzima ASMT (Ct 28) (*Cuadro 3; Granulosa*). Las CT expresaron mRNA codificante para el receptor MT1 (Ct 31) y para la enzima ASMT (Ct 31), pero no se detectó expresión del receptor MT2 (*Cuadro 3; Teca*).

Cuadro 3 Expresión de ASMT y de los receptores MT1 and MT2 en células foliculares ováricas de la yegua

	Gen	Células foliculares			
		Ovocito	Cúmulo	Granulosa	Teca
	MT1	Presente	Presente	Presente	Presente
	MT2	Presente	Presente	Presente	No hallado
	ASMT	No hallado	No hallado	Presente	Presente
	GAPDH	Presente	Presente	Presente	Presente
	ACTB	Presente	Presente	Presente	Presente

La expresión genética fue evaluada por qPCR en tres réplicas independientes.

Síntesis de receptores MT1/MT2 en células de la granulosa, teca y cuerpo lúteo

La identificación de la síntesis proteica por inmunotransferencia mostró que las CG y CT sintetizan una región interna común para los receptores MT1 y MT2 (*Figura 13; Granulosa, Teca*). Adicionalmente las células lúteas también mostraron inmunoreacción positiva al anticuerpo anti MT1/MT2 (*Figura 13; Lúteas*).

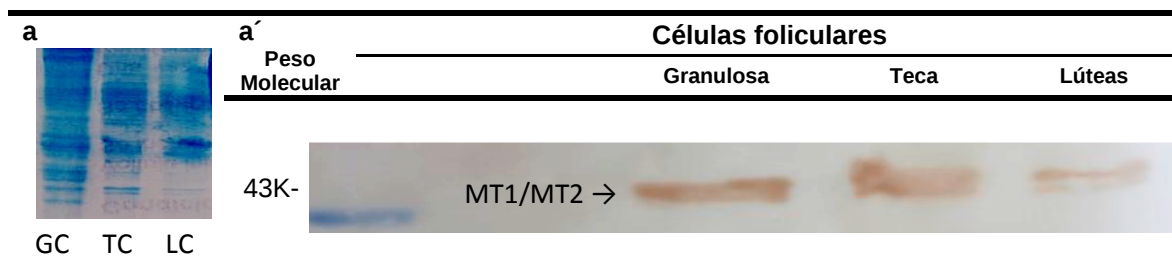


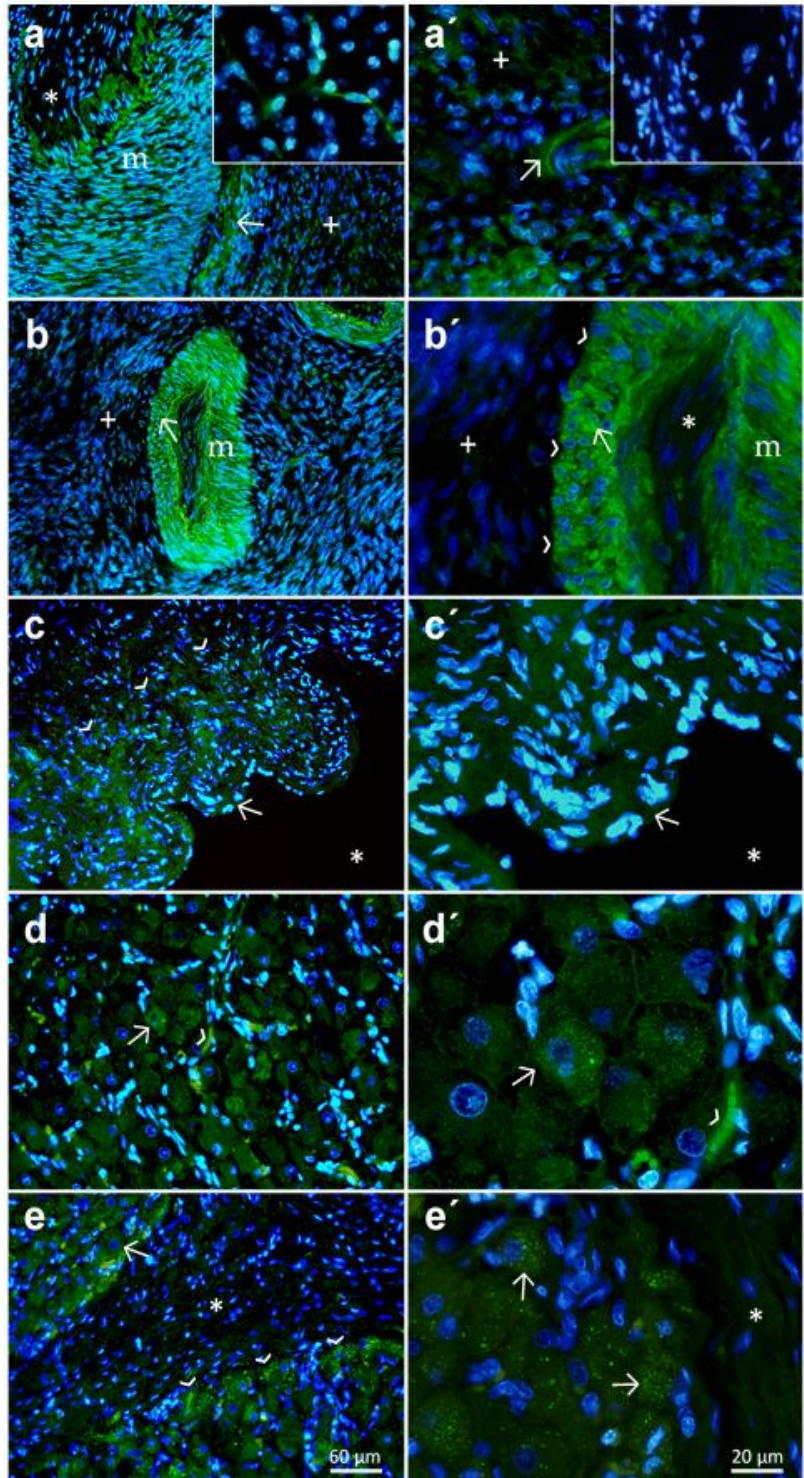
Figura 13 Síntesis de los receptores MT1 y MT2. Células foliculares y lúteas fueron colectadas de folículos entre 15 a 30 mm o cuerpos lúteos entre 20 a 30 mm de diámetro provenientes de diferentes ovarios (ovarios n = 24). Las células foliculares y lúteas fueron procesadas para la extracción de proteínas para su posterior inmunotransferencia (n=8 réplicas independientes). a') Todas las células evaluadas mostraron inmunoreactividad positiva para el anticuerpo anti MT1/MT2. Se consideró como control positivo tallo encefálico de rata no se muestra imagen. a) Foto del gel resultado de la electroforesis; muestra presencia de proteína en las células evaluadas GC, células de la granulosa. TC, células de la teca. LC, células lúteas.

Localización de los receptores MT1/MT2 durante el desarrollo folicular, cuerpo hemorrágico y cuerpo lúteo

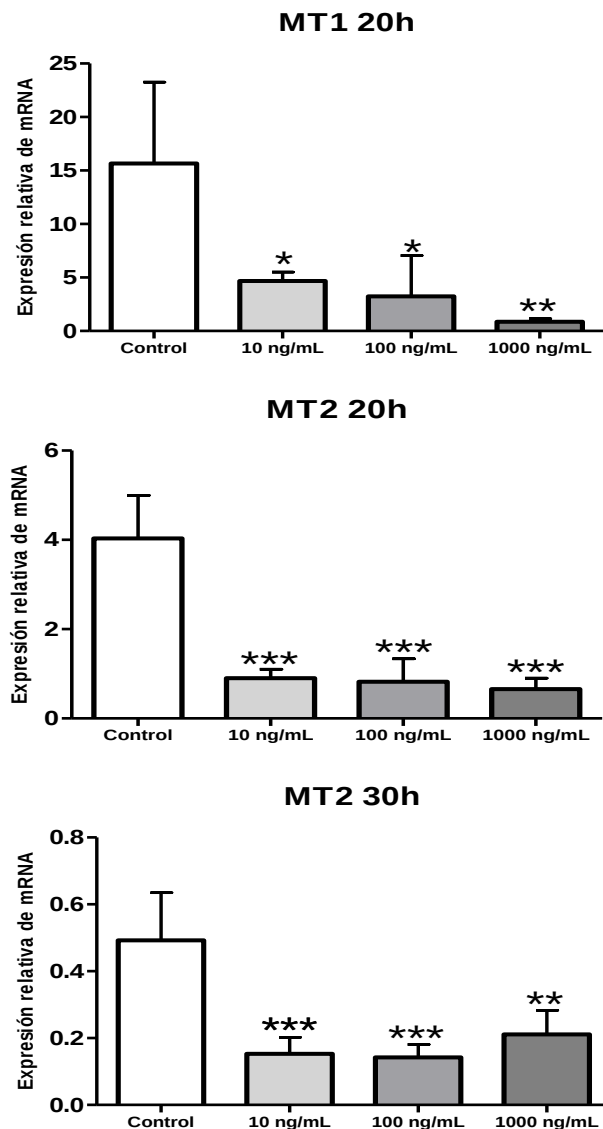
El anticuerpo anti MT1/MT2 mostró inmunotinción en diferentes zonas de los folículos evaluados además del CH y CL. En los folículos < a 15 mm de diámetro la inmunotinción fue positiva en la muscular de los vasos sanguíneos y las células de la teca, que los rodean (intensidad menor), la inmunotinción se fue perdiendo al acercarse al lumen del folículo (*figura 14 a y a'*). En los folículos de 15 a 30 mm de diámetro, la inmunotinción mostró un incremento en la muscular de los vasos sanguíneos con respecto a los folículos < a 15 mm y parecido a lo observado en estos folículos se detectó inmunotinción en las células de la teca, la cual disminuía al acercarse al lumen folicular (*figura 14 b y b'*). Los folículos > a 30 mm mostraron disminución de la inmunotinción en las células de la teca y un aparente incremento en las células de la granulosa, mostrando una mayor intensidad alrededor del lumen del folículo (*figura 14 c y c'*). La distribución de la inmunotinción para los receptores MT1/MT2 durante el desarrollo folicular mostró un patrón de oleada que inicia en las células de la teca en folículos < a 15 mm y se desplaza hacia el límite de la luz folicular en folículos preovulatorios (> a 30mm). El cuerpo hemorrágico presentó inmunotinción en las células lúteas, en las cuales se puede observar la presencia de los receptores en la membrana celular (*figura 14 d y d'*). El cuerpo lúteo al igual que el cuerpo hemorrágico presentó

inmunotinción positiva en las células lúteas, las cuales presentaron gránulos citoplasmáticos de MT1/MT2 (*figura 14 d y d'*).

Figura 14 Localización de los receptores MT1 y MT2 en los folículos, cuerpo hemorrágico y cuerpo lúteo. Tejido ovárico fue recuperado de folículos entre 15 a 30 mm y cuerpos hemorrágicos o lúteos entre 20 a 30 mm de diámetro provenientes de diferentes ovarios (ovarios n = 26). El tejido folicular fue fijado y embebido en parafina para después ser procesado para inmo fluorescencia. (n=6 réplicas independientes). Todos los tejidos evaluados mostraron inmunotinción positiva para el anticuerpo MT1/MT2 en diferentes zonas. a y a' folículo menor de 15 mm de diámetro: *, representa el lumen del vaso sanguíneo. m, muscular del vaso sanguíneo. →, marca positiva a MT1/MT2. +, reducción de la inmunotinción. Recuadro superior izquierdo en a, control positivo, neuronas del tallo encefálico de rata. Recuadro superior izquierdo en a', control negativo: células lúteas incubadas solo con PBS más BSA; b y b' folículo de 15 a 30 mm de diámetro: *, lumen del vaso sanguíneo. m, muscular del vaso sanguíneo. →, marca positiva a MT1/MT2. +, células de la teca con poca inmunotinción; c y c' folículo mayor de 30 mm: *, representa el lumen folicular. →, marca positiva a MT1/MT2. », aumento de la inmunotinción en células de la granulosa; d y d' cuerpo hemorrágico. →, marca positiva en células lúteas se observan gránulos en el citoplasma celular y en la membrana. e y e' cuerpo lúteo. *, septo. →, marca positiva en células lúteas se observan gránulos en el citoplasma celular. », incremento de la marca positiva en distribución granular en las células lúteas del borde del septo del cuerpo lúteo.



Efecto de la melatonina sobre la expresión de MT1 y MT2 en las CC durante la maduración *in vitro* del COC



La evaluación de la expresión de mRNA codificante para los receptores MT1 y MT2 no mostró cambios con la adición de MT al medio a las 10 h de iniciada la MIV. A las 20 horas de iniciada la MIV se observó una reducción respecto al grupo control con la adición de MT (*figura 15. MT1 20h*: 10ng/mL y 100ng/mL $P < 0.05$ y 1000ng $P < 0.01$; *MT2 20h*: 10, 100 y 1000 ng/mL $P < 0.001$). A las 30 horas de iniciada la MIV se mantuvo la reducción en la expresión de MT2 por la adición de MT (*figura 15. MT2 30h*: 10 y 100 ng/mL $P < 0.001$, 1000 ng/mL $P < 0.01$). Adicionalmente los niveles más altos de expresión de MT1 y MT2 en los grupos control se observaron a las 20 horas, mientras que los niveles más bajos se observaron a las 30 horas (Anexo 2, *figura 25*).

Figura 15. Expresión de receptores MT1 y MT2 en células del cúmulo durante la maduración *in vitro* del COC adicionado con MT. Los grupos de COC (n=10) se cultivaron bajo diferentes dosis de MT (10, 100 y 1000 ng / ml) o sin MT (control). El ARN total de las CC se recuperó a las 10, 20 y 30 h de iniciada la MIV y se analizó mediante PCR en tiempo real. Los datos de expresión génica se normalizaron utilizando el método Pfaffl (2001). Los datos se presentan con la media + DS (n=4 réplicas de cultivos independientes); los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; ANDEVA de una vía, seguido de HSD de Tukey)

Efecto de la melatonina en la expresión de genes relacionados con el metabolismo antioxidante en las CC durante la maduración *in vitro* del COC

La evaluación de la expresión de mRNA codificante para GST M3, PRDX2 y GLRX (genes relacionados con el metabolismo oxidante) no mostró cambios con la adición de MT al medio de cultivo a las 10 horas de iniciada la MIV (Anexo 3, [figura 26; 10h](#)). A las 20 horas de iniciada la MIV la expresión de mRNA codificante para GST M3 y PRDX2 mostró una reducción respecto al grupo control con la adición de MT ([figura 16: GSTM3 20h 10, 100 y 1000 ng/mL P<0.001](#); [PRDX2 20h 10 y 100 ng/mL P<0.05](#), 1000 ng/mL P<0.01). Finalmente a las 30 horas de iniciada la MIV no se mostraron cambios en la expresión de GST M3, PRDX2 y GLRX por la adición de MT (Anexo 3, [figura 26; 30h](#)).

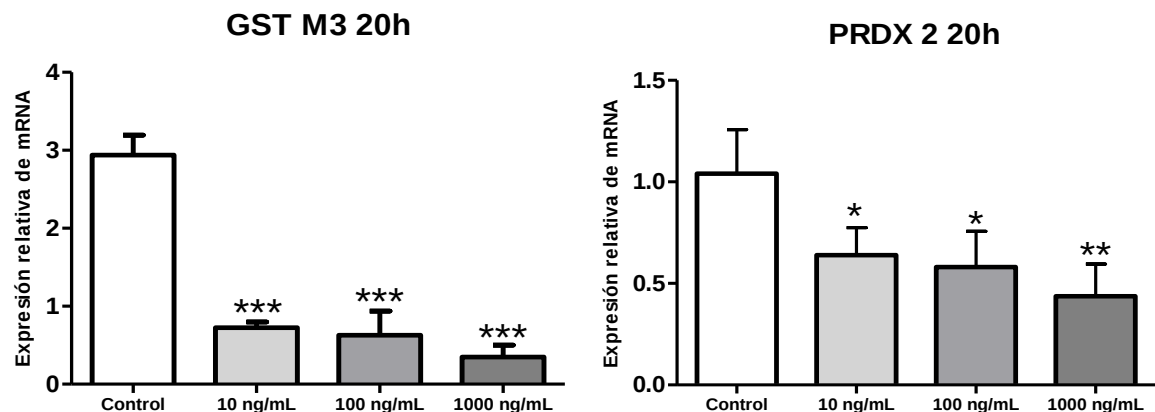


Figura 16 Expresión de GST M3, PRDX2 en células del cúmulo durante la maduración *in vitro* del COC adicionado con MT. Los grupos de COC (n=10) se cultivaron bajo diferentes dosis de melatonina (10, 100 y 1000 ng/ml) o sin melatonina (control). El ARN total de las CC se recuperó a las 10, 20 y 30 h iniciadas la MIV y se analizó mediante PCR en tiempo real. Los datos de expresión génica se normalizaron utilizando el método Pfaffl (2001). Los datos se presentan con la media + DS (n=4 réplicas de cultivos independientes); los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (*P <0.05, **P <0.01 y ***P <0.001; ANDEVA de una vía, seguido de HSD de Tukey)

Melatonina reduce la producción de H₂O₂ en los ovocitos durante la maduración *in vitro* del COC

El ensayo de dihidrofluoresceína DHF en ovocitos reveló que a las 20 h de iniciada la MIV la producción de H₂O₂ disminuye respecto al grupo control con la adición de 1000 ng/mL MT (P<0.001). A las 30h la adición de 10, 100 (P<0.01) y 1000 (P<0.001) ng/mL de MT al medio de cultivo redujo la producción de H₂O₂ comparado contra el grupo control (*figura 17; 20h y 30h*).

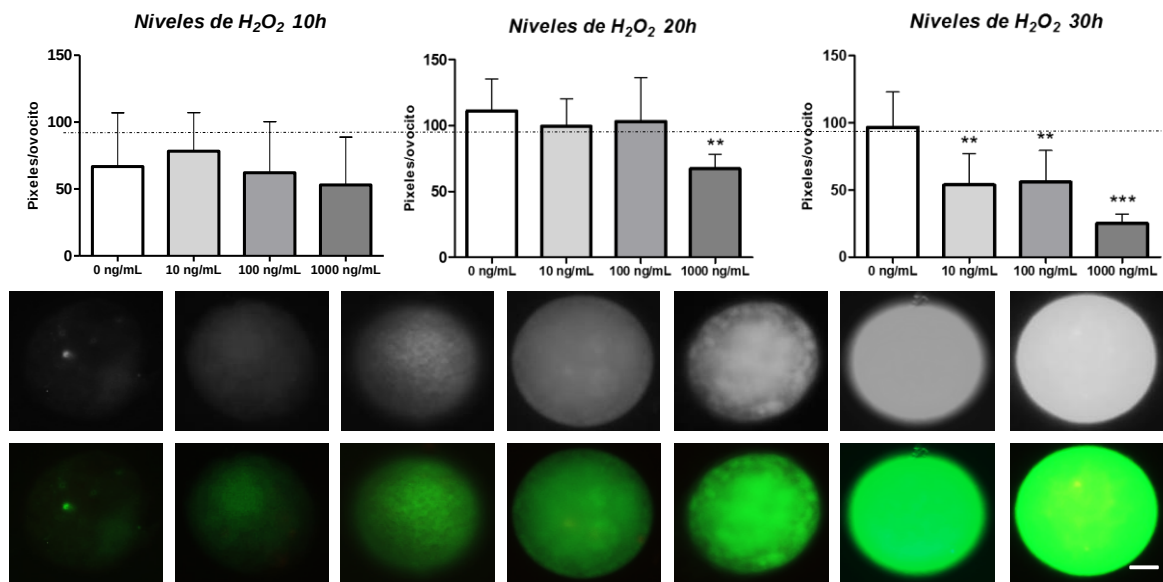


Figura 17 Producción de H₂O₂ en los ovocitos durante la maduración *in vitro* del COC adicionado con MT. Grupos de COCs (n = 10) se cultivaron bajo diferentes dosis de MT (10, 100 y 1000 ng/ml) o sin MT (control). Los ovocitos se recuperaron a las 10, 20 y 30 h de iniciada la MIV y se analizaron mediante el ensayo de DHF. Los datos se presentan con la media + DS (n=4 réplicas de cultivos independientes); los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (**P <0.01, ***P <0.001; ANDEVA de una vía, seguido de HSD de Tukey). Línea puntada indica la media de la producción de H₂O₂ de ovocitos en el tiempo 0 de cultivo. a´ Imágenes de ovocitos equinos con diferentes niveles de producción de H₂O₂; línea superior ovocitos en escala de grises, línea inferior ovocitos con diferentes niveles de fluorescencia. La inmureacción determina el nivel de producción de H₂O₂, Barra representa 60 µm.

Efecto de la melatonina sobre la expresión de BAX, BCL2 y proporción BAX:BCL2 en CC durante la maduración *in vitro* del COC

La expresión de mRNA codificante para BAX y BCL2 no mostró cambios con la adición de MT al medio de cultivo a las 10 h de iniciada la MIV (Anexo 4, [figura 27; 10h](#)). A las 20 h de iniciada la MIV el ensayo mostró reducción significativa ($P < 0.001$) respecto al grupo control tras la adición de MT (10, 100 y 1000ng/ml) ([figura 18; BAX 20h, BCL2 20h](#)). A las 30 horas de iniciada la MIV se mantuvo la reducción en la expresión de BCL2 con la adición de 100ng y 1000ng de MT ($P < 0.001$) ([figura 18; BCL2 30h](#)). La evaluación de la relación BAX:BCL2 no sugirió cambios relacionados con la dosis de MT en ningún momento evaluado, (Anexo 4; [figura 27: BAX: BCL2](#)). Adicionalmente, semejante a lo observado en la evaluación de la expresión de MT1 y MT2 a las 20 horas el grupo control mostró el pico máximo de expresión de mRNA codificante para BAX y BCL2 (Anexo 4, [figura 27](#))

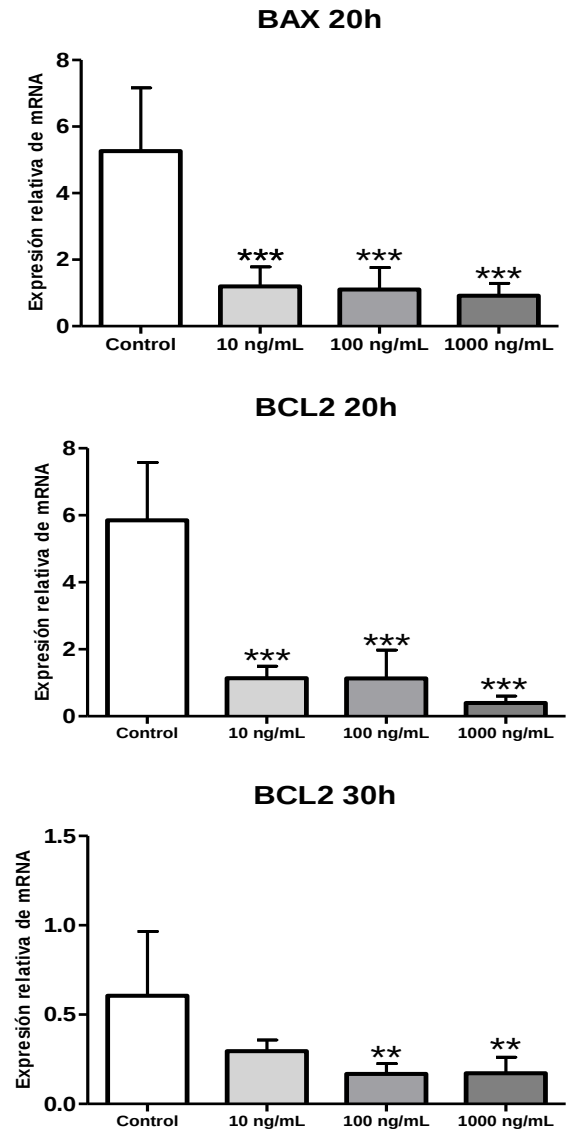


Figura 18 Expresión de BAX y BCL2 en células del cúmulo durante la maduración *in vitro* del COC adicionado con MT. Los grupos de COC (n=10) se cultivaron bajo diferentes dosis de MT (10, 100 y 1000 ng/ml) o sin MT (control). El ARN total de las CC se recuperó a las 10, 20 y 30-h de iniciada la MIV y se analizó mediante PCR en tiempo real. La relación BAX:BCL2 fue evaluada. Los datos de expresión génica se normalizaron utilizando el método Pfaffl (2001). Los datos se presentan con la media + DS (n=4 réplicas de cultivos independientes); los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; ANDEVA de una vía, seguido de HSD de Tukey)

Efecto de la melatonina sobre la supervivencia celular y apoptosis en las CC durante la maduración *in vitro* del COC

La evaluación del efecto de la MT en la supervivencia y la apoptosis de la CC a las 30 h de iniciada la MIV del COC reveló que la adición de 10 ng/ml de MT aumenta significativamente ($P < 0.05$) la proporción de CC vivas en comparación a todos los grupos ([figura 19; Células vivas 10 ng/mL](#)). La evaluación de apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis no mostro cambios con la adición de MT. (Anexo 5; [figura 28](#))

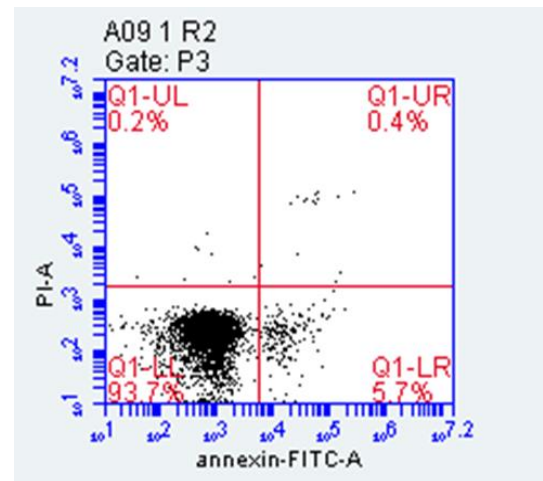
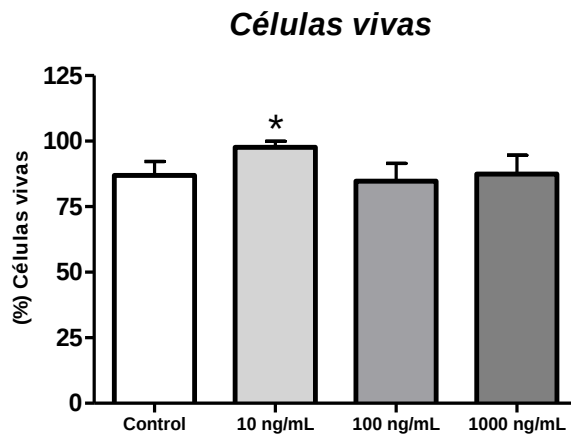


Figura 19 El efecto de la MT sobre la supervivencia y apoptosis de las CC. Los grupos de COC (n=10) se cultivaron bajo diferentes dosis de MT (10, 100 y 1000 ng/ml) o sin MT (control). Las CC fueron separadas mecánicamente de los ovocitos y recuperadas a las 30-h para ser analizadas por FACS. Los datos obtenidos en porcentaje se sometieron a transformación de arcoseno antes del análisis estadístico. Los datos se presentan con la media + DS (n=6 réplicas de cultivos independientes); los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (* $P < 0.05$; ANDEVA de una vía, seguido de HSD de Tukey)

Efecto de la melatonina sobre los niveles de caspasa 3 escindida en los ovocitos durante la maduración *in vitro* del COC

La evaluación del efecto de la MT en los niveles de caspasa 3 escindida en ovocitos reveló que la adición de 10 ng/mL de MT reduce significativamente ($P < 0.01$) los niveles de caspasa 3 escindida a las 30 horas de iniciada la MIV en comparación con el grupo control (*figura 20*). A las 20 horas no se observó ningún cambio (Anexo 6 *figura 29*)

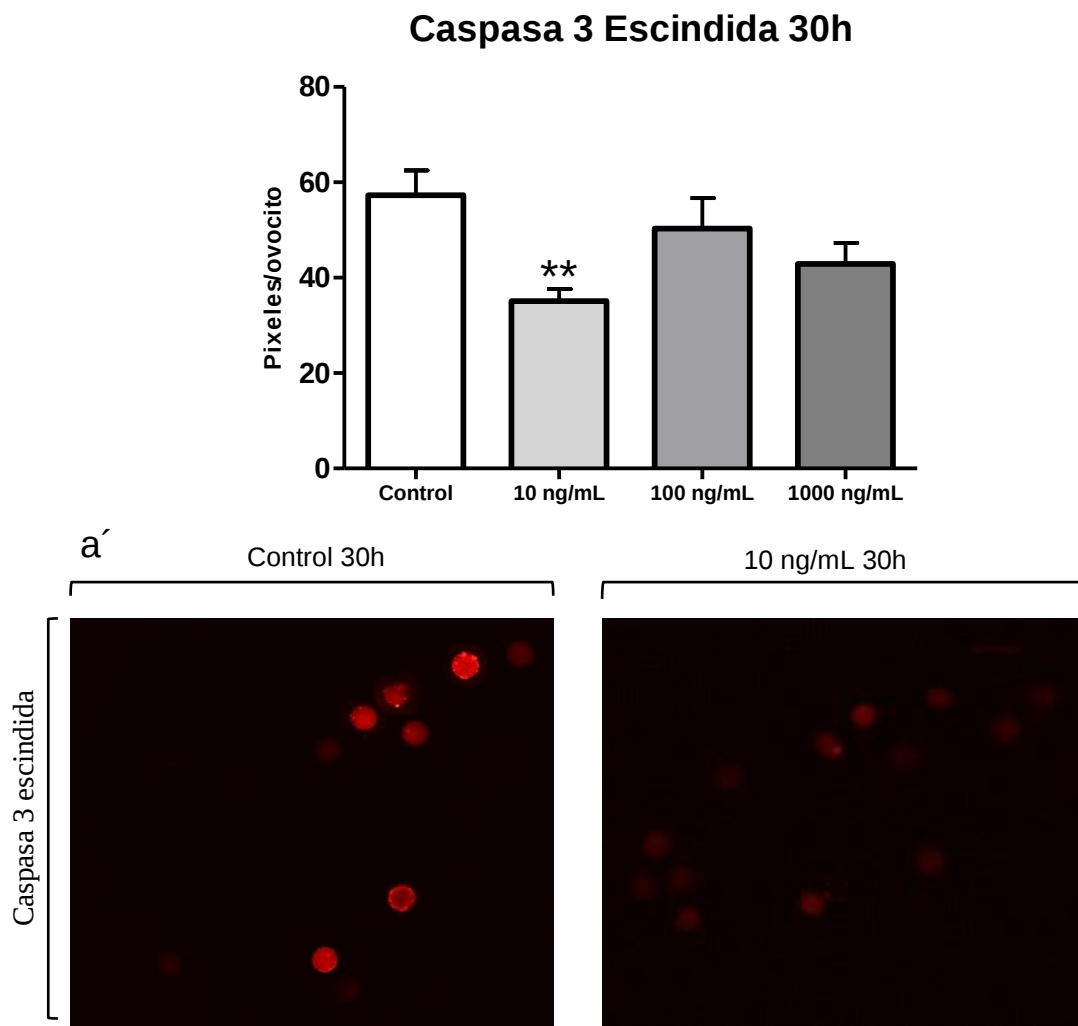
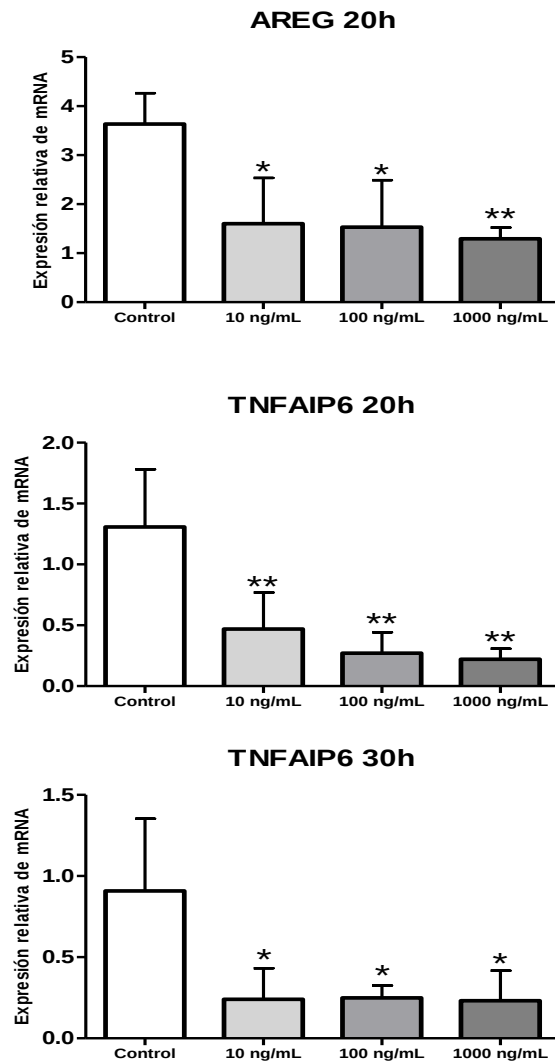


Figura 20 Niveles de caspasa 3 escindida en ovocitos durante la maduración *in vitro* del COC adicionado con MT. Los grupos de COC (n=10) se cultivaron bajo diferentes dosis de MT (10, 100 y 1000 ng/ml) o sin MT (control). Los ovocitos se recuperaron a las 20 y 30 h de iniciada la MIV y se analizaron mediante inmunofluorescencia para caspasa 3 escindida. Los datos se presentan con la media + DS (n=4 réplicas de cultivos independientes); los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (** $P < 0.01$; ANDEVA de una vía, seguido de HSD de Tukey). a' Imágenes de ovocitos equinos marcados con el anticuerpo anti caspasa 3 escindida. Barra representa 600 μ m.

Efecto de la melatonina en la expresión de AREG, EREG y genes relacionados con la expansión del cúmulo durante la maduración *in vitro* del COC



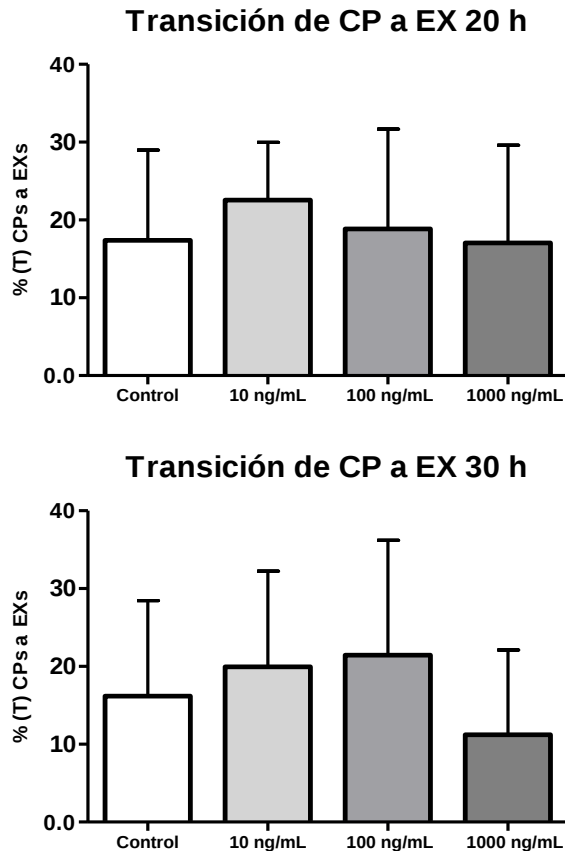
La evaluación de la expresión de mRNA codificante para AREG y EREG durante la MIV (10, 20, 30 h) mostró que la expresión de AREG se reduce significativamente respecto al grupo control a las 20 h de iniciada la MIV tras la adición de 10, 100 ($P < 0.05$) y 1000 ng/ml ($P < 0.01$) de MT (figura 21; AREG 20h). Por otro lado, la evaluación del efecto de la MT en los niveles de expresión de mRNA codificante para HAS2, TNFAIP6, PTGS2 y ADAMTS1 (genes relacionados con la expansión del cúmulo) mostró que la adición de MT (10, 100 y 1000 ng/mL) al medio de cultivo reduce la expresión de mRNA codificante para TNFAIP6 a las 20h ($P < 0.01$) y 30 h ($P < 0.01$) de iniciada la MIV. Los otros genes evaluados no mostraron cambios significativos con la adición de MT en ninguno de los tiempos evaluados (10, 20 y 30h). Sin

embargo la expresión de ARNm de todos los genes evaluados mostró una aparente reducción al avanzar el tiempo de MIV (Anexo 7, figura 30).

Figura 21 Expresión de AREG, EREG y genes relacionados con la expansión del cúmulo durante la maduración *in vitro* del COC adicionado con MT. Los grupos de COC (n=10) se cultivaron bajo diferentes dosis de MT (10, 100 y 1000 ng/ml) o sin MT (control). El ARN total de las CC se recuperó a las 10, 20 y 30 h de iniciada la MIV y se analizó mediante PCR en tiempo real. Los datos de expresión génica se normalizaron utilizando el método Pfaffl (2001). Los datos se presentan con la media + DS (n=4 réplicas de cultivos independientes); los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; ANDEVA de una vía, seguido de HSD de Tukey)

Efecto de la melatonina sobre la transición del cúmulo de CP a EX

La adición de Mt no provocó efecto sobre la transición del cúmulo de CP a EX en ningún momento evaluado (*figura 22; 20-h y 30 h*).



a'

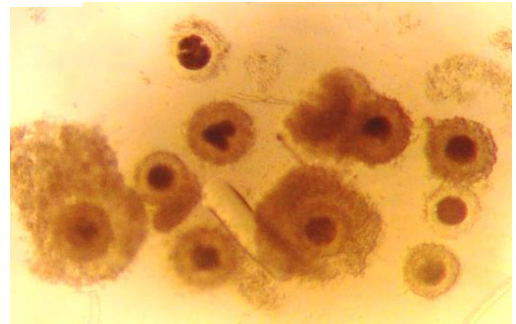


Figura 22 Transición (T) de los cúmulos de CP a EX. a. Grupos de COC (n=10) se cultivaron bajo diferentes dosis de MT (10, 100 y 1000 ng/ml) o sin MT (control). Antes de iniciar la MIV y después de 20 y 30 h iniciada la MIV la expansión del cúmulo fue clasificada en CP o EX. La transición del cúmulos de CP a EX fue determinada por la diferencia entre el número de CP a las 20 y 30 h iniciada la MIV respecto al número de CP al inicio de la MIV. Los datos fueron obtenidos a partir de cuatro (20-h) y siete (30-h) replicas independientes y se presentan con la media + DS. a'. Imagen del grupo control a 20 horas iniciada la MIV.

Discusión

“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos”
- Marie Curie

Este estudio revela que las células foliculares del equino expresan elementos melatoninérgicos que sugieren que la MT se sintetiza de manera intrínseca en los folículos y que esta hormona desempeña un rol importante durante el desarrollo folicular y la maduración del COC equino. Por otra parte mostro que la adición de melatonina promueve mecanismos de respuesta antioxidante y no altera la expresión de genes relacionados con la expansión del cúmulo. Además la adición de 10 ng/mL incrementó la supervivencia del COC; por lo que su adición a protocolos de MIV puede ser beneficiosa. Se requieren más estudios para comprender mejor el papel de la melatonina en el ovario y en la maduración *in vitro* de COCs equinos.

A partir del reporte de la síntesis del receptor MT1 en los folículos antrales y cuerpo lúteo equino (Pedreros, Ratto y Guerra 2011); surgió la pregunta de si la MT desempeña un rol durante el desarrollo folicular equino: por lo que se formuló una serie de ensayos dirigidos a identificar la expresión, síntesis y localización de componentes melatoninérgicos en las células foliculares. Los resultados demostraron que tanto la enzima ASMT como los receptores MT1 y MT2 (componentes melatoninérgicos) están presentes en el ovario equino. La expresión diferencial de ASMT, MT1 y MT2 en las células foliculares como se muestran en la [cuadro 3](#) sugieren que la actividad de la MT se regula selectivamente por los receptores expresados en diferentes células. La presencia de MT1 en todas las células foliculares permite sugerir su importancia en el funcionamiento del folículo como se ha reportado en otras especies (Reiter *et al.*, 2013). La ausencia de MT2 en las CT puede sugerir que este receptor tenga actividad local en el folículo y al no estar en contacto directo con la circulación sistémica su expresión dependa de la MT folicular y/o de MT1. Este estudio permitió por primera vez sugerir que la MT se produce en el folículo equino por las CT y CG ya que en ellas se identificó la expresión de la enzima ASMT, elemento indispensable para la biosíntesis de MT (Reiter *et al.* 2013), resultado similar al observado en bovinos por El-Raey *et al.*, (2011) aunque en esta especie el COC también expresa ASMT. La expresión de los receptores MT1 y MT2 en las CT y CG se corroboró evaluando

la síntesis de la región correspondiente a los aminoácidos 161-280 de la región interna de MT1, secuencia presente también en MT2. La presencia de esta región en CT y CG se muestra en la [figura 13](#). Se evaluó además la síntesis de estos receptores en células lúteas, obteniendo resultados coincidentes a los descritos por Pedreros, Ratto and Guerra, (2011). Conociendo que MT1 y MT2 se expresan y se sintetizan en las células foliculares se evaluó si estos receptores modifican su síntesis durante el desarrollo folicular evaluando indirectamente la importancia de la MT durante este proceso. Este estudio mostró que la síntesis de la región comprendida entre los aminoácidos 161-280 de la región interna de MT1 se modificó mientras el tamaño folicular crecía. Como puede ser observado en las [figuras 13 y 23](#), la distribución de la inmunotinción durante el desarrollo folicular mostró un patrón de oleada que inicia en las CT en folículos < a 15 mm y se desplaza hacia el límite de la luz folicular en folículos preovulatorios (> a 30mm). El hecho de que no se haya encontrado expresión de MT2 en las CT, ayuda a plantear que durante el desarrollo folicular temprano el MT1 se produce en células cercanas a los vasos sanguíneos y mientras avanza el desarrollo folicular su síntesis se propaga hacia el lumen. Posiblemente MT2 inicie su expresión en CG y COCs luego de la síntesis de MT1 en folículos preovulatorios. Se evaluó también la presencia de MT1/MT2 en las células del cuerpo hemorrágico y lúteas, encontrando una marcada inmunotinción en ambas células. Por lo anterior, y con base en diversos estudios en mamíferos, se sugiere que el patrón de síntesis de MT1/MT2 puede responder a las necesidades metabólicas celulares durante el desarrollo folicular, maduración del COC y luteogénesis (Maria

Helena Coelho Cruz et al.

2014; Tamura et al. 2009;

Dubocovich and

Markowska 2005; S. J.

Wang et al. 2012).

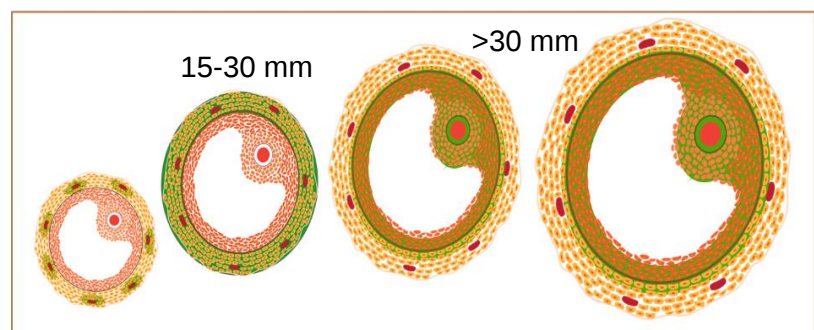


Figura 23 Imagen propuesta de la distribución de la inmunotinción de MT1/MT2 durante el desarrollo folicular. El color verde representa la zona inmunoreactiva para la región comprendida entre los aminoácidos 161-280 de la región interna de MT1/ MT2. La inmunotinción mostró un patrón de oleada que inicia en las CT en folículos < a 15 mm y se desplaza hacia el límite de la luz folicular en folículos preovulatorios > a 30mm.

Con bases sólidas de que la MT desempeña un rol en el ovario equino y con información que demuestra su importancia en varios mamíferos, se evaluó si la adición de esta hormona al medio de cultivo podría tener algún efecto durante la MIV de COCs equinos, tal y como se ha reportado en ratones, ovejas, cabras, cerdos, bovinos, búfalos y conejos (Adriaens et al. 2006; Kang et al. 2009; Manjunatha et al. 2009; Vázquez et al. 2010; El-Raey et al. 2011; F. Wang et al. 2013; Fu et al. 2014; Mehaisen and Saeed 2014). Cabe señalar que el medio de cultivo utilizado en este estudio ha sido utilizado ampliamente en protocolos de MIV de COCs equinos con buenos resultados (Canesin et al. 2017; Diaw et al. 2018). Y debido a que no hay reportes previos en equinos, la elección de la dosis de MT para este estudio se basó en los efectos reportados en otras especies. Mehaisen y Saeed, (2014) observaron que las dosis altas de MT (10^{-3} M) afectan negativamente la tasa de desarrollo embrionario en el conejo, mientras que las dosis moderadas (10^{-6} M) promueven positivamente su desarrollo. Otros estudios con bovinos, cerdos y roedores demostraron que el efecto positivo de la MT sobre la maduración de ovocitos y el desarrollo embrionario se puede lograr con dosis de 10^{-7} M a 10^{-9} M (Kang et al. 2009; F. Wang et al. 2013; Tian et al. 2014; Li et al. 2015; Rodrigues-Cunha et al. 2016; Zhao et al. 2018). Por lo tanto fue que elegimos y trabajamos con las siguientes dosis: 10 ng/mL (4.3^{-8} M) 100 ng/mL (4.3^{-7} M) y 1000 ng/mL (4.3^{-6} M) de MT. A fin de dar respuesta a la interrogante de si la adición de esta hormona al medio de cultivo podría tener algún efecto durante la MIV de COCs equinos, se diseñó una serie de experimentos basados en la regulación de los efectos antioxidantes y antiapoptóticos de la MT: a) por la activación de receptores de membrana específicos MT1 y MT2; b) por la estimulación de enzimas antioxidantes; c) por el secuestro de radicales libres de manera directa, (Dubocovich y Markowska 2005; Cruz et al. 2014).

Inicialmente se evaluó la expresión de MT1 y MT2 en CC de COCs equinos madurados en un medio enriquecido con MT (0, 10, 100 y 1000 ng/mL). Como se muestra en la [figura 15](#) a las 20 horas la MT redujo la expresión de mRNA codificante tanto de MT1 como de MT2, respuesta observada también a las 30 h en la expresión del gen codificante para MT2. Estos resultados pueden indicar que la adición de MT al medio de cultivo puede modular vías de señalización dependientes de sus receptores como ya se ha reportado en otras especies (S. J. Wang et al. 2012). El hecho de que el receptor MT2 haya mantenido su expresión reducida hasta las 30 h, sugiere en conjunto con los resultados descritos en

párrafos superiores que posiblemente el receptor MT2 tenga actividad posterior a la actividad del receptor MT1, por lo que evaluaciones a tiempos previos a las 10 h y posteriores a las 30 h de MIV en estos receptores podrían ser de mucha utilidad para futuras investigaciones. De manera interesante, se observa que la mayor expresión de los receptores en las CC de COCs no tratados con MT se alcanza a las 20 horas de iniciada la MIV (Anexo 2; [figura 25](#)), apuntando que a esta hora posiblemente la MT sea mayormente requerida y activa, quizá por un aumento en el estrés oxidante que promueve la MIV (Brown et al. 2017; Virant-Klun et al. 2018). Continuando con este estudio se evaluó el efecto antioxidante de la MT en el COC, equino censando tres enzimas que participan como elementos antioxidantes en las CC, así como la producción de H_2O_2 en ovocitos. Las enzimas evaluadas fueron la Glutation S Transferasa M3 (GSTM3), que participa en la desintoxicación de ROS, principalmente (H_2O_2), la Peroxidoredoxina 2 (PRDX2), que reduce el H_2O_2 y los hidroperóxidos de alquilo, y la Glutarredoxina 1 (GLRX), que cataliza la reducción reversible de los disulfuros mixtos de glutación (Raza 2011; Blaha et al. 2015). De manera interesante, se encontró que al igual que los receptores MT1 y MT2 la expresión de mRNA codificante para GST M3 y PRDX 2 a las 20 h se reduce respecto al grupo control con la adición de MT. A partir de estos resultados surgió la pregunta ¿La adición de MT al medio de cultivo de COCs equinos puede modificar el metabolismo oxidante en ovocitos parecido a lo observado en las CC? Por ello se evaluó la producción de H_2O_2 en los ovocitos por medio del ensayo DHF como se describe en trabajo de El-Raey et al. (2011). Este ensayo mostró que la adición de 1000ng/mL de MT redujo la producción de H_2O_2 a las 20 h respecto al grupo control, mientras que a las 30 h todos los grupos adicionados con MT mostraron una reducción en la expresión de H_2O_2 . Basados en estos hallazgos se sugiere que la MT en COCs equinos durante la MIV reduce la producción de ROS en los ovocitos y que esta producción está regulada por la expresión de los receptores MT1, MT2 y enzimas antioxidantes e incluso de manera directa por secuestro de radicales libres. El hecho de que las CC hayan mostrados un patrón de respuesta a la MT similar al observado en los ovocitos pero horas antes sugiere además de una comunicación estrecha entre ambas células que las CC probablemente sean las que controlen la producción de ROS en los ovocitos (Lin et al. 2017; Tamura et al. 2012b). No obstante se requieren estudios futuros más puntuales para esclarecer los mecanismos precisos mediante los cuales la MT puede modular a su acción antioxidante en el COC equino.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se evaluó si los efectos antioxidantes de la MT podrían modificar la viabilidad del COC. Para ello se evaluó la expresión de los genes BAX (pro-apoptótico) y BCL2 (anti-apoptótico) en las CC. Como se muestra en la [figura 18](#) la expresión de estos genes se redujo significativamente a las 20 h de iniciada la MIV al igual que lo observado anteriormente con la expresión de MT1, MT2, GST M3, PRDX [figura 15 a 17](#). El mRNA codificante para BCL2 mantuvo su reducción con la adición de 100 y 1000 ng/mL de MT a las 30 h semejante a lo observado en la expresión de MT2 y la producción de H₂O₂, ([figura 15 y 17](#)). En conjunto todos estos resultados permiten proponer que la reducción en el estrés oxidante provoca la baja expresión de BAX y por consecuencia se limita el daño que provoca a la membrana mitocondrial externa causado por la formación de poros, ocasionando que la actividad de BCL2 también se reduzca, lo que permite mantener un equilibrio entre las funciones de estas proteínas (Westphal et al. 2011; Susnow et al. 2009; Cory and Adams 2002). Yang y Rajamahendran (2002) han sugerido que evaluar el equilibrio de estas proteínas por medio de la proporción BAX:BCL2 permite identificar estados tempranos de apoptosis. En el presente estudio no se encontraron cambios tras la adición de MT después de evaluar la proporción BAX:BCL2. Sin embargo, se observó en los grupos controles como en los grupos tratados que tiempos prolongados de cultivo (30 h) posiblemente incrementan el número de CC con estados tempranos de apoptosis en comparación con las cultivadas durante períodos más cortos (10 y 20 h) ([figura 27](#)) con la finalidad de validar lo antes descrito, es importante que futuros estudios evalúen el efecto del tiempo de cultivo y la apoptosis. Los resultados obtenidos en la evaluación de la expresión de BAX sugirieron la necesidad de evaluar la supervivencia de las CC al final de la MIV (30 h). El método para su evaluación fue FACS, que permite medir (i) la translocación celular de fosfatidil-serina (PtdSer) como un marcador de apoptosis temprana; (ii) la integridad de la membrana celular indirectamente, tiñendo el ADN como un marcador de apoptosis/necrosis tardía; y (iii) la ausencia de estos dos marcadores para identificar células vivas (Eray et al. 2001). Como se muestra en la [figura 19](#), la adición de 10ng/mL de MT aumentó la supervivencia de CC (ausencia de daño en la membrana y translocación de PtdSer). Los resultados antiapoptóticos previos mediados por la MT en las CC sugirieron la necesidad de evaluar la apoptosis en el ovocito a fin de tener una idea más clara de lo que ocurre en el COC equino. Al evaluar los niveles de caspasa 3 escindida se identificó una relación entre las CC y el ovocito. La adición de 10

ng/mL de MT que aumentó la supervivencia de las CC a las 30 h, disminuyó los niveles de caspasa 3 escindida en los ovocitos a las 30 h y mostro una tendencia similar al de las 30 h a las 20 h como se muestra en la [figura 20 y 29](#). Adicionalmente, de manera similar al aumento observado en la proporción BAX:BCL2 a las 30 h respecto a los otros tiempos evaluados, los niveles de caspasa 3 escindida se incrementaron en todos los grupos a las 30 h. Lo anterior propone la interacción de señales apoptóticas entre las CC y el ovocito y sugiere que tiempos prolongados de cultivo promueven la apoptosis del COC equino (Zuccotti et al. 2011; Landim-Alvarenga and Maziero 2014). Los resultados anteriores plantean que la MT modula la producción de ROS y la apoptosis tanto en CC como en ovocitos y que estas células mantienen estrecha comunicación, además abre el cuestionamiento del como la dosis de 10 ng/mL de MT promueve la sobrevivencia del COC equino. Basados en reportes previos y en nuestros resultados proponemos que esta dosis en equinos es capaz de reducir la producción excesiva de ROS sin bloquear la función de estas (vías de señalización); necesarias para una adecuada maduración del COC. Sin embargo es necesario realizar estudios futuros utilizando esta dosis y dosis menores a fin de dar explicación del como esta dosis reduce la apoptosis celular. El hecho de que exista una estrecha comunicación entre las CC y el ovocito y que nuestros resultados en la evaluación apoptotica hayan mantenido relación, plantean que, la evaluación de la supervivencia de CC podría servir como un indicador indirecto de la salud de los ovocitos en esta especie. Adicionalmente se observó que posiblemente el tiempo es uno de los principales factor determinante para el inicio de la apoptosis durante la MIV, sin embargo en los ensayos se observa que la MT puede retrasar su inicio, posiblemente previniendo el estrés celular y/o el envejecimiento celular ([figura 28 y 29](#)) como ya se informó en bovinos y ratones (Lord et al. 2013; Dai et al. 2017; Liang et al. 2017; Q. Yang et al. 2018). Los efectos antioxidantes y antiapoptóticos de la MT en el COC equino descritos en este trabajo se suman a los reportados para otras especies (Takada et al., 2012; Wang et al., 2013; Rodrigues-Cunha et al., 2016).

Por último se evaluó si la MT además de sus efectos antioxidantes y antiapoptóticos podría modificar la expresión de los genes implicados en la maduración y la expansión del cúmulo del COC equino. Inicialmente se evaluó la expresión de los genes que codifican para los dos principales EGF-L en el folículo: AREG y EREG (Conti et al. 2012) debido a (i) su importancia sugerida en el folículo equino dominante *in vivo* (Lindbloom et al. 2008);

y (ii) el conocimiento de que en varios mamíferos la producción local de EGF-L en el COC durante la MIV es necesaria para la progresión del COC a una etapa de maduración competente (Brown et al. 2017). Se encontró que ninguna de las dosis de suplementación de MT utilizadas aumentó la expresión de los genes AREG y EREG en relación con el control. Por el contrario, la adición de MT, redujo la expresión de mRNA codificante para AREG a las 20 h en comparación con el grupo control [figura 21](#). Shimada y colaboradores (2006) propusieron un modelo mediante el cual la regulación autocrina de AREG y EREG en CC conduce a la expresión de los genes PTGS2, HAS2 y TNFAIP6 involucrados en la expansión del cúmulo (las vías de señalización

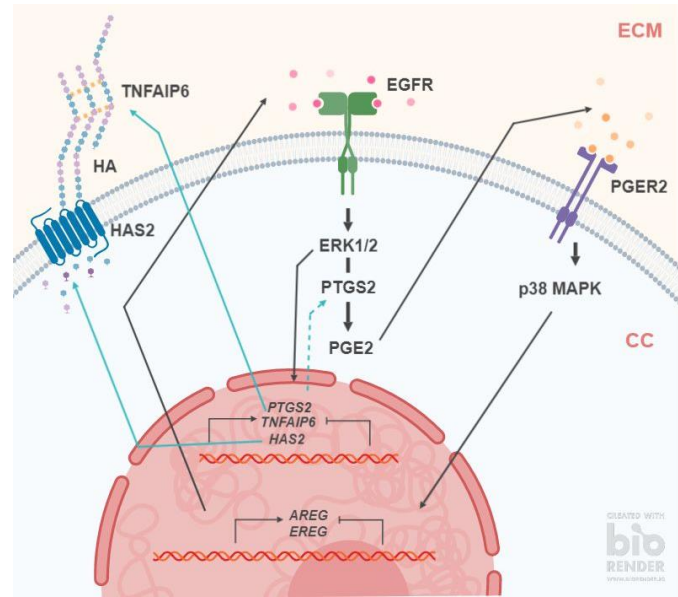


Figura 24 Aproximación esquemática que muestra un posible modelo de regulación autocrina en CC que conduce a la expansión del cúmulo por ligandos similares a EGF. La secuencia propuesta es la siguiente: la unión de los ligandos AREG y EREG a los receptores de EGF, activa ERK1 / 2 e induce la expresión de PTGS2; El aumento en la expresión de PTGS2 conduce al aumento de las prostaglandinas (PG, PGE), que proporciona ligandos que se unen al receptor de prostaglandina E 2 (PTGER2), provocando la activación de p38MAPK e induciendo la expresión de codificación de ARNm para AREG y EREG. La inducción autocrina de AREG y EREG mRNA por la vía PGE / PTGER2 estimula la expresión de genes PTGS2, HAS2 y TNFAIP6, involucrados en la expansión del cúmulo. Adaptado de Shimada et al., (2006)

reguladas por AREG y EREG se muestran en la [figura 24](#)). La importancia de la vía de señalización regulada por (AREG/EREG)/EGFR en la expresión de los genes relacionados con la expansión del cúmulo podría sugerir que la regulación descendente de AREG descrita anteriormente podría modificar la expresión de PTGS2, HAS2 y TNFAIP6. Por tanto se evaluaron estos genes y de manera similar a la expresión de AREG la expresión de TNFAIP6 se redujo a las 20 h con la adición de MT, pero esta reducción se mantuvo hasta las 30 h [figura 21](#). Esto sugirió que la regulación de TNFAIP6, posiblemente dependa de EREG y esto podría potenciar el efecto de MT (Shimada et al. 2006; Portela et al. 2011; Procházka et al. 2011). A pesar de observar una reducción en la expresión de AREG y TNFAIP6 no se sugiere que esto comprometa la expansión del cúmulo equino, debido a

que varios reportes indican que los efectos principales de estos genes ocurren en las primeras horas de iniciada la MIV. (Davis et al. 1999; Ben-Ami et al. 2006; Shimada et al. 2006; Nevoral et al. 2015). Lo anterior también explica la disminución aparente en la expresión de los genes AREG, EREG, PTGS2, HAS2, TNFAIP6 y ADAMTS1 con el paso del tiempo de cultivo [figura 30](#). Finalmente, se evaluó la expansión del cúmulo por microscopia estereoscópica debido a la importancia que tiene este proceso para la maduración meiótica del ovocito i) al permitir la filtración adecuada de moléculas que contribuyen al establecimiento de la señalización celular y por ii) interrumpir el flujo del adenosin monofosfato cíclico y guanosin monofosfato cíclico de las CC hacia el ovocito (Dunning et al. 2012; Yokoo et al. 2007). Como se esperaba debido al ensayo anterior, la evaluación de la transición de COCs CPs a EXs no mostró cambios tras la adición de MT en los equinos [figura 22](#). Creemos que esto se deba a que el tiempo de mayor actividad de la MT se presentó a las 20 horas de iniciada la MIV y el tiempo en el que comienza la expansión del cúmulo se reporta en las primeras 10 h de iniciada la MIV en la mayoría de las especies. Por lo que la reducción de ROS respuesta a la adición de la MT no intervino en la expansión del cúmulo debido a que su reducción fue notable después de las 20 h de iniciada la MIV, ya que se ha sugerido que la producción moderada de ROS interviene en diferentes procesos que conllevan a la ovulación entre ellos la expansión del cúmulo (Shkolnik et al. 2010). El hecho de que la adición de MT no haya tenido efectos negativos en la expansión del cúmulo y que la dosis de 10 ng/mL de MT haya aumentado el número de CC vivas y reducido la apoptosis en ovocitos, permite sugerir que la adición de esta hormona al medio de cultivo puede ser beneficiosa para la maduración del COC equino, ya que se ha sugerido que un número adecuado de capas de CC sanas y una adecuada expansión del cúmulo promueven el éxito de la maduración. Por lo que, es frecuente que la viabilidad de CC y la expansión del cúmulo se utilicen como marcadores de calidad del COC en técnicas de reproducción asistida (Nevoral et al. 2015). A consecuencia del diseño de los experimentos del presente estudio no fue posible evaluar tiempos de exposición de MT menores a 10 horas o mayores a 30 h y dosis de MT menores de 10 ng/mL, por lo que sugiere evaluar esos tiempos y dosis en estudios futuros.

Conclusión

Este estudio revela que el ovario equino expresa y sintetiza componentes melatoninérgicos en el folículo antral y en el cuerpo lúteo, sugiere que la síntesis de MT1/MT2 puede responder a las necesidades metabólicas celulares durante el desarrollo folicular y por primera vez se muestra que la adición de MT al medio de cultivo de COCs equinos, modifica la expresión de los receptores MT1 y MT2; cambia la expresión de genes relacionados con el daño oxidativo en las CC y la producción de H₂O₂ en ovocitos y la adición de 10 ng/mL de MT aumenta la viabilidad del COC. Estos resultados junto con lo reportado por Pedreros y colaboradores en el 2011, abren la puerta a futuras investigaciones que ayudarán a esclarecer el rol de esta hormona durante la MIV y uso en protocolos de MIV para mejorar las tasas de competencia embrionaria en esta especie.

Referencias

- Adriaens, I., P. Jacquet, R. Cortvrindt, K. Janssen, and J. Smitz. 2006. "Melatonin Has Dose-Dependent Effects on Folliculogenesis, Oocyte Maturation Capacity and Steroidogenesis." *Toxicology* 228 (2–3): 333–43. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.09.018>.
- Ashkenazi, H., X. Cao, S. Motola, M. Popliker, M. Conti, and A. Tsafiriri. 2005. "Epidermal Growth Factor Family Members: Endogenous Mediators of the Ovulatory Response." *Endocrinology* 146 (1): 77–84. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0588>.
- Balaban, Basak, and Bulent Urman. 2006. "Effect of Oocyte Morphology on Embryo Development and Implantation." *Reproductive BioMedicine Online* 12 (5): 608–15. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61187-X](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61187-X).
- Ben-Ami, Ido, Sarit Freimann, Leah Armon, Ada Dantes, Raphael Ron-El, and Abraham Amsterdam. 2006. "Novel Function of Ovarian Growth Factors: Combined Studies by DNA Microarray, Biochemical and Physiological Approaches." *Molecular Human Reproduction* 12 (7): 413–19. <https://doi.org/10.1093/molehr/gal045>.
- Blaha, Milan, Lucie Nemcova, Katerina Vodickova Kepkova, Petr Vodicka, and Radek Prochazka. 2015. "Gene Expression Analysis of Pig Cumulus-Oocyte Complexes Stimulated in Vitro with Follicle Stimulating Hormone or Epidermal Growth Factor-like Peptides." *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E* 13 (1): 113. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0112-2>.
- Brown, Hannah M, Kylie R Dunning, Melanie Sutton-McDowall, Robert B Gilchrist, Jeremy G Thompson, and Darryl L Russell. 2017. "Failure to Launch: Aberrant Cumulus Gene Expression during Oocyte in Vitro Maturation." *Reproduction*. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0426>.
- Brzezinski, Amnon, M. Seibel, Harry J. Lynch, Mei Hua Deng, and Richard J. Wurtman. 1987. "Melatonin in Human Preovulatory Follicular Fluid." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 64 (4): 865–67. <https://doi.org/10.1210/jcem-64-4-865>.
- Burrola-Barraza, M. Eduvigis, and Everardo González-Rodríguez. 2015. "Efectos de Los RNAm Maternos Sobre La Maduración Del Ovocito y El Desarrollo Embrionario

- Temprano En Mamíferos.” *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 6 (1): 39. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v6i1.4023>.
- Canesin, Heloísa Siqueira, Joao Gatto Brom-de-Luna, Young Ho Choi, Isabel Ortiz, Mouhamadou Diaw, and Katrin Hinrichs. 2017. “Blastocyst Development after Intracytoplasmic Sperm Injection of Equine Oocytes Vitrified at the Germinal-Vesicle Stage.” *Cryobiology* 75: 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.02.004>.
- Carneiro, Gustavo F., Irwin K.M. Liu, Dallas Hyde, Gary B. Anderson, Pedro L. Lorenzo, and Barry A. Ball. 2002. “Quantification and Distribution of Equine Oocyte Cortical Granules during Meiotic Maturation and after Activation.” *Molecular Reproduction and Development* 63 (4): 451–58. <https://doi.org/10.1002/mrd.10198>.
- Carnevale, Elaine M. 2016. “Advances in Collection, Transport and Maturation of Equine Oocytes for Assisted Reproductive Techniques.” *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* 32 (3): 379–99. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.07.002>.
- Choi, Young-ho, Linda B Love, Mark E Westhusin, and Katrin Hinrichs. 2004. “Activation of Equine Nuclear Transfer Oocytes: Methods and Timing of Treatment in Relation to Nuclear Remodeling1.” *Biology of Reproduction* 70 (1): 46–53. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.018200>.
- Choi, Young-ho, Jody D Norris, Isabel C Velez, Candace C Jacobson, David L Hartman, and Katrin Hinrichs. 2013. “Therigenology A Viable Foal Obtained by Equine Somatic Cell Nuclear Transfer Using Oocytes Recovered from Immature Follicles of Live Mares.” *Therigenology* 79 (5): 791-796.e1. <https://doi.org/10.1016/j.therigenology.2012.12.005>.
- Conti, Marco, Minnie Hsieh, A. Musa Zamah, and Jeong Su Oh. 2012. “Novel Signaling Mechanisms in the Ovary during Oocyte Maturation and Ovulation.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 356 (1–2): 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.11.002>.
- Cory, Suzanne, and Jerry M. Adams. 2002. “The BCL2 Family: Regulators of the Cellular Life-or-Death Switch.” *Nature Reviews Cancer* 2 (9): 647–56. <https://doi.org/10.1038/nrc883>.
- Coticchio, Giovanni, Mariabeatrice Dal Canto, Rubens Fadini, Mario Mignini Renzini, Maria

- Cristina Guglielmo, Selenia Miglietta, Maria Grazia Palmerini, Guido Macchiarelli, and Stefania Annarita Nottola. 2015. "Ultrastructure of Human Oocytes after in Vitro Maturation." *Molecular Human Reproduction* 22 (2): 110–18. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav071>.
- Cruz, M. H C, C. L V Leal, J. F. Cruz, D. X. Tan, and R. J. Reiter. 2014. "Essential Actions of Melatonin in Protecting the Ovary from Oxidative Damage." *Theriogenology* 82 (7): 925–32. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.011>.
- Cruz, Maria Helena Coelho, Claudia Lima Verde Leal, Jurandir Ferreira da Cruz, Dun Xian Tan, and Russel J. Reiter. 2014. "Role of Melatonin on Production and Preservation of Gametes and Embryos: A Brief Review." *Animal Reproduction Science* 145 (3–4): 150–60. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.01.011>.
- Dai, Xiaoxin, Yajuan Lu, Mianqun Zhang, Yilong Miao, Changyin Zhou, Zhaokang Cui, and Bo Xiong. 2017. "Melatonin Improves the Fertilization Ability of Post-Ovulatory Aged Mouse Oocytes by Stabilizing Ovastacin and Juno to Promote Sperm Binding and Fusion." *Human Reproduction* 32 (3): 598–606. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew362>.
- David Vantman, B., and B. Margarita Vega. 2010. "Fisiología Reproductiva y Cambios Evolutivos Con La Edad de La Mujer." *Revista Médica Clínica Las Condes* 21 (3): 348–62. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(10\)70545-9](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(10)70545-9).
- Davis, Barbara J., David E. Lennard, Christopher A. Lee, Howard F. Tiano, Scott G. Morham, William C. Wetsel, and Robert Langenbach. 1999. "Anovulation in Cyclooxygenase-2-Deficient Mice Is Restored by Prostaglandin E₂ and Interleukin-1 β ." *Endocrinology* 140 (6): 2685–95. <https://doi.org/10.1210/endo.140.6.6715>.
- Dell'Aquila, Maria Elena, Mary Masterson, Filippo Maritato, and Katrin Hinrichs. 2001. "Influence of Oocyte Collection Technique on Initial Chromatin Configuration, Meiotic Competence, and Male Pronucleus Formation after Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) of Equine Oocytes." *Molecular Reproduction and Development* 60 (1): 79–88. <https://doi.org/10.1002/mrd.1064>.
- Devine, Patrick J., Sally D. Perreault, and Ulrike Luderer. 2012. "Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Ovarian Toxicity¹." *Biology of Reproduction* 86 (2).

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095224>.

- Diaw, Mouhamadou, Renato M. Salgado, Heloísa S. Canesin, Nell Gridley, and Katrin Hinrichs. 2018. "Effect of Different Shipping Temperatures (~22 °C vs. ~7 °C) and Holding Media on Blastocyst Development after Overnight Holding of Immature Equine Cumulus-Oocyte Complexes." *Theriogenology* 111 (2018): 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.044>.
- Dubocovich, Margarita L, and Magdalena Markowska. 2005. "Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals." *Endocrine* 27 (2): 101–10. <https://doi.org/10.1385/ENDO:27:2:101>.
- Dunning, Kylie R., Laura N. Watson, David J. Sharkey, Hannah M. Brown, Robert J. Norman, Jeremy G. Thompson, Rebecca L. Robker, and Darryl L. Russell. 2012. "Molecular Filtration Properties of the Mouse Expanded Cumulus Matrix: Controlled Supply of Metabolites and Extracellular Signals to Cumulus Cells and the Oocyte1." *Biology of Reproduction* 87 (4): 1–10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.096271>.
- El-Raey, Mohamed, Masaya Geshi, Tamás Somfai, Masahiro Kaneda, Makoto Hirako, Alaa E. Abdel-Ghaffar, Gamal A. Sosa, Mahmoud E A Abou El-Roos, and Takashi Nagai. 2011. "Evidence of Melatonin Synthesis in the Cumulus Oocyte Complexes and Its Role in Enhancing Oocyte Maturation in Vitro in Cattle." *Molecular Reproduction and Development* 78 (4): 250–62. <https://doi.org/10.1002/mrd.21295>.
- Eray, Mine, Mikko Mttö, Matti Kaartinen, Leif C. Andersson, and Jukka Pelkonen. 2001. "Flow Cytometric Analysis of Apoptotic Subpopulations with a Combination of Annexin V-FITC, Propidium Iodide, and SYTO 17." *Cytometry* 43 (2): 134–42. [https://doi.org/10.1002/1097-0320\(20010201\)43:2<134::AID-CYTO1028>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20010201)43:2<134::AID-CYTO1028>3.0.CO;2-L).
- Evsikov, Alexei V., and Caralina Marín De Evsikova. 2009. "Gene Expression during the Oocyte-to-Embryo Transition in Mammals." *Molecular Reproduction and Development* 76 (9): 805–18. <https://doi.org/10.1002/mrd.21038>.
- Fair, T., P. Hyttel, and T. Greve. 1995. "Bovine Oocyte Size in Relationship to Follicular Diameter, Maturational Competence and Rna Synthesis." *Theriogenology* 43 (1): 209. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)92363-E](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)92363-E).

- Fu, Yao, Chang Jiu He, Peng Yun Ji, Zhi Yong Zhuo, Xiu Zhi Tian, Feng Wang, Dun Xian Tan, and Guo Shi Liu. 2014. "Effects of Melatonin on the Proliferation and Apoptosis of Sheep Granulosa Cells under Thermal Stress." *International Journal of Molecular Sciences* 15 (11): 21090–104. <https://doi.org/10.3390/ijms151121090>.
- Gilchrist, R. B., A. M. Luciano, D. Richani, H. T. Zeng, X. Wang, M. De Vos, S. Sugimura, J. Smits, F. J. Richard, and J. G. Thompson. 2016. "Oocyte Maturation and Quality: Role of Cyclic Nucleotides." *Reproduction* 152 (5): R143–57. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0606>.
- Hawley, LR, AC Enders, and K Hinrichs. 1995. "Comparison of Equine and Bovine Oocyte-Cumulus Morphology within the Ovarian Follicle." *Biology of Reproduction Monograph*: 243–52.
- 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>.
- Hinrichs, K, Y H Choi, D D Varner, and D L Hartman. 2007. "Production of Cloned Horse Foals Using Roscovitine-Treated Donor Cells and Activation with Sperm Extract and/or Ionomycin." *Reproduction* 134 (2): 319–25. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0069>.
- Hinrichs, K, a L Schmidt, P P Friedman, J P Selgrath, and M G Martin. 1993. "In Vitro Maturation of Horse Oocytes: Characterization of Chromatin Configuration Using Fluorescence Microscopy." *Biology of Reproduction* 48 (2): 363–70. <https://doi.org/10.1095/biolreprod48.2.363>.
- Hinrichs, K, and K a Williams. 1997. "Relationships among Oocyte-Cumulus Morphology, Follicular Atresia, Initial Chromatin Configuration, and Oocyte Meiotic Competence in the Horse." *Biology of Reproduction* 57: 377–84. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.2.377>.
- Hinrichs, Katrin. 2010a. "The Equine Oocyte : Factors Affecting Meiotic and Developmental Competence." *Molecular Reproduction and Development* 661: 651–61. <https://doi.org/10.1002/mrd.21186>.
- Kala, Manika, Muhammad Vaseem Shaikh, and Manish Nivsarkar. 2017. "Equilibrium

- between Anti-Oxidants and Reactive Oxygen Species: A Requisite for Oocyte Development and Maturation.” *Reproductive Medicine and Biology* 16 (1): 28–35. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12013>.
- Kang, Jung Taek, Ok Jae Koo, Dae Kee Kwon, Hee Jung Park, Goo Jang, Sung Keun Kang, and Byeong Chun Lee. 2009. “Effects of Melatonin on in Vitro Maturation of Porcine Oocyte and Expression of Melatonin Receptor RNA in Cumulus and Granulosa Cells.” *Journal of Pineal Research* 46 (1): 22–28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00602.x>.
- Lagutina, Irina, Giovanna Lazzari, Roberto Duchi, Silvia Colleoni, Nunzia Ponderato, Paola Turini, Gabriella Crotti, and Cesare Galli. 2005. “Somatic Cell Nuclear Transfer in Horses: Effect of Oocyte Morphology, Embryo Reconstruction Method and Donor Cell Type.” *Reproduction* 130 (4): 559–67. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00772>.
- Landim-Alvarenga, F C, and R R D Maziero. 2014. “Control of Oocyte Maturation.” *Animal Reproduction*, 150–58.
- Li, Yu, Zhen Zhen Zhang, Chang Jiu He, Kuan Feng Zhu, Zhi Yuan Xu, Teng Ma, Jing Li Tao, and Guo Shi Liu. 2015. “Melatonin Protects Porcine Oocyte in Vitro Maturation from Heat Stress.” *Journal of Pineal Research* 59 (3): 365–75. <https://doi.org/10.1111/jpi.12268>.
- Liang, Shuang, Jing Guo, Jeong Woo Choi, Nam Hyung Kim, and Xiang Shun Cui. 2017. “Effect and Possible Mechanisms of Melatonin Treatment on the Quality and Developmental Potential of Aged Bovine Oocytes.” *Reproduction, Fertility and Development* 29 (9): 1821–31. <https://doi.org/10.1071/RD16223>.
- Lin, Tao, Jae Eun Lee, Jeong Won Kang, So Yeon Kim, and Dong Il Jin. 2017. “The Influence and Role of Melatonin on in Vitro Oocyte Maturation and Embryonic Development in Pig and Cattle.” *Korean Journal of Agricultural Science* 44 (3): 309–17. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20170050>.
- Lindbloom, S. M., T. A. Farmerie, C. M. Clay, G. E. Seidel, and E. M. Carnevale. 2008. “Potential Involvement of EGF-like Growth Factors and Phosphodiesterases in Initiation of Equine Oocyte Maturation.” *Animal Reproduction Science* 103 (1–2): 187–92. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.04.006>.

- Lonergan, Patrick, and Fair Trudee. 2016. "In Vitro Maturation of Oocytes." *Reviews in Advance*, no. October: 181–94. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511762390.020>.
- Lord, Tessa, Brett Nixon, Keith T Jones, and R John Aitken. 2013. "Melatonin Prevents Postovulatory Oocyte Aging in the Mouse and Extends the Window for Optimal Fertilization in Vitro." *Biol Reprod* 88 (3): 67. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.106450>.
- Manjunatha, B. M., M. Devaraj, P. S P Gupta, J. P. Ravindra, and S. Nandi. 2009. "Effect of Taurine and Melatonin in the Culture Medium on Buffalo in Vitro Embryo Development." *Reproduction in Domestic Animals* 44 (1): 12–16. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00982.x>.
- Mehaisen, Gamal Mohamed Kamel, and Ayman Moustafa Saeed. 2014. "In Vitro Development Rate of Preimplantation Rabbit Embryos Cultured with Different Levels of Melatonin." *Zygote* 23 (1): 111–15. <https://doi.org/10.1017/S0967199413000415>.
- Morita, Y, and J L Tilly. 1999. "Oocyte Apoptosis: Like Sand through an Hourglass." *Dev. Biol* 213 (1): 1–17.
- Mugnier, Sylvie, Maria Elena Dell'Aquila, Jesus Pelaez, Cécile Douet, Barbara Ambruosi, Teresa De Santis, Giovanni Michele Lacalandra, et al. 2009. "New Insights into the Mechanisms of Fertilization: Comparison of the Fertilization Steps, Composition, and Structure of the Zona Pellucida Between Horses and Pigs1." *Biology of Reproduction* 81 (5): 856–70. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077651>.
- Nakano, Mayu, Yoko Kato, and Yukio Tsunoda. 2012. "Effect of Melatonin Treatment on the Developmental Potential of Parthenogenetic and Somatic Cell Nuclear-Transferred Porcine Oocytes in Vitro." *Zygote* 20 (2): 199–207. <https://doi.org/10.1017/S0967199411000190>.
- Nevoral, J., M. Orsák, P. Klein, J. Petr, M. Dvořáková, I. Weingartová, A. Vyskočilová, K. Zámotná, T. Krejčová, and F. Jílek. 2015. "Cumulus Cell Expansion, Its Role in Oocyte Biology and Perspectives of Measurement: A Review." *Scientia Agriculturae Bohemica* 45 (4): 212–25. <https://doi.org/10.1515/sab-2015-0002>.
- Palma, Gustavo Adolfo, Martin Eduardo Arga, Antonio Daniel Barrera, Daniela Rodler,

- Adrian Angel, and Fred Sinowatz. 2012. "Biology and Biotechnology of Follicle Development" 2012 (Figure 1). <https://doi.org/10.1100/2012/938138>.
- Pang, Yun-Wei, Lei An, Peng Wang, Yong Yu, Qiu-Dan Yin, Xiao-Hong Wang, Xin-Zhang, et al. 2013. "Treatment of Porcine Donor Cells and Reconstructed Embryos with the Antioxidant Melatonin Enhances Cloning Efficiency." *Journal of Pine* 54: 389–97. <https://doi.org/10.1111/jpi.12024>.
- Park, J.-Y. 2004. "EGF-Like Growth Factors As Mediators of LH Action in the Ovulatory Follicle." *Science* 303 (5658): 682–84. <https://doi.org/10.1126/science.1092463>.
- Pedrerros, Marcos, Marcelo Ratto, and Montserrat Guerra. 2011. "Expression of Functional Melatonin MT1 Receptors in Equine Luteal Cells: In Vitro Effects of Melatonin on Progesterone Secretion." *Reproduction, Fertility and Development* 23 (3): 417–23. <https://doi.org/10.1071/RD10137>.
- Pfaffl, M. W. 2001. "A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR." *Nucleic Acids Research* 29 (9): 45e – 45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- Portela, Valério M., Gustavo Zamberlam, Paulo B.D. Gonçalves, João F.C. de Oliveira, and Christopher A. Price. 2011. "Role of Angiotensin II in the Periovulatory Epidermal Growth Factor-Like Cascade in Bovine Granulosa Cells In Vitro¹." *Biology of Reproduction* 85 (6): 1167–74. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.094193>.
- Procházka, Radek, Michal Petlach, Eva Nagyová, and Lucie Němcová. 2011. "Effect of Epidermal Growth Factor-like Peptides on Pig Cumulus Cell Expansion, Oocyte Maturation, and Acquisition of Developmental Competence in Vitro: Comparison with Gonadotropins." *Reproduction* 141 (4): 425–35. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0418>.
- Raza, Haider. 2011. "Dual Localization of Glutathione S -Transferase in the Cytosol and Mitochondria : Implications in Oxidative Stress , Toxicity and Disease" 278: 4243–51. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08358.x>.
- Reiter, Russel J., Sergio A. Rosales-Corral, Lucien C. Manchester, and Dun Xian Tan. 2013. *Peripheral Reproductive Organ Health and Melatonin: Ready for Prime Time. International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 14.

<https://doi.org/10.3390/ijms14047231>.

- Ribeiro, B. I., L. B. Love, Y. H. Choi, and K. Hinrichs. 2008. "Transport of Equine Ovaries for Assisted Reproduction." *Animal Reproduction Science* 108 (1–2): 171–79. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.08.001>.
- Roberts, Andrew J., and Michael K. Skinner. 1990. "Hormonal Regulation of Thecal Cell Function during Antral Follicle Development in Bovine Ovaries." *Endocrinology* 127 (6): 2907–17. <https://doi.org/10.1210/endo-127-6-2907>.
- Rodrigues-Cunha, Maria Carolina, Lgia G. Mesquita, Fabiana Bressan, Maite del Collado, Jlio C.C. Balieiro, Ktia R.L. Schwarz, Fernanda C. de Castro, et al. 2016. "Effects of Melatonin during IVM in Defined Medium on Oocyte Meiosis, Oxidative Stress, and Subsequent Embryo Development." *Theriogenology* 86 (7): 1685–94. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.026>.
- Rodriguez-Osorio, N., I. J. Kim, H. Wang, A. Kaya, and E. Memili. 2007. "Melatonin Increases Cleavage Rate of Porcine Preimplantation Embryos in Vitro." *Journal of Pineal Research* 43 (3): 283–88. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00475.x>.
- Schmitt, Anja, and Angel R Nebreda. 2002. "Signalling Pathways in Oocyte Meiotic Maturation." *Journal of Cell Science* 115 (Pt 12): 2457–59.
- Segawa, Katsumori, and Shigekazu Nagata. 2015. "An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure." *Trends in Cell Biology* 25 (11): 639–50. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.003>.
- Shi, Jian Min, Xiu Zhi Tian, Guang Bin Zhou, Liang Wang, Chao Gao, Shi En Zhu, Shen Ming Zeng, Jian Hui Tian, and Guo Shi Liu. 2009. "Melatonin Exists in Porcine Follicular Fluid and Improves in Vitro Maturation and Parthenogenetic Development of Porcine Oocytes." *Journal of Pineal Research* 47 (4): 318–23. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00717.x>.
- Shimada, Masayuki, Inmaculada Hernandez-Gonzalez, Ignacio Gonzalez-Robayna, and JoAnne S. Richards. 2006. "Paracrine and Autocrine Regulation of Epidermal Growth Factor-Like Factors in Cumulus Oocyte Complexes and Granulosa Cells: Key Roles for Prostaglandin Synthase 2 and Progesterone Receptor." *Molecular Endocrinology*

20 (6): 1352–65. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0504>.

Shkolnik, Ketty, Ari Tadmor, Shifra Ben-dor, Nava Nevo, Dalia Galiani, and Nava Dekel. 2010. “Reactive Oxygen Species Are Indispensable in Ovulation” 2010. [https://doi.org/10.1073/pnas.1017213108/-](https://doi.org/10.1073/pnas.1017213108/-/DCSupplemental) /DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1017213108.

Soares, Jose M, Monica I Masana, Cağatay Erşahin, and Margarita L Dubocovich. 2003. “Functional Melatonin Receptors in Rat Ovaries at Various Stages of the Estrous Cycle.” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306 (2): 694–702. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.049916>.

Su, Jianmin, Yongsheng Wang, Xupeng Xing, Lei Zhang, Hongzheng Sun, Yong Zhang, and College. 2015. “Melatonin Signi Fi Cantly Improves the Developmental Competence of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos.” *Journal of Pineal Research* 59: 455–68. <https://doi.org/10.1111/jpi.12275>.

Susnow, Nathan, Liyun Zeng, Daciana Margineantu, and David M. Hockenbery. 2009. “Bcl-2 Family Proteins as Regulators of Oxidative Stress.” *Seminars in Cancer Biology* 19 (1): 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.12.002>.

Takada, L, A Martins Junior, G Z Mingoti, J C C Balieiro, J Cipolla-neto, and L A Coelho. 2012. “Research in Veterinary Science Effect of Melatonin on DNA Damage of Bovine Cumulus Cells during in Vitro Maturation (IVM) and on in Vitro Embryo Development.” *Research in Veterinary Science* 92 (1): 124–27. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.11.004>.

Tamura, Hiroshi, D Ph, Yasuhiko Nakamura, D Ph, and Ahmet Korkmaz. 2009. “Melatonin and the Ovary: Physiological and Pathophysiological Implications.” *Fertility and Sterility* 92 (1): 328–43. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.05.016>.

Tamura, Hiroshi, Akihisa Takasaki, Ichiro Miwa, Ken Taniguchi, Ryo Maekawa, Hiromi Asada, Toshiaki Taketani, et al. 2008. “Oxidative Stress Impairs Oocyte Quality and Melatonin Protects Oocytes from Free Radical Damage and Improves Fertilization Rate.” *Journal of Pineal Research* 44 (3): 280–87. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00524.x>.

- Tamura, Hiroshi, Akihisa Takasaki, Toshiaki Taketani, Manabu Tanabe, Fumie Kizuka, Lifa Lee, Isao Tamura, et al. 2012a. "The Role of Melatonin as an Antioxidant in the Follicle." *Journal of Ovarian Research* 5 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-5-5>.
- Tan, Jing He, Hui Li Wang, Xing Shen Sun, Yong Liu, Hong Shu Sui, and Jie Zhang. 2009. "Chromatin Configurations in the Germinal Vesicle of Mammalian Oocytes." *Molecular Human Reproduction* 15 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1093/molehr/gan069>.
- Tesarik, J., M. Sousa, and J. Testart. 1994. "Human Oocyte Activation after Intracytoplasmic Sperm Injection." *Human Reproduction* 9 (5): 968. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138622>.
- Tian, XiuZhi, Feng Wang, ChangJiu He, Lu Zhang, DunXian Tan, Russel J. Reiter, Jing Xu, PengYun Ji, and GuoShi Liu. 2014. "Beneficial Effects of Melatonin on Bovine Oocytes Maturation: A Mechanistic Approach." *Journal of Pineal Research* 57 (3): 239–47. <https://doi.org/10.1111/jpi.12163>.
- Tiwari, Meenakshi, Shilpa Prasad, Anima Tripathi, and Ashutosh N Pandey. 2015. "Apoptosis in Mammalian Oocytes: A Review." *Apoptosis* 20 (8): 1019–25. <https://doi.org/10.1007/s10495-015-1136-y>.
- Vázquez, M. I., J. A. Abecia, F. Forcada, and A. Casao. 2010. "Effects of Exogenous Melatonin on in Vivo Embryo Viability and Oocyte Competence of Undernourished Ewes after Weaning during the Seasonal Anestrus." *Theriogenology* 74 (4): 618–26. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.03.007>.
- Virant-Klun, Irma, Chris Bauer, Anders Ståhlberg, Mikael Kubista, and Thomas Skutella. 2018. "Human Oocyte Maturation in Vitro Is Improved by Co-Culture with Cumulus Cells from Mature Oocytes." *Reproductive BioMedicine Online* 36 (5): 508–23. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.01.011>.
- Wang, Feng, Xiuzhi Tian, Lu Zhang, Dunxian Tan, Russel J. Reiter, and Guoshi Liu. 2013. "Melatonin Promotes the in Vitro Development of Pronuclear Embryos and Increases the Efficiency of Blastocyst Implantation in Murine." *Journal of Pineal Research* 55 (3): 267–74. <https://doi.org/10.1111/jpi.12069>.
- Wang, S. J., W. J. Liu, C. J. Wu, F. H. Ma, S. Ahmad, B. R. Liu, L. Han, X. P. Jiang, S. J.

- Zhang, and L. G. Yang. 2012. "Melatonin Suppresses Apoptosis and Stimulates Progesterone Production by Bovine Granulosa Cells via Its Receptors (MT1 and MT2)." *Theriogenology* 78 (7): 1517–26. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.019>.
- Westphal, Dana, Grant Dewson, Peter E Czabotar, and Ruth M Kluck. 2011. "Molecular Biology of Bax and Bak Activation and Action." *BBA - Molecular Cell Research* 1813 (4): 521–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.019>.
- Yang, Ming Yuan, and Rajadurai Rajamahendran. 2002. "Expression of Bcl-2 and Bax Proteins in Relation to Quality of Bovine Oocytes and Embryos Produced in Vitro." *Animal Reproduction Science* 70 (3–4): 159–69. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00186-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00186-5).
- Yang, Qingling, Shanjun Dai, Xiaoyan Luo, Jing Zhu, Fangyuan Li, Jinhao Liu, Guidong Yao, Yingpu Sun, and 5. 2018. "Melatonin Attenuates Postovulatory Oocyte Dysfunction by Regulating SIRT1 Expression." *Reproduction*, no. May: 1–51. <https://doi.org/10.2134/agronj2016.02.0112>.
- Yie, S M, L P Niles, and E V Younglai. 1995. "Melatonin Receptors on Human Granulosa Cell Membranes." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80 (5): 1747–49. <https://doi.org/10.1210/jcem.80.5.7745030>.
- Yokoo, M, T Shimizu, N Kimura, W A Tunjung, H Matsumoto, H Abe, H Sasada, H Rodriguez-Martinez, and E Sato. 2007. "Role of the Hyaluronan Receptor CD44 during Porcine Oocyte Maturation." *J Reprod Dev* 53 (2): 263–70. <https://doi.org/JST.JSTAGE/jrd/18047> [pii].
- Zeebaree, Bayar K., Wing Y. Kwong, George E. Mann, Carlos G. Gutierrez, and Kevin D. Sinclair. 2018. "Physiological Responses of Cultured Bovine Granulosa Cells to Elevated Temperatures under Low and High Oxygen in the Presence of Different Concentrations of Melatonin." *Theriogenology* 105: 107–14. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.014>.
- Zhao, Xue Ming, Na Wang, Hai Sheng Hao, Chong Yang Li, Ya Han Zhao, Chang Liang Yan, Hao Yu Wang, et al. 2018. "Melatonin Improves the Fertilization Capacity and Developmental Ability of Bovine Oocytes by Regulating Cytoplasmic Maturation

Events.” *Journal of Pineal Research* 64 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1111/jpi.12445>.

Zuccotti, Maurizio, Valeria Merico, Sandra Cecconi, Carlo Alberto Redi, and Silvia Garagna. 2011. “What Does It Take to Make a Developmentally Competent Mammalian Egg?” *Human Reproduction Update* 17 (4): 525–40. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr009>.

Anexos

1 Manual de maduración *in vitro* de COCs equinos

Materiales

Aspiración de COCs equinos

Preparación de medios de maduración para COCs equinos

<i>Cantidad</i>	<i>Descripción</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Descripción</i>
-	Ovarios	3	Gradilla diferentes diámetros
-	Papel absorbente	4	Tubos para centrifugación 15 mL
2	Tijeras de disección (Mayo)	2	Tubos para centrifugación 50 mL
-	Esponja de gasas, 4x4, No estériles	-	Pipetas 0.1 uL-20uL/ 2uL-200uL /50uL-1000uL
2	Vasos de precipitado 500mL	-	Puntas para pipetas 0.1 uL-20uL/ 2uL-200uL /50uL-1000uL
2	Vasos de precipitado 1000 mL	-	Medio 199 con sales de Earle, L-glutamine and sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich)
1	Vaso de precipitado 2000 mL	-	Gentamicina 50 mg/mL (Sigma-Aldrich)
2	Bisturíes estériles desechables tamaño 10	-	FSH de hipófisis porcina (Sigma-Aldrich)
2	Aguja calibre 14G	-	Suero Fetal Bovino (Sigma-Aldrich; F2442-50ML)
1	Extensión de catéter	1	Jeringa de 10mL desechable sin émbolo de goma
2	Válvula de tres-vías	1	Filtro para jeringa de 25 mm
2	Conector hembra-macho para agujas	-	Platos Petri mini 30 x 15 mm

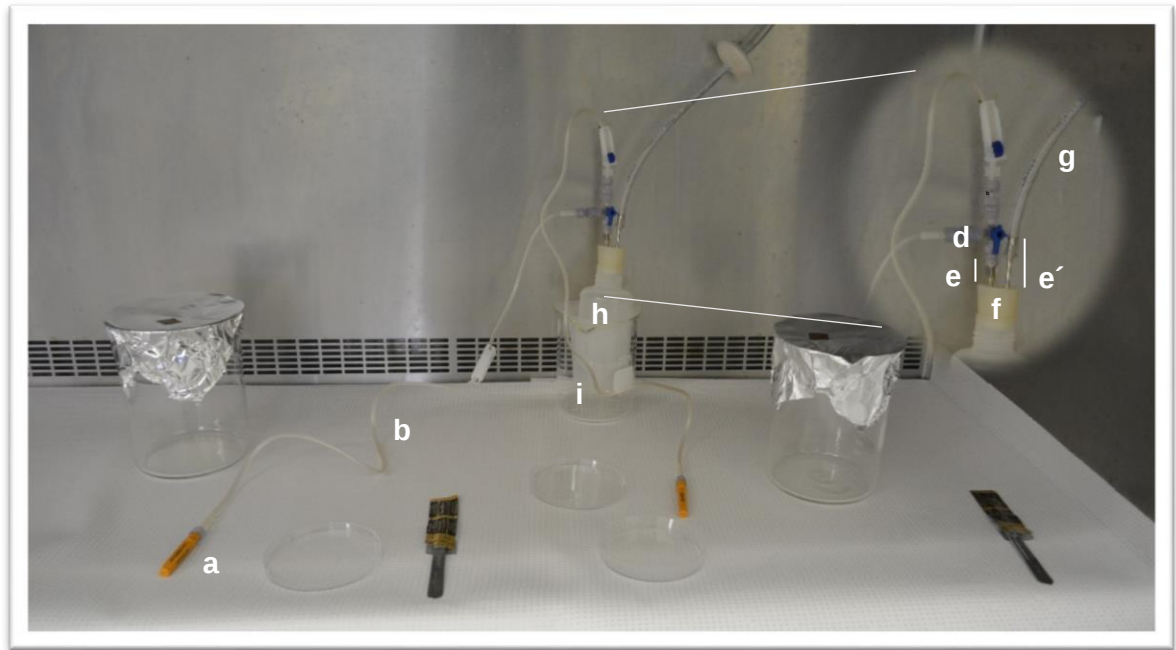
2	Cánulas intramamaria metálicas	-	Platos Petri estándar 100 x 15 mm
1	Tapón de silicona	1	Pipetas serológicas 15 mL
-	Tubos cónicos de centrifugación de 250 mL	-	Aceite mineral (Sigma-Aldrich; 330779-1L)
8	Platos Petri estándar 100 x 15 mm		
4	Platos Petri mini 30 x 15 mm		
-	Tubo capilar de cristal		
1	Filtro de recuperación de embriones		
2	Bolsas para desechos		

Medios de aspiración de COCs equinos

- Medio de recuperación OPU (MORFA USA) o
- M199 con sales de Hank + Gentamicina (Sigma-Aldrich)

Métodos

Ensamble del sistema de aspiración de COCs equinos



1. Preparación del área de trabajo; con la campana limpia, prender la luz ultravioleta por 30 minutos antes de comenzar a colocar el material. Colocar papel absorbente en el piso de la campana y acomodar el material para la aspiración de COCs (Equinos: tijeras, gasas, vasos de precipitado, bisturíes, cajas de Petri y el sistema de aspiración de COCs por bomba de vacío. Bovinos: tijeras, gasas, vasos de precipitado, cajas de Petri)
2. Equinos: Ensamblar el sistema de aspiración de COCs, unir las agujas calibre 14G (a) a los tubos de extensión para catéter (b), posteriormente ensamblar estos a la válvula de tres vías por medio de un conector, (c) esta válvula (d) se unirá a una cánula intramamaria de metal (e) que se introducirá al tapón de silicona (f), en este tapón introducir otra cánula un centímetro menos profunda que la otra (e) y conectarla a la manguera de la bomba de vacío (g), introducir y ajustar el tapón de

silicona al tubo de centrifugación de 250mL (h), y colocarlo en un vaso de precipitado de 250 mL para evitar que se mueva o caiga (i).

Preparación de medios de cultivo

Diagrama de preparación de medios equinos

Producto	Concentración	Volumen
-----------------	----------------------	----------------

Preparación de Medio Hank (Aspiración)		
M199 (con sales de HEPES)	-	500 mL
Gentamicina	25µg/mL	250 µL

Preparación de Medio Earl (Maduración In vitro)		
M199 (con sales de Earl)	-	500 mL
Gentamicina	25µg/mL	250 µL



Tomar

Preparación de las gotas de maduración con Suero Fetal Bovino y FSH		
M199 (con sales de Earl) + Gentamicina	-	1 mL



Adicionar

Suero Fetal Bovino	10%	10 µL
--------------------	-----	-------



Filtrar

Filtrar el medio



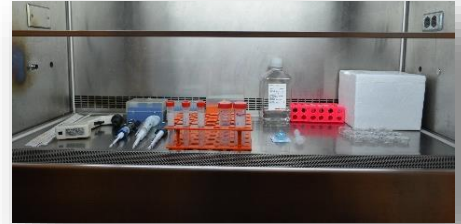
Adicionar

FSH	5µg/mL	25 µL
-----	--------	-------

Pasos para la preparación del medio de maduración *in vitro* de COCs equinos

1. En la campana colocar el material y equipo necesario para preparar los medios.

Radiar con rayos UV gradillas, puntas y pipetas, previo uso.



2. Colocar medio de cultivo M199 con sales de Earl en un tubo de centrifugación de 15 mL con ayuda de una pipeta serológica. Posteriormente adicionar el SFB



3. En otro tubo de centrifugación adicionar la FSH necesaria para el total de mL de medio de maduración.



4. En una jeringa sin émbolo de goma colocar el medio M199 con sales de Earl con SFB calculado (primer tubo de centrifugación) y filtrarlo, el medio filtrado debera vertirse en el tubo donde se colocó la FSH.



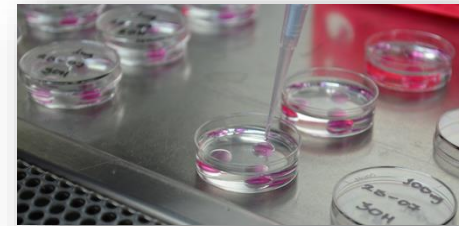
5. En cajas de Petri de 30mm colocar 3 gotas de 50 uL en disposición triangular.



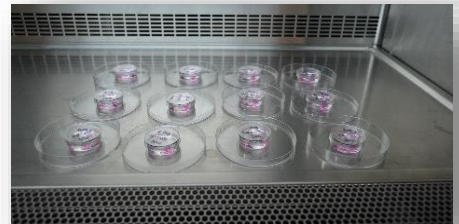
6. Utilizando una pipeta serológica colocar alrededor de 3.5 mL de aceite mineral en las cajas de Petri de 30mm para cubrir las gotas de maduración previamente hechas.



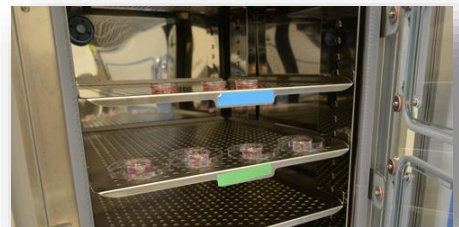
7. Justo por arriba de las gotas y sin tocar el aceite mineral colocar de una sola intensión y de manera rapida 50 uL de medio para hacer una gota de 100 uL de medio de maduración.



8. Tapar las cajas de Petri de 30 mm y colocarlas dentro de cajas de Petri estandar, con la finalidad de hacer mucho mas facil su transporte a la incubadora.



9. Colocar los platos de cultivo por lo menos 2 horas antes en la incubadora en condiciones de maduración (38,2 °C en una atmósfera humidificada de CO2 al 5% en aire), esto con la finalidad de atemperar y estabilizar el medio de maduración. Adicionalmente colocar el medio de aspiracion en el baño maria para que este este atemperado.



Transporte de ovarios equinos

Los ovarios son principalmente obtenidos de yeguas/vacas que han sufrido algún accidente catastrófico o que han sido destinadas al abasto. En yeguas, estos deben de ser recolectados preferentemente durante el estado reproductivo de las yeguas, dado que la calidad de los ovocitos depende de la época del año. Sin embargo los ovarios bovinos se pueden obtener todo el año.

- El transporte de ovarios equinos al laboratorio se debe de hacer en recipientes plásticos dentro de contenedores aislantes a temperatura ambiente ($\sim 22^{\circ}\text{C}$).

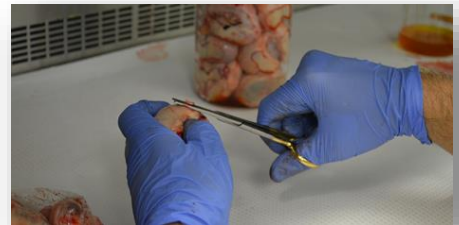


Recuperación de COCs equinos

- Cerciorarse que el material y medio de recuperación se encuentre atemperado.
- Antes de iniciar con la recuperación de los COCs equinos asegurarse que la bomba de vacío este ajustada para aspirar aproximadamente 40 ml de fluido por minuto.
- No aspirar folículos mayores de 25 mm de diámetro, que presenten líquido folicular viscoso y/o de color amarillo oscuro.
- Los ovarios con características patológicas obvias deben ser descartados.
- Para la maduración *in vitro* se recomienda utilizar COCs con citoplasma homogéneo y al menos cinco capas compactas de células cúmulos.

Pasos para la recuperación de COCs equinos

1. Con ayuda de unas tijeras de disección (Mayo) remover el exceso de tejido adyacente al ovario. Tener precaución de no perforar los folículos que se encuentren en la periferia.



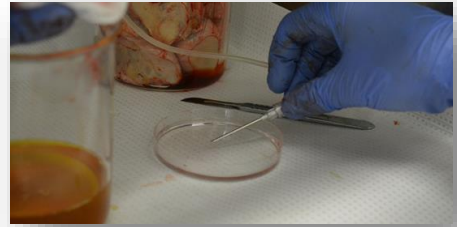
2. Secar con gasas estériles los ovarios para eliminar residuos de sangre. Posteriormente se pueden colocar en recipientes estériles de vidrio o seguir con el proceso.



3. Usando el bisturí se debe incidir cada folículo visible en el exterior y drenar el líquido folicular en un recipiente.



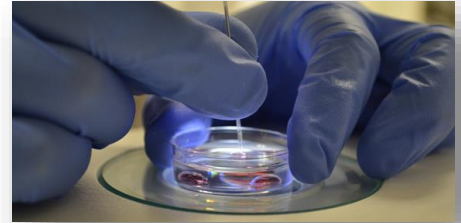
4. Raspar y aspirar las paredes de cada folículo usando una aguja calibre 14 G unida al sistema de aspiración (tubo de extensión para catéter, tubo cónico y bomba de vacío).
5. Enjuagar la aguja y el tubo de extensión del catéter después de cada raspado sumergiendo la aguja en el medio comercial de recuperación de ovocitos (EquiPro OPU Recovery Medium, MOFA Global, EE. UU.) o medio M199 con sales de Hank adicionado con Gentamicina.
6. Una vez que se hayan procesado todos los folículos exteriores visibles, cortar el ovario en rodajas de aproximadamente 1 cm de grosor para exponer los folículos interiores, realizar el mismo proceso descrito en el paso 4 y 5.
7. Verter el contenido recuperado del tubo cónico al filtro de embriones, posteriormente enjuagar de tres a cinco veces con medio de recuperación nuevo (abriendo y cerrando el paso de fluido del filtro).
8. Verter el contenido del filtro en una caja de Petri de 100 mm, utilizando una pipeta de 1000 μ L aspirar las burbujas presentes en el líquido, preferentemente colocar la pipeta al contorno del plato.



9. Bajo un microscopio estereoscópico localizar a los COCs, y transferirlos con ayuda de un capilar o pipeta de boca a una caja de Petri de 35 mm que contenga medio de recuperación de ovocitos.



10. Transferir los COCs a los platos de maduración *in vitro* previamente preparados y estabilizados, lavar los ovocitos en dos gotas del plato y colocar en la tercera gota un máximo de 10 ovocitos para su MIV. (Evitar contaminar las gotas de maduración con aceite o dejar burbujas de aire)



11. Los COCs deberán ser cultivados de 24 a 30 horas a 38,2 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% en aire.



2 Efecto de la melatonina sobre la expresión de MT1 y MT2 en las CC durante la maduración *in vitro* del COC

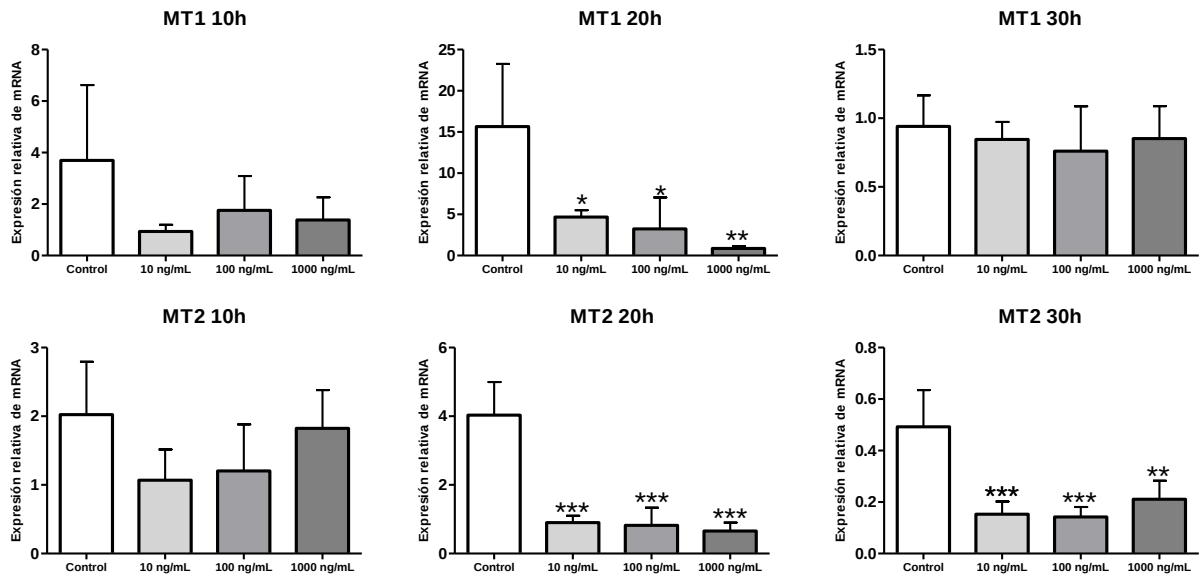


Figura 25. Expresión de receptores MT1 y MT2 en células del cúmulo durante la maduración *in vitro* del COC adicionado con MT. Los grupos de COC (n=10) se cultivaron bajo diferentes dosis de MT (10, 100 y 1000 ng / ml) o sin MT (control). El ARN total de las CC se recuperó a las 10, 20 y 30 h de iniciada la MIV y se analizó mediante PCR en tiempo real. Los datos de expresión génica se normalizaron utilizando el método Pfaffl (2001). Los datos se presentan con la media + DS (n=4 réplicas de cultivos independientes); los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (*P <0.05, **P <0.01 ***P <0.001; ANDEVA de una vía, seguido de HSD de Tukey)

3 Efecto de la melatonina en la expresión de genes relacionados con el metabolismo antioxidante en las CC durante la maduración *in vitro* del COC

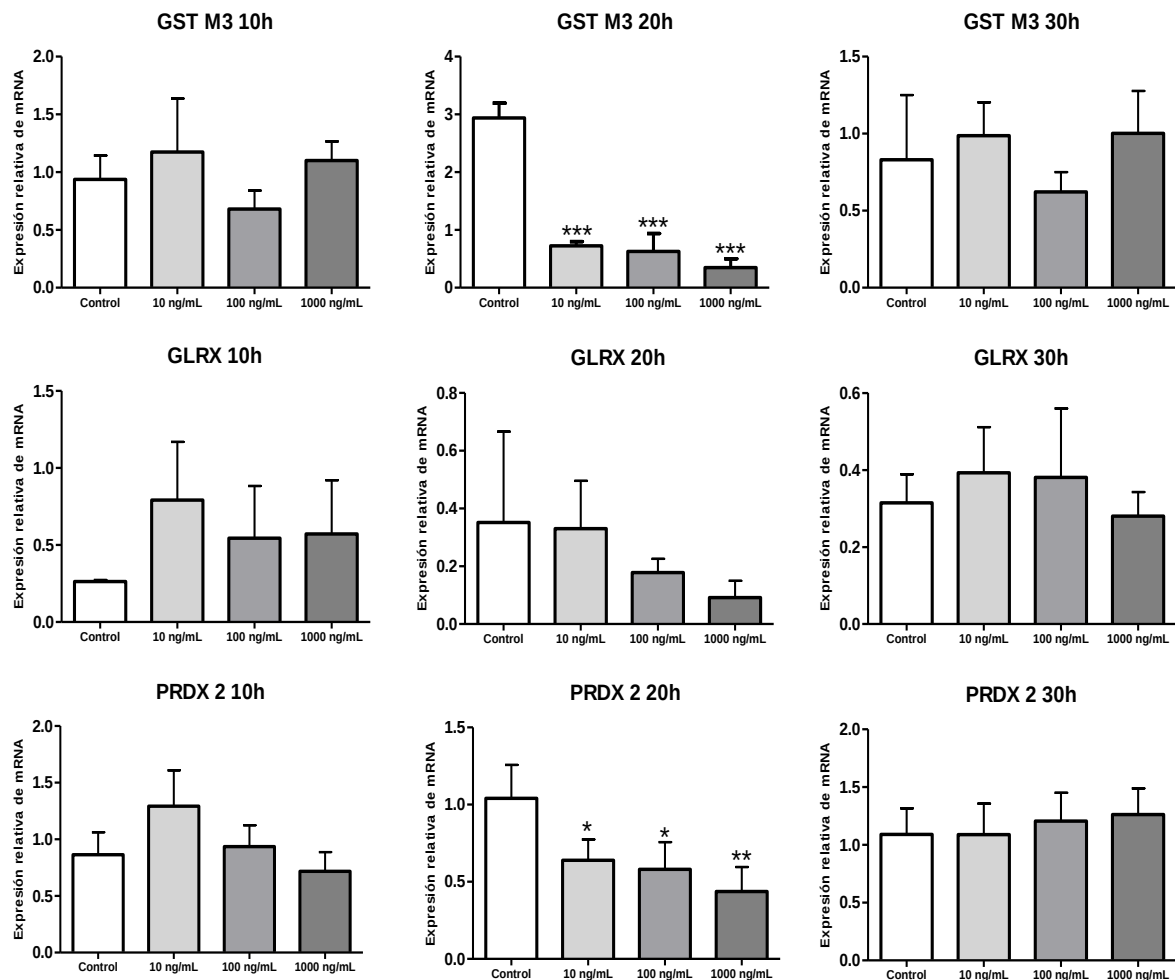


Figura 26 Expresión de genes relacionados con el metabolismo antioxidante en células del cúmulo durante la maduración *in vitro* del COC adicionado con MT. Los grupos de COC (n=10) se cultivaron bajo diferentes dosis de melatonina (10, 100 y 1000 ng/ml) o sin melatonina (control). El ARN total de las CC se recuperó a las 10, 20 y 30 h iniciadas la MIV y se analizó mediante PCR en tiempo real. Los datos de expresión génica se normalizaron utilizando el método Pfaffl (2001). Los datos se presentan con la media + DS (n=4 réplicas de cultivos independientes); los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (*P <0.05, **P <0.01 y ***P <0.001; ANDEVA de una vía, seguido de HSD de Tukey)

4 Efecto de la melatonina sobre la expresión de BAX, BCL2 y proporción BAX:BCL2 en CC durante la maduración *in vitro* del COC

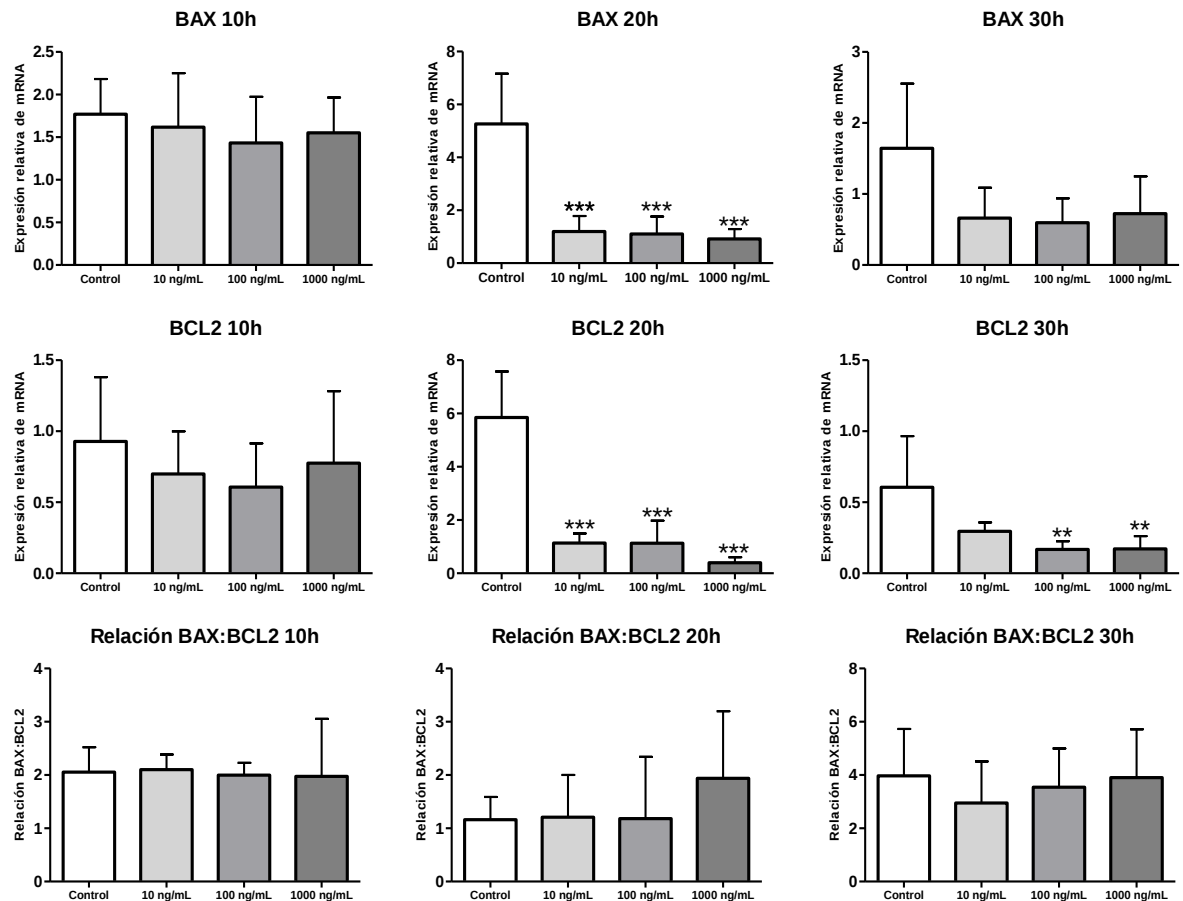


Figura 27 Expresión de BAX, BCL2 y la proporción BAX:BCL2 en células del cúmulo durante la maduración *in vitro* del COC adicionado con MT. Los grupos de COC (n=10) se cultivaron bajo diferentes dosis de MT (10, 100 y 1000 ng/ml) o sin MT (control). El ARN total de las CC se recuperó a las 10, 20 y 30-h de iniciada la MIV y se analizó mediante PCR en tiempo real. La relación BAX:BCL2 fue evaluada. Los datos de expresión génica se normalizaron utilizando el método Pfaffl (2001). Los datos se presentan con la media + DS (n=4 réplicas de cultivos independientes); los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (**P <0.01 ***P <0.001; ANDEVA de una vía, seguido de HSD de Tukey)

5 Efecto de la melatonina sobre la supervivencia celular y apoptosis temprana en las CC durante la maduración *in vitro* del COC

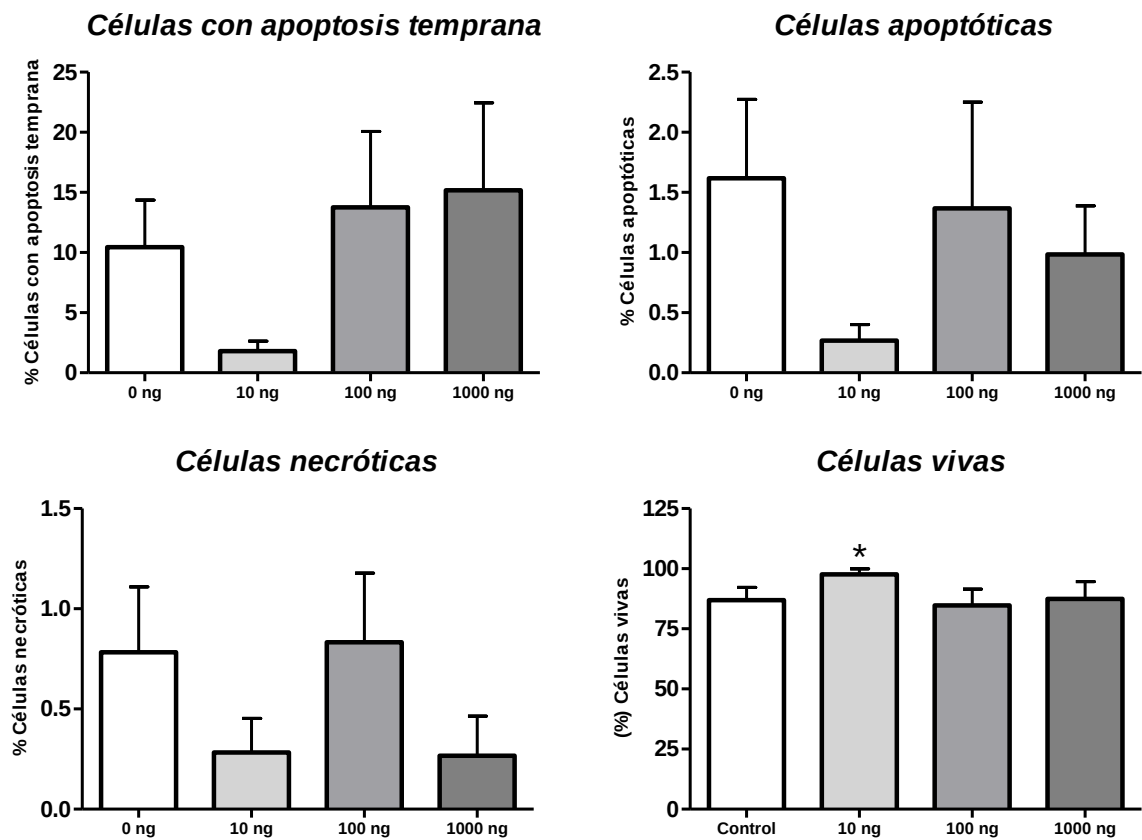


Figura 28 El efecto de la MT sobre la supervivencia y apoptosis de las CC. Los grupos de COC (n=10) se cultivaron bajo diferentes dosis de MT (10, 100 y 1000 ng/ml) o sin MT (control). Las CC fueron separadas mecánicamente de los ovocitos y recuperadas a las 30-h para ser analizadas por FACS. Los datos obtenidos en porcentaje se sometieron a transformación de arcoseno antes del análisis estadístico. Los datos se presentan con la media + DS (n=6 réplicas de cultivos independientes); los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (*P <0.05; ANDEVA de una vía, seguido de HSD de Tukey)

|

6 Efecto de la melatonina sobre los niveles de caspasa 3 escindida en los ovocitos durante la maduración *in vitro* del COC

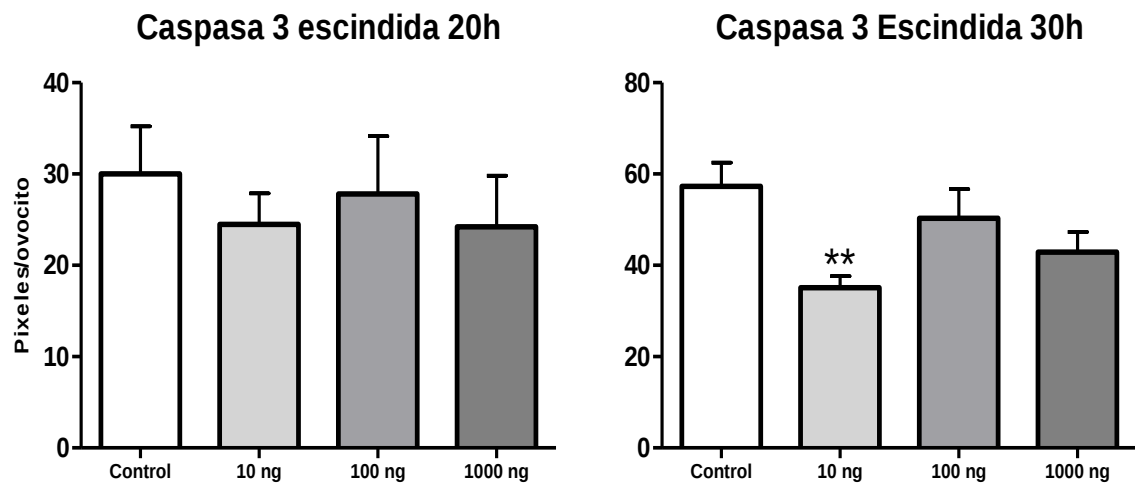


Figura 29 Niveles de caspasa 3 escindida en ovocitos durante la maduración *in vitro* del COC adicionado con MT. Los grupos de COC (n=10) se cultivaron bajo diferentes dosis de MT (10, 100 y 1000 ng/ml) o sin MT (control). Los ovocitos se recuperaron a las 20 y 30 h de iniciada la MIV y se analizaron mediante inmunofluorescencia para caspasa 3 escindida. Los datos se presentan con la media + DS (n=4 réplicas de cultivos independientes); los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (**P <0.01; ANDEVA de una vía, seguido de HSD de Tukey).

7 Efecto de la melatonina en la expresión de AREG, EREG y genes relacionados con la expansión del cúmulo durante la maduración *in vitro* del COC

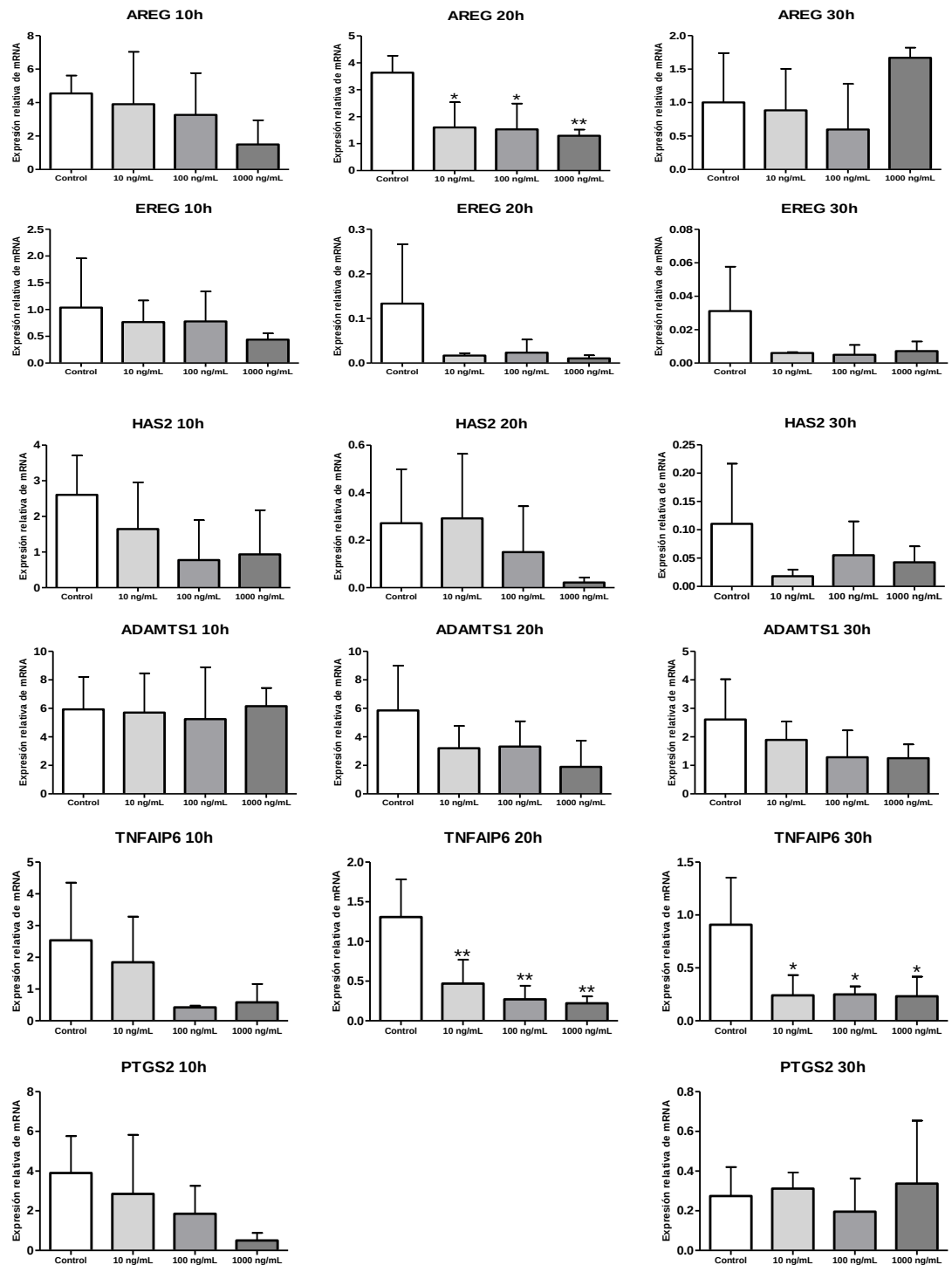


Figura 30 Expresión de AREG, EREG y genes relacionados con la expansión del cúmulo durante la maduración *in vitro* del COC adicionado con MT. Los grupos de COC (n=10) se cultivaron bajo diferentes dosis de MT (10, 100 y 1000 ng/ml) o sin MT (control). El ARN total de las CC se recuperó a las 10, 20 y 30 h de iniciada la MIV y se analizó mediante PCR en tiempo real. Los datos de expresión génica se normalizaron utilizando el método Pfaffl (2001). Los datos se presentan con la media + DS (n=4 réplicas de cultivos independientes); los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (*P <0.05, *P <0.01; ANDEVA de una vía, seguido de HSD de Tukey)