



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN**

**Y LA SALUD ANIMAL**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DEL FACTOR DE  
CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN 9 (GDF9) Y  
PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA 15 (BMP15)  
DURANTE LA MADURACIÓN DE OVOCITOS EQUINOS**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL**

**PRESENTA**

**KARLA VANESSA RUIZ GÁLVEZ**

**T.P. -Hilda Morayma Guerrero Netro (FMVZ-UNAM)**

**C.T. -Santiago René Anzaldúa Arce (FMVZ-UNAM)**

**Mouhamadou Diaw (FMV-UdeM)**



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., diciembre, 2023.**



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 mi madre, quien ha sido mi inquebrantable fuente de apoyo y ha mantenido una fe constante en mí.

A mi padre, tu guía perdura desde tu lugar en el universo, y tu ausencia se hace sentir cada día.

A mi hermana, un faro de inspiración en la búsqueda de sueños y la superación personal.

A Bryan, mi persona.

*“Déjennos elegir por nosotras mismas nuestro camino de vida,  
y déjennos sembrar ese camino con flores”*

- Émilie du Châtelet

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi distinguida tutora, la Dra. Hilda Morayma Guerrero Netro, por su confianza inquebrantable y guía constante a lo largo de mi desarrollo académico. Agradezco también su generosidad al compartir su valiosa experiencia, la cual ha fortalecido mi pasión por la ciencia. Así como a mi comité tutor, el Dr. Santiago René Anzaldúa Arce y el Dr. Mouhamadou Diaw, cuyas ideas, comentarios y orientación permanente han sido esenciales en este viaje. Su dedicación para mejorar mi formación y su papel fundamental en la elaboración de este trabajo de investigación son altamente apreciados.

Asimismo, deseo expresar mi gratitud a la Universidad Nacional Autónoma de México y al programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal por el apoyo brindado, el cual hizo posible mis estudios. Mi reconocimiento se extiende a la Universidad de Montreal y su Facultad de Medicina Veterinaria, especialmente al Centro de Investigación de Reproducción y Fertilidad (CRRF), donde tuve la oportunidad de llevar a cabo mi trabajo experimental. De igual manera a la Clínica Veterinaria de Québec y, en particular, a la Dra. Ruby Yoana Murcia, cuya orientación fue fundamental para establecer los protocolos que desarrollamos en este proyecto.

Mis más sinceros agradecimientos al proyecto SFMVRE84 del Departamento de Ciencias Clínicas de la UdeM y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IA205220 por su financiamiento crucial en mi investigación. También deseo reconocer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México y a PAEP-UNAM por las becas que me brindaron la oportunidad de crecer como investigadora y de viajar a Montreal para perfeccionar mis habilidades en el laboratorio de ovocitos equinos.

Por último, mi aprecio sincero hacia mi compañera de posgrado, amiga y mentora, Angélica Daniela Reyes Perea. Su apoyo y colaboración han sido invaluable en este trayecto académico y de investigación.

## RESUMEN

La maduración es el proceso mediante el cual el ovocito alcanza la metafase II (MII) y libera el primer cuerpo polar (PB). La maduración *in vitro* (IVM) es una técnica bien estandarizada en bovinos con una tasa de éxito del 95%, sin embargo en equinos esta técnica es limitada debido a su falta de estandarización, por lo que requiere ser mejorada. El factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9) y la proteína morfogenética ósea 15 (BMP15) son proteínas altamente estudiadas en otras especies, probando que son esenciales para la mitogénesis y diferenciación de las células del cumulus (CC), además de estar directamente implicadas en las cascadas de señalización necesarias para el reinicio de la meiosis por parte del ovocito. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de GDF9 y BMP15 en el ovocito equino al ser adicionados durante la IVM. Los ovocitos se colectaron de ovarios de yegua provenientes de rastro, y se incubaron en medio de maduración comercial adicionado con 50ng/mL de GDF9, BMP15 o ambas proteínas. Después de 36 horas de incubación, se tiñó la cromatina de los ovocitos y las CC fueron colectadas para evaluar la expresión de los receptores *Bmpr1*, *Bmpr2*, así como de los marcadores de maduración *Areg*, *Ereg*, *Has2*, *Ptgs2*, *Tnfrsf10b* y *Ptx3*, mediante RT-qPCR. El 36.25% de los ovocitos madurados con 50 ng/mL de BMP15 alcanzaron la MII, lo cual fue significativamente mejor en comparación con los grupos control (3.25%), 50 ng/mL GF9 (3.25%), y GDF9 + BMP15 (5%) ( $P < 0.05$ ). La expresión relativa de *Bmpr1a*, *Bmpr1b* and *Bmpr2*, *Ereg*, *Ptgs2* and *Has2* fue significativamente mayor en las CC incubadas con BMP15 en comparación con el grupo control ( $P < 0.05$ ). Con base en los resultados se concluyó que la adición de 50 ng/mL de BMP15 mejora la maduración de los ovocitos equinos a partir de la activación de las vías para el reinicio de la meiosis, similar a lo observado anteriormente en otras especies.

Palabras clave: IVM, equino, COC, ovocito, BMP15, GDF9.

## ABSTRACT

During maturation the oocyte reaches the metaphase II and releases the first polar body. *In vitro* maturation (IVM) has been well developed in bovine with a success rate of near 95%, however in equine this technique is limited due to lack of standardization, therefore this technique needs improvement. Growth and differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein (BMP15), have been proven to be essential for the mitogenic and differentiation action in the cumulus cells (CC), besides being directly involved in the activation of pathways necessary for its expansion and resumption meiosis of the oocyte in different species. The aim of this study was to evaluate the function of exogenous GDF9 and BMP15 in equine cumulus-oocyte complexes (COC) when added to the IMV medium. COCs were collected from slaughterhouse-derived ovaries and exposed to commercial medium containing 50ng/mL of GDF9, BMP15, or both factors. After 36 h of maturation oocytes were stained to evaluate nuclear maturation. CC relative expression of *Bmpr1b* and *Bmpr2*, *Areg*, *Ereg*, *Ptgs2*, *Ptx3*, *Tnfrsf10b* and *Has2* was evaluated through RT-qPCR. Oocytes treated with 50 ng/mL of BMP15 resulted in 36.25% of maturation, which was significantly different, in comparison with the control (3.25%), 50 ng/mL GDF9 (3.25%), and GDF9 + BMP15 (5%) (P<0.05). Relative expression of receptors *Bmpr1a*, *Bmpr1b* and *Bmpr2*, *Ereg*, *Ptgs2* and *Has2* was significantly higher in the BMP15 CC in comparison with the control (P<0.05). We concluded that the addition of 50 ng/mL of BMP15 to equine oocyte maturation media significantly improves maturation through the activation of pathways for meiosis resumption like previously described in other species.

Key words: IVM, equine, COC, oocyte, BMP15, GDF9.

# CONTENIDO

<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
<b>IMPORTANCIA DE LA REPRODUCCIÓN EQUINA</b> .....	<b>3</b>
<b>ANATOMÍA REPRODUCTIVA DE LA YEGUA</b> .....	<b>3</b>
<b>ENDOCRINOLOGÍA REPRODUCTIVA Y ESTACIONALIDAD</b> .....	<b>6</b>
<i>Ciclo estral de la yegua</i> .....	<b>7</b>
<i>Foliculogénesis y ovogénesis</i> .....	<b>8</b>
<b>COMPLEJO CUMULUS OVOCITO</b> .....	<b>10</b>
<i>Morfología del complejo cumulus ovocito equino</i> .....	<b>12</b>
<b>MADURACIÓN DEL OVOCITO</b> .....	<b>13</b>
<i>Control del arresto meiótico</i> .....	<b>13</b>
<i>Reinicio de la meiosis</i> .....	<b>14</b>
<b>MADURACIÓN IN VITRO</b> .....	<b>15</b>
<b>FERTILIZACIÓN IN VITRO</b> .....	<b>16</b>
<b>CULTIVO DE EMBRIONES IN VITRO</b> .....	<b>18</b>
<b>SUPERFAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF-<math>\beta</math>)</b> .....	<b>19</b>
<i>Factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9)</i> .....	<b>20</b>
<i>Proteína morfogenética ósea 15 (BMP15)</i> .....	<b>21</b>
<i>Mecanismo de acción durante la maduración</i> .....	<b>22</b>
<i>GDF9 y BMP15 como tratamiento exógeno durante la IVM</i> .....	<b>23</b>
<i>GDF9 y BMP15 en equinos</i> .....	<b>24</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>25</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>26</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>26</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>RECUPERACIÓN DEL COMPLEJO CUMULUS OVOCITO</b> .....	<b>27</b>
<b>SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GDF9 Y BMP15</b> .....	<b>27</b>
<b>MADURACIÓN IN VITRO</b> .....	<b>28</b>
<b>EVALUACIÓN DE LA MADURACIÓN</b> .....	<b>28</b>

<i>Expansión de las células del cumulus</i> .....	28
<i>Configuración de la cromatina</i> .....	29
FERTILIZACIÓN POR CO-CULTIVO.....	30
<i>Preparación del semen</i> .....	30
<i>Preincubación y co-cultivo</i> .....	31
<i>Cultivo de embriones (IVC)</i> .....	31
<i>Evaluación de fertilización</i> .....	32
EVALUACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN LAS CÉLULAS DEL CUMULUS.....	33
<i>Extracción de RNA</i> .....	33
<i>RT-qPCR</i> .....	33
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	34
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
EFFECTO DE GDF9 Y BMP15 EN LA EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CUMULUS.....	35
EFFECTO DE GDF9 Y BMP15 EN LA CONFIGURACIÓN DE LA CROMATINA .....	35
<b>GV (VESÍCULA GERMINAL); GVBD (RUPTURA DE VESÍCULA GERMINAL); MI (METAFASE I); AI</b> <b>(ANAFASE I), MII (METAFASE II) Y DEGRADADOS EN CADA GRUPO EXPERIMENTAL (CONTROL, GDF9</b> <b>(50 NG/ML), BMP15 (50 NG/ML), O MIX (50 NG BMP15 + 50 NG GDF9/ML), ** MUESTRA</b> <b>DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS (P&lt;0.005).....</b>	<b>36</b>
EFFECTO DE BMP15 EN LA TASA DE SEGMENTACIÓN.....	36
EFFECTO DE BMP15 EN LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES BMP.....	37
EFFECTO DE BMP15 EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES MOLECULARES DEL REINICIO DE LA MEIOSIS .....	38
EFFECTO DE BMP15 EXPRESIÓN DE MARCADORES MOLECULARES DE LA EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CUMULUS .....	39
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>44</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>45</b>
DISEÑO EXPERIMENTAL .....	45
<i>Tasa de expansión con efecto de tratamiento:</i> .....	45
<i>Tasa de maduración con efecto del tratamiento:</i> .....	45
LISTA DE FIGURAS.....	48
LISTA DE CUADROS.....	49
ABREVIATURAS.....	49
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>51</b>

## INTRODUCCIÓN

Dentro de la producción *in vitro* de embriones (IVEP), se encuentran las técnicas de maduración y fertilización de ovocitos, cultivo y transferencia de embriones. La implementación de éstas tecnologías es importante para mejorar las tasas de preñez dirigida y consecuentemente mejorar la selección y mantenimiento de genética deseable (IFCE, 2020). En equinos estas tecnologías fueron introducidas hace 50 años (Squires, 2020) sin embargo, los resultados obtenidos se han visto limitados debido a la dificultad para lograr la maduración de ovocitos *in vitro* (IVM) y su posterior fertilización (Carnevale, 2016; Hinrichs, 2018).

En bovinos, que es la especie más estandarizada en el uso de estas tecnologías, se han reportado una tasa de éxito en la IVM del 95%, (Duarte da Fonseca, 2022; Ferré, 2016), sin embargo, en equinos esta tecnología es limitada, con un porcentaje de éxito de entre 20.6 a 56.9% (Gabrys, 2022; Cales, 2022). Las bajas tasas de maduración, así como su variabilidad se han atribuido a la falta de estandarización de las técnicas y protocolos para la IVEP de esta especie, así como a la alta susceptibilidad del ovocito a ambientes *in vitro*, que consecuentemente disminuyen su calidad y su capacidad de fertilización (Hinrichs, 2010), por lo anterior es importante mejorar las condiciones *in vitro* analizando los requerimientos del ovocito, y otorgarle un ambiente adecuado para así lograr incrementar las tasas de maduración como primer paso para de la IVEP.

Durante la maduración los ovocitos adquieren su capacidad de ser fertilizados al completar la primera división meiótica, liberando el primer cuerpo polar y alcanzando la etapa de metafase II (MII) (Lonergan and Fair, 2016). Para que se lleve a cabo la maduración *in vivo*, debe existir la interacción entre los factores secretados por los ovocitos (OSFs) y las células foliculares circundantes, que incluye a las células de la granulosa (CG) y a las células del cumulus (CC) (Kim, Kim and Shim, 2016a). En ratones (Dong *et al.*, 1996), humanos (Fitzpatrick *et al.*, 1998), rumiantes (Bodensteiner *et al.*, 1999; Galloway *et al.*, 2000) y porcinos (Brankin *et al.*, 2005) se ha reportado la presencia de OSFs, entre los cuáles se encuentran el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9) y la proteína morfogenética ósea (BMP15) ambos miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) (Sanfins, Rodrigues and Albertini, 2018).

Debido a su presencia en diversas especies, se han estudiado las funciones de estos factores, de entre las más relevantes para la maduración del ovocito se encuentran su acción mitogénica y de diferenciación en las CG y CC, la activación en la expresión de genes necesarios para la expansión del cumulus (Matzuk *et al.*, 2002; Gilchrist, Ritter and Armstrong, 2004; Hutt and Albertini, 2007), inicio en la cascada de reanudación de la meiosis, e inhibición de la producción de progesterona y consecuente luteinización de las CG (Knight and Glistler, 2006a). De igual manera, se han utilizado adicionados al medio de maduración en diversas especies, en ratones se reportó que la adición de >100ng/mL de GDF9 y BMP15 al medio de maduración favorecía significativamente la expansión de las células del cumulus (Koji Sugira *et. al.*, 2007). Mientras que, al ser adicionado en el medio para madurar ovocitos bovinos, se reportó un aumento significativo en el porcentaje de COCs expandidos a grado 3, indicativo morfológico de maduración (Caixeta *et al.*, 2013a).

A pesar de que las funciones de los factores GDF9 y BMP15 han sido ampliamente estudiadas en otras especies, en equinos no es el mismo caso, hasta el 2017 se reportó por primera vez la expresión de estos factores en el tejido ovárico de yeguas, siendo la expresión de estos, mayor en los folículos en la etapa de reclutamiento y crecimiento (Stefaniuk-Szmukier *et. al.*, 2017), sin embargo no se conoce si estos factores actúan de la misma manera y en los mismos procesos como en los previamente descritos en bovinos y murinos. Considerando los antecedentes es posible que la función de GDF9 y BMP15 sea igualmente relevante en equinos como en otras especies, por lo que se propone que al añadirlo como tratamiento para la IVM de ovocitos de yeguas mejore las tasas de maduración y consecuentemente de éxito en el proceso de IVEP.

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

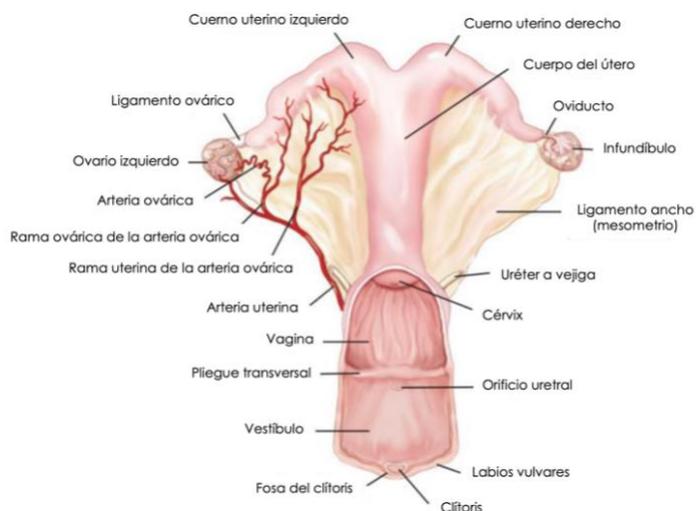
### **IMPORTANCIA DE LA REPRODUCCIÓN EQUINA**

Según la FAO, la población mundial de caballos supera los 58 millones, y México ocupa el segundo lugar con mayor número de ejemplares en América, con una tendencia a aumentar debido a su uso en actividades recreativas y deportivas. El rendimiento en estas actividades depende de varios factores, como la genética, la salud y el temperamento, por lo que los animales con características deseables se utilizan para la reproducción. Aunado a la importancia de mantener su valor genético, el caballo doméstico funciona como modelo para optimizar la preservación y producción de embriones de especies salvajes de équidos en peligro de extinción (UICN). Sin embargo, es importante señalar que debido a problemas de subfertilidad en las yeguas, que ocasionan pérdidas económicas y genéticas importantes en la industria equina, en los últimos años se ha prestado mayor atención al desarrollo de las tecnologías reproductivas en esta especie, con el objetivo de mejorar las tasas de éxito para el mantenimiento de genética deseable o bien para programas de conservación. Pese a la amplia investigación que se ha llevado a cabo, la especie equina aun dista por mucho el poder alcanzar tasas de éxito cercanas a las obtenidas en la especie bovina, que es la especie animal doméstica de referencia (Coutinho da Silva, 2008; K. Hinrichs, 2010), por lo que se busca delucidar el comportamiento de las células involucradas en la reproducción para así poder optimizar los resultados obtenidos mediante tecnologías reproductivas.

### **ANATOMÍA REPRODUCTIVA DE LA YEGUA**

El aparato reproductor de la yegua se divide en órganos externos e internos. Externamente se encuentra la vulva que protege la entrada a la vagina (Fig. 1). Es pigmentada con glándulas sebáceas, nervios y vasos sanguíneos, cranealmente se encuentra el bulbo vestibular que mantiene al pene en su lugar durante la cópula, y lateralmente se localizan los labios vulvares, en los cuales se sitúa el músculo constrictor de la vulva, el cuál mantiene sellada la entrada (McKinnon et al., 2011). Por su parte el perineo corresponde a la piel que abarca desde los labios vulvares externos hasta la que circunda el ano, en la yegua, la conformación de esta zona tiene

relevancia clínica, ya que protege la entrada de aire, sólidos y bacterias al tracto genital (Ginther, 1992; Davies Morel, 2008).



**Figura 1. Vista dorsal del tracto reproductivo de la yegua.**

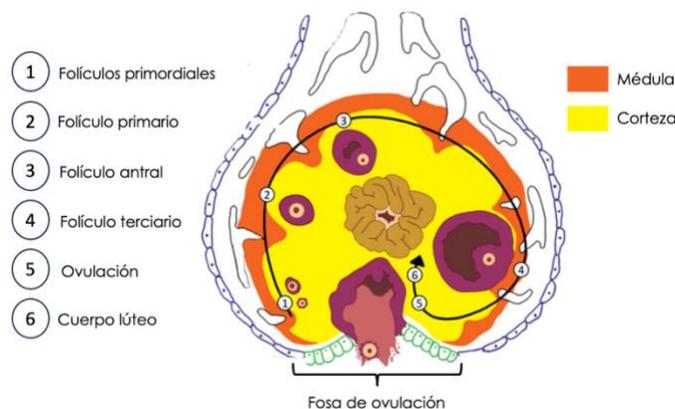
Imagen representativa de las estructuras anatómicas que conforman el tracto reproductivo de la yegua, no se muestran las uniones del ligamento ancho a las paredes abdominal y pélvica, y se omite la pared dorsal de la vagina para mostrar la superficie mucosa de la os cervical externa, vagina y vestíbulo. Modificada de (Brinsko and Blanchard, 2011).

La vagina de la yegua mide de 18 a 23 cm de longitud y de 10 a 15 cm de diámetro. Sus paredes son musculares, a excepción de la pared dorsal lo cual provee elasticidad, a su vez que mayor relajación durante el parto. En su porción caudal presenta células productoras de moco, el cual funciona como bactericida, sin embargo, también es espermicida, por lo que el semen debe ser depositado en la porción craneal del cérvix o inicio del útero (Davies Morel, 2008; Brinsko and Blanchard, 2011).

El cérvix en la yegua se diferencia por tener internamente pliegues longitudinales que continúan hacia los pliegues endometriales del útero, así como por contener una capa muscular rica en fibras elásticas, lo cual le permite expandir y contraer su lumen durante la cópula, así como durante el parto para facilitar la salida del potro, mientras que durante el diestro y la gestación se cierra firmemente, otra diferencia en esta especie es que su os externa protruye hacia el lumen vaginal y lo rodea el fórnix (Steven P. Brinsko, 2011).

El útero de la yegua se encuentra suspendido en cavidad pélvica y abdominal por el ligamento ancho, a diferencia de otras especies, en ausencia de gestación su lumen es poco visible debido a la pared colapsada y a los prominentes pliegues endometriales. Continuamente al útero se encuentran los oviductos que en su epitelio presentan cilios que conducen hacia el útero. El oviducto se divide en tres porciones: el infundíbulo, que envuelve al ovario en la zona de la fosa de ovulación lo cual facilita la entrada del ovocito al oviducto, la ampulla dónde ocurre la fertilización y la segmentación inicial del embrión, y el istmo, que conecta al ampulla con el cuerno uterino y que funciona como un lugar de transporte y reserva de espermatozoides (Davies Morel, 2008).

Los ovarios en la yegua son el órgano más craneal del aparato reproductivo, se localizan en el área lumbar suspendidos por el ligamento ancho. A diferencia de otras especies internamente está constituido por la corteza ovárica dónde se distribuyen folículos en diferentes etapas de desarrollo, con excepción del área correspondiente a la fosa ovulatoria; la corteza está rodeado por una capa de tejido muy delgada correspondiente a la médula (Fig. 2). Por su parte, la fosa ovulatoria es el único lugar dónde ocurre la ovulación, el resto de la superficie ovárica está rodeado por el peritoneo visceral (Brinsko and Blanchard, 2011; McKinnon *et al.*, 2011; Benammar *et al.*, 2021).



**Figura 2. Anatomía del ovario y foliculogénesis en la yegua.**

Esquema representativo de la anatomía ovárica de la yegua, se observa en color naranja la médula localizada en la porción externa del parénquima y en color amarillo a la corteza distribuida en el interior, dónde se lleva a cabo la foliculogénesis, ovulación en la fosa, ubicada en el externo inferior, y formación del cuerpo lúteo.

Modificado de (Benammar *et al.*, 2021).

El folículo ovárico es la unidad funcional de ovario, contiene al ovocito que eventualmente será ovulado, fertilizado y formará al embrión, además, provee hormonas esteroides y proteicas requeridas para el mantenimiento del ciclo estral, inducir las características de receptividad sexual hacia el macho y la preparación del útero para la implantación del embrión (Bristol and Woodruff, 2004). Los folículos se constituyen por las células de la teca (CT), granulosa (CG) y el ovocito, cada una de éstas células tiene funciones específicas durante la foliculogénesis, estereidogénesis y ovogénesis (Orisaka *et al.*, 2009). El ovocito se encuentra rodeado inicialmente por una capa de células de la granulosa, que cambia morfológicamente y prolifera cuando el ovocito inicia el proceso de foliculogénesis, junto con las células de la teca son encargadas de la síntesis de hormonas esteroides (Baumgarten and Stocco, 2018). La células de la teca derivan de células mesenquimales y se dividen en dos capas, la interna y externa (Orisaka *et al.*, 2009), la capa externa está compuesta por tejido conectivo que rodea y sostiene al folículo antral (Erickson et al., 1985). Propiamente en la yegua, las uniones gap entre las CC y las CG murales dejan poco espacio extracelular entre ellas, mientras que las CC presentan procesos que se extienden hacia la teca interna, anclando al ovocito a la membrana basal (Hawley, et al., 1995; Hinrichs, 2010).

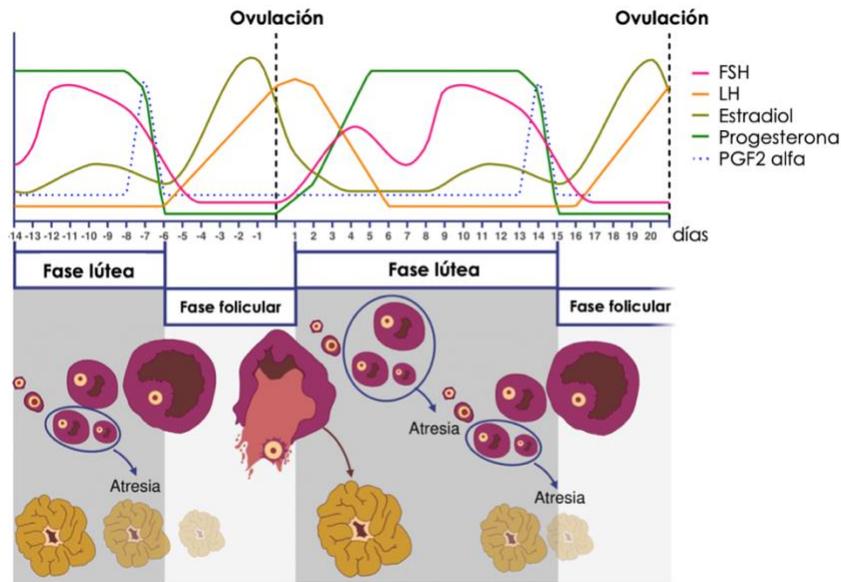
## ENDOCRINOLOGÍA REPRODUCTIVA Y ESTACIONALIDAD

En el sistema endócrino se constituye por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, además de la glándula pineal y el endometrio. El hipotálamo produce pulsos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual envía esta información hacia la hipófisis anterior estimulando la liberación de gonadotropinas, la hormona foliculoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), las cuales entran a circulación sistémica, FSH estimulando por su parte el reclutamiento y crecimiento folicular, mientras que LH estimula la maduración folicular y ovocitaria, así como la producción de estrógenos, ovulación y luteinización del cuerpo lúteo (CL) (Ginther, 1992; Raz and Aharonson-Raz K., 2012). El momento en que FSH o LH son liberadas, depende directamente del patrón pulsátil de GnRH así como de la retroalimentación por parte del ovario mediante la producción de inhibina, estradiol y progesterona (Irvine and Alexander, 1994), en yeguas sin embargo, a diferencia de otras especies domésticas el pico de LH previo a la ovulación no existe, en su lugar, los niveles de LH se elevan gradualmente durante el estro y alcanzan su nivel más alto después de la ovulación (Katrin Hinrichs, 2010). Las yeguas son animales

estacionales de días largos, considerando esto, la época ovulatoria fisiológica de la yegua ocurre de principios de primavera hasta finales de verano (Williams et al., 2012). La regulación de la estacionalidad se da por el fotoperíodo que actúa como un marcapasos circadiano para sincronizar el ciclo ovárico, resultando en una disminución significativa en la síntesis y liberación de LH por parte de la adenohipófisis, por el contrario la concentración de FSH producida por la hipófisis no se ve afectada a lo largo del año (Hart et al., 1984), y hasta la fecha no se ha reportado que esta disminución coincida con una disminución en la frecuencia, amplitud o concentración de GnRH (Williams et al., 2012). En cuanto a la dinámica folicular, se ha observado que durante la época anovulatoria los folículos alcanzan un tamaño máximo de 20 mm previo a su regresión, lo cual sugiere que, si bien no existe un cambio en producción de FSH si existe un cambio en la sensibilidad a esta gonadotropina, de tal forma que en la época reproductiva los receptores a FSH aumentan en los folículos a partir de 15 mm de diámetro y que resultan en un aumento en la secreción de LH, inhibina y estradiol, con la consecuente retroalimentación negativa de FSH (Eagle and Tortonesi, 2000; Donadeu and Watson, 2007).

### **Ciclo estral de la yegua**

El ciclo estral se define como el periodo transcurrido entre dos ovulaciones, cada una acompañada de signos de estro y disminución en las concentraciones de progesterona (Ginther, 1992; Nagy, Guillaume and Daels, 2000). En la yegua el ciclo estral tiene una duración promedio de 21 días (18 a 24) y se divide en fase folicular (estro) con una duración de 3 a 4 días durante la época ovulatoria (Adams and Bosu, 1988), en la cual la yegua es receptiva al macho y el tracto reproductivo está preparado para transportar al ovocito y espermatozoides al sitio de fertilización en la región ampular del oviducto (Crowell-Davis, 2007). La segunda fase, la lútea (diestro), tiene una duración constante de 14 días y que se caracteriza porque la hembra no es receptiva y el tracto reproductivo está preparado para albergar y nutrir a un cigoto, bajo el efecto de progesterona liberada por el CL, el cual regresionará por acción de prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ) liberada del endometrio de la yegua no gestante (Roser *et al.*, 1982) (Fig. 3).



**Figura 3. Cambios endócrinos y ováricos durante el ciclo estral de la yegua.**

Esquema representativo del ciclo estral de la yegua, en la parte superior se observan las fluctuaciones endócrinas de FSH (rosa), LH (naranja), estradiol (café), progesterona (verde), y prostaglandina (PGF2 alfa) (azul punteada). En la parte inferior se esquematiza la dinámica folicular, se presentan en la fase lútea al cuerpo lúteo y folículos en atresia (días 1 a 15), y la fase folicular donde se lleva a cabo el crecimiento folicular y la ovulación (día 15 a 21).

Modificado de (Benammar et al., 2021).

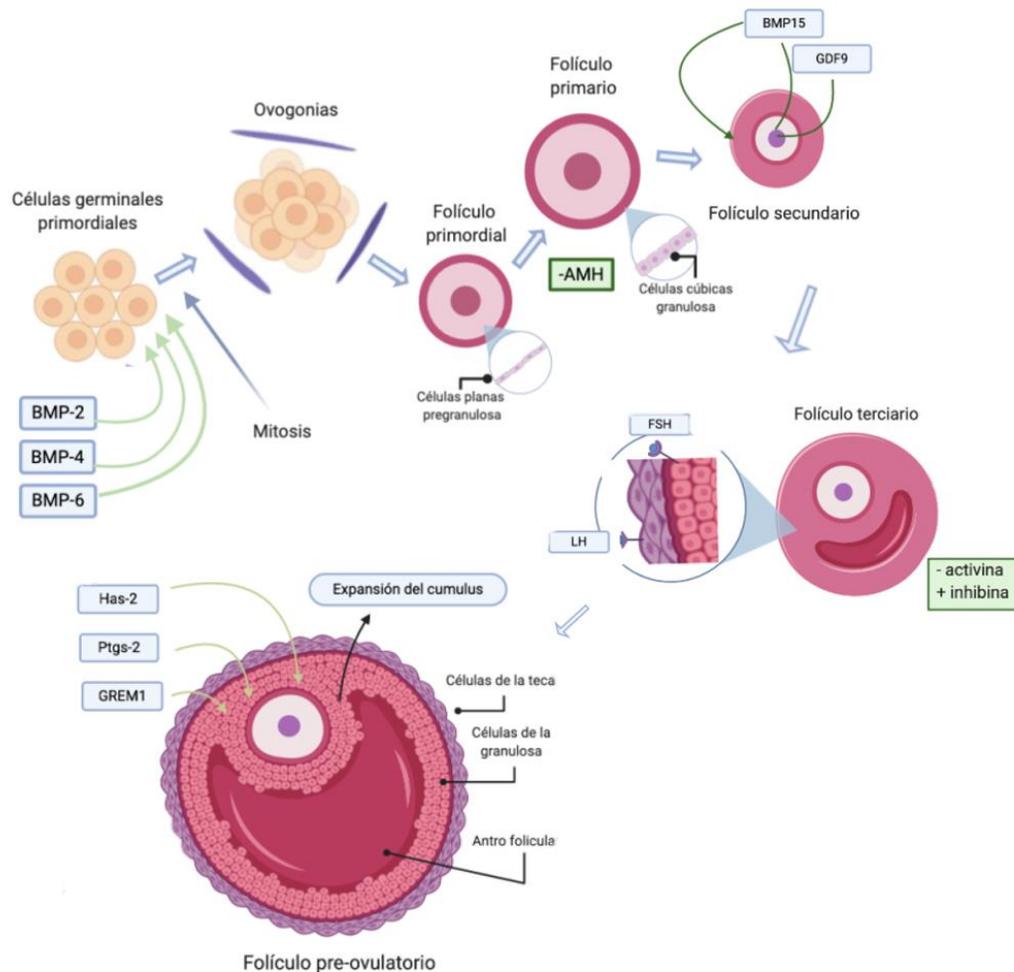
### Foliculogénesis y ovogénesis

Durante el desarrollo embrionario el mesodermo extraembrionario da origen a las células germinales primordiales, este proceso es regulado por proteínas morfogenéticas óseas (BMP) (Ying and Zhao, 2001), las cuales migran a la cresta genital donde al dividirse por mitosis dan lugar a las oogonias (Sánchez and Smitz, 2012), para posteriormente iniciar su división meiótica dando lugar a los ovocitos primarios (Ginsburg, Snow and McLaren, 1990). El proceso meiótico se detiene en la etapa de dictioteno, este tipo de ovocitos constituyen el reservorio total de células germinales y se encuentran rodeados por células somáticas (pre-granulosa), formando los folículos primordiales, los cuales son reclutados en cohortes durante la foliculogénesis; durante la primera parte de este proceso el ovocito crece y se diferencia además de desarrollar receptores para FSH y LH en las células de la granulosa y teca, respectivamente, hasta este punto el proceso es independiente de gonadotropinas (Sánchez and Smitz, 2012; Conti and Chang, 2015). Posteriormente el folículo transiciona a primario en el cual las células de la granulosa ya son cuboides con receptores a FSH y presentan uniones tipo gap formadas por conexinas, además el

ovocito incrementa el número de mitocondrias, lo que refleja el aumento de requisitos energéticos por parte de la célula (Hyttel *et al.*, 1997), en este momento el desarrollo folicular es mediado por gonadotropinas.

El cambio del folículo primario a secundario está regulado por factores producidos por los ovocitos (Kol and Adashi, 1995), estos factores son GDF9 y BMP15 que estimulan la proliferación de las células de la granulosa, el desarrollo folicular y la ovulación (Sánchez and Smitz, 2012). Morfológicamente, el ovocito presenta gránulos corticales en su citoplasma, e inicia la deposición de la zona pelúcida (ZP) (Hyttel *et al.*, 1997), además se encuentra más de dos capas de células de la granulosa. Posteriormente comienza a acumularse líquido entre las células de la granulosa, dando lugar al antro folicular, las células de la granulosa se diferencian a células del cumulus y células murales, dando origen al folículo terciario (Erickson, 2000; Sánchez and Smitz, 2012), durante esta etapa participan las proteínas activinas e inhibinas. La activina disminuye conforme la diferenciación de las células de la granulosa y el desarrollo folicular aumentan, mientras que la inhibina predomina (Findlay *et al.*, 2000), los folículos en esta etapa son secretorios de hormonas esteroides principalmente andrógenos y estrógenos, permitiendo el desarrollo folicular y activando la producción de sus propios receptores, en estos folículos, el ovocito continúa su crecimiento y presenta modificación, proliferación y redistribución de sus organelos (Fair, 2003).

Finalmente, el folículo preovulatorio contiene un ovocito maduro al momento de la ovulación que es inducida por LH. Cuando se presenta el pico de LH el folículo continúa su crecimiento y el ovocito concluye su maduración, la cual está caracterizada por la descondensación de la cromatina y el progreso de la meiosis hasta la metafase II (MII), mientras que en las CC ocurre la expansión, la cual es promovida por la expresión de los genes hialuronano sintasa 2 (Has2), prostaglandina-endoperoxidosintasa 2 (Ptgs2) y GREM1 (Rajkovic, Pangas and Matzuk, 2006) (Fig. 4).



**Figura 4. Foliculogénesis y ovogénesis**

Figura representativa de los factores implicados en la formación de células germinales primordiales (PGC), ovogénesis y foliculogénesis. Los factores producidos por las células de la teca (CT), de la granulosa (CG), y las células germinales, participan y regulan el desarrollo de ovocitos y folículos, cada uno en una etapa específica de la foliculogénesis.

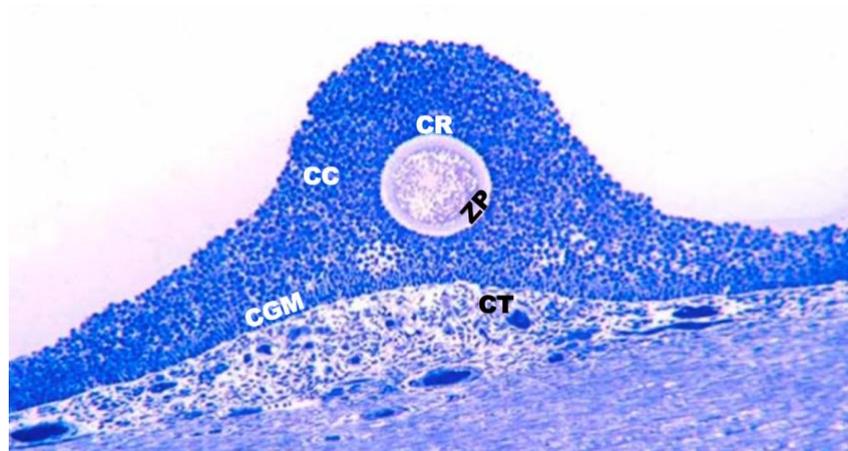
Basado en (Sánchez F., 2012)

## COMPLEJO CUMULUS OVOCITO

Las células del cumulus (CC) son células de la granulosa diferenciadas, las cuales rodean al ovocito formando el complejo cumulus ovocito (COC) en el cual se da la comunicación necesaria para la expresión y síntesis de proteínas necesarias para el crecimiento y diferenciación de las células, la maduración meiótica, la ovulación y la fertilización (Turathum *et al.*, 2021). Las CC se comunican mediante uniones tipo gap, formadas por conexinas (Cx), la Cx43 une a las CC, mientras que la Cx37 une a las CC con el ovocito (Gittens and Kidder, 2005). Dentro de las

funciones de las CC se encuentra la producción de ácido hialurónico (HA) necesario para la expansión del complejo en respuesta al aumento en la secreción de gonadotropinas y de la producción de factores secretados por el ovocito (OSFs) (Turathum et al., 2021).

En equinos, a diferencia de otros mamíferos, el cumulus es más íntegro debido a que las células se distribuyen de manera compacta, dejando mínimo espacio intercelular, impidiendo determinar un borde entre estas células y las células de la granulosa murales, asimismo, debido a esta estrecha conformación, el sitio de unión a la pared folicular es mayor, ya que las células murales se extienden hasta la teca interna mediante procesos membranales (Brück, Greve y Hyttel, 1999; Da et al., 2006) (Fig. 5). Estas características han representado un retraso en la aplicación de biotecnologías en la especie equina, ya que disminuye la tasa de recuperación de ovocitos por ovario y aumenta el número de COC dañados o sin CC durante la colecta si no se utiliza la técnica apropiada, que hasta ahora se reporta debe ser mediante curetaje de la pared folicular, lo cual requiere mayor esfuerzo y tiempo por parte del personal que lo realiza (Hawley, Enders and Hinrichs, 1995).



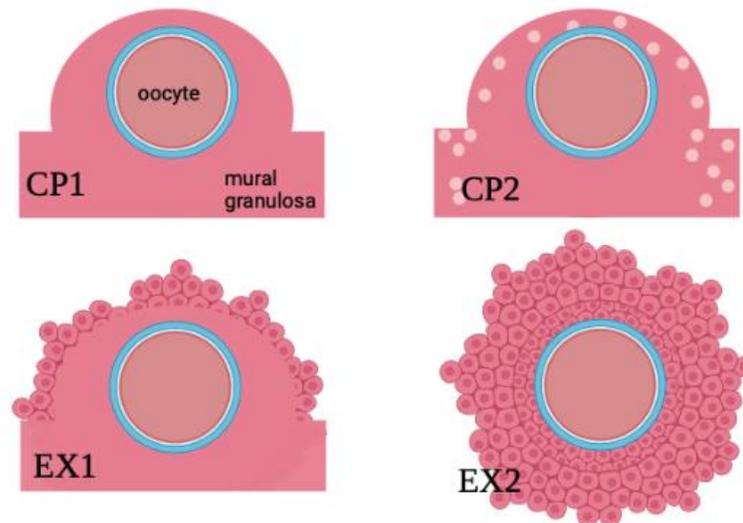
**Figura 5. Ovocito equino dentro del folículo *in situ*.**

Microfotografía del complejo cumulus-ovocito (COC) dentro del folículo. La corona radiada (CR) rodea de estrechamente a la zona pelúcida (ZP), mientras que las células del cumulus (CC) se distribuyen de manera compacta. En la base del COC se presenta una capa de células de la granulosa murales (CGM) con morfología columnar que se distribuyen estrechamente a lo largo del folículo sobre las células de la teca (CT).

Adaptado de (Hinrichs, 2010).

## Morfología del complejo cumulus ovocito equino

Diversos investigadores han categorizado el COC equino de acuerdo con la morfología de la expansión del las CC en dos grupos: compactos (Cp) y expandidos (Ex), a su vez, cada grupo se subdivide en dos: Cp1, que se caracteriza por tener un cúmulo compacto de apariencia lisa, y Cp2, que presenta un cúmulo compacto de apariencia granular, Ex1, con moderada expansión y CC individuales visibles, y Ex2, que muestra una expansión completa con la matriz extracelular visible entre las células (Hawley, Enders and Hinrichs, 1995) (Fig. 6). Estas diferencias morfológicas tienen un impacto directo en el desarrollo del ovocito, se ha reportado que los COC Cp provienen de folículos juveniles y que, a pesar de ser viables no son competentes para madurar *in vitro*, mientras que, los COC Ex se presentan en folículos atrésicos, pero que sin embargo tienen ovocitos con una alta competencia meiótica, lo que se observa con mayores tasas de maduración además de alcanzar la MII en menos tiempo que los COC Cp (Hinrichs and Williams, 1997, Hinrichs, 2010).



**Figura 6. Representación esquemática de las categorías morfológicas del complejo cumulus-ovocito equino.**

Morfología del ovocito equino; compacto 1 (CP1), se observan pocas capas de células del cumulus (CC) sin espacio entre las mismas con apariencia lisa; compacto 2 (CP2), debido a algunos espacios entre las CC se observa una apariencia granular; expandido 1 (EX1), hay expansión en las capas más externas del cumulus; expandido 2 (EX2), expansión completa con todas las CC separadas por matriz extracelular.

Basado en (Hinrichs and Williams, 1997).

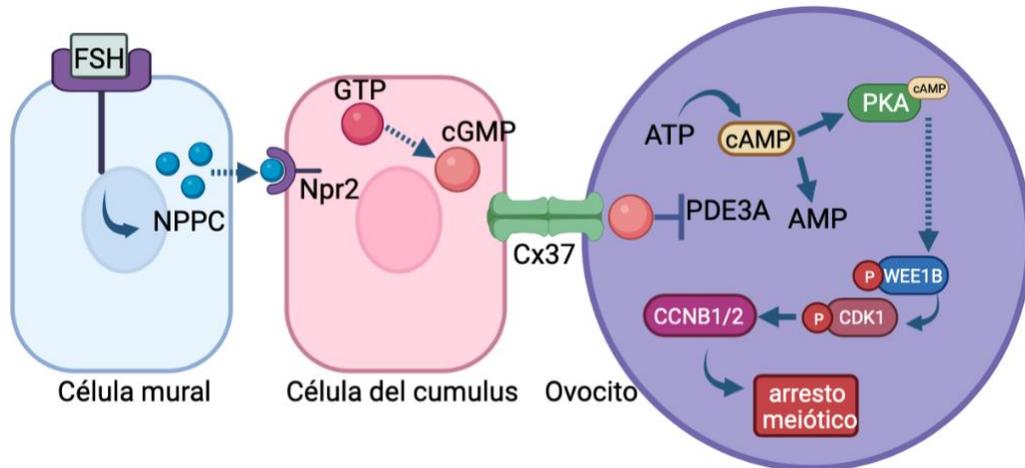
## MADURACIÓN DEL OVOCITO

Durante la maduración, el ovocito adquiere su capacidad de ser fertilizado al alcanzar la maduración nuclear, la cual inicia con la ruptura de la vesícula germinal (GVBD) en la cual se da el reinicio y finalización de la primera división meiótica (con la extrusión del primer cuerpo polar) llegando a la metafase II (MII); incluye también la maduración citoplasmática, en la cual el ovocito presenta cambios en su citoplasma necesarios para la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Eppig *et al.*, 2004). Este proceso se desencadena a partir del pico preovulatorio de LH, la cual se une a sus receptores en las CT y CG murales, lo cual promueve la expresión de proteínas de la familia del factor de crecimiento epidermal (EGF-like), como son AREG (anfiregulina) y EREG (epiregulina) y BTC (betacelulina), los cuales inducen la activación de genes en las CG y CC para iniciar la maduración del ovocito, la expansión de las CC y la ovulación (Richani and Gilchrist, 2018).

### **Control del arresto meiótico**

El ovocito es capaz de reiniciar el proceso meiótico antes de alcanzar el desarrollo celular necesario para dar lugar a una fertilización exitosa, por lo tanto, el COC cuenta con mecanismos de regulación de la meiosis, manteniéndolo en su etapa de vesícula germinal (GV) (Eppig *et al.*, 2004). El ovocito mantiene niveles intracelulares elevados de adenosin monofosfato cíclico (cAMP) a partir de la acción catalítica de la adenil ciclasa (AC) sobre las moléculas de adenosin trifosfato (ATP), la cual es facilitada por acción de la proteína G3 rica en glicina (GP3) (He *et al.*, 2021), el ovocito por sí mismo es capaz de producir las moléculas de cAMP, sin embargo, también las CC envían este mensajero a través de las uniones tipo gap (Sela-Abramovich *et al.*, 2006). Las CG por su parte, cuentan con el sistema péptido natriurético precursor tipo C (NPPC)/receptor del péptido natriurético 2 (NPR2), el cual se encuentra involucrado en el arresto meiótico, el cual induce conversión de guanosin 5' trifosfato (GTP) a guanosin monofosfato cíclico (cGMP), que también es transferido al ovocito mediante las uniones gap (Eppig *et al.*, 2004). A diferencia de cAMP que actúa directamente sobre el arresto meiótico del ovocito, cGMP previene la activación de la fosfodiesterasa (PDE3) en el ovocito inhibiendo la hidrólisis de cAMP, manteniendo sus niveles elevados (Norris *et al.*, 2009). El cAMP a su vez mantiene PKA activo que fosforila a WEE1B e inhibe a la fosfatasa CDC25B, lo que conduce a la inactivación de CDK1. CDK1 en conjunto con la ciclina B1/2 conforman al factor promotor de

la maduración (MPF), por lo que al inactivarse CDK1 se previene la activación de MPF, manteniendo el arresto meiótico (Fig. 7) (He et al., 2021).



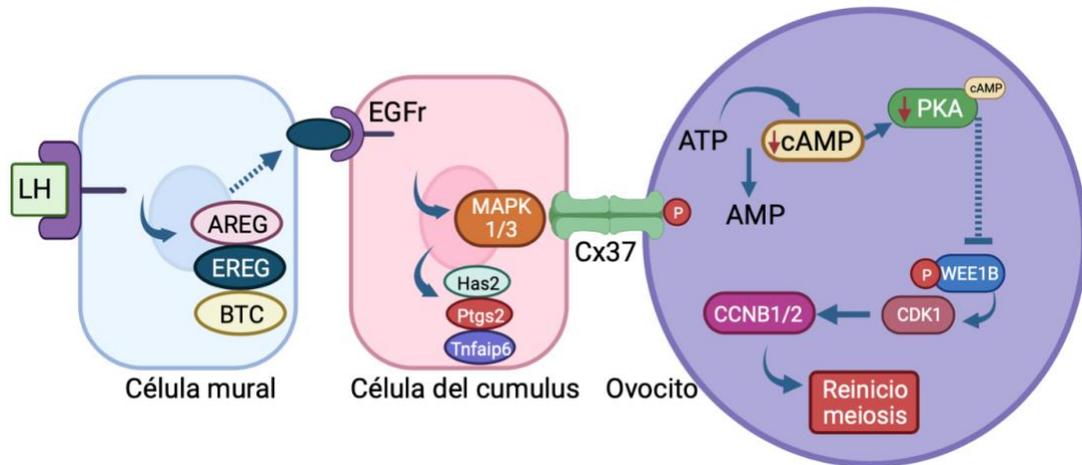
**Figura 7. Mecanismo para el mantenimiento del arresto meiótico en el ovocito.**

Esquema representativo del ovocito en arresto meiótico, donde se representa un alto AMPc que activa a PKA, que a su vez activa WEE1. WEE1 inactiva a CDK1 mediante la fosforilación de Tyr15. Al inactivarse CDK1, la actividad del MPF se encuentra detenida, manteniendo el arresto meiótico.

Basado en (He et al., 2021).

## Reinicio de la meiosis

Cuando se da el pico preovulatorio de LH esta hormona encuentra su receptor (LHR) en la membrana de las CT y las células de la granulosa murales (CGM), a partir de esta señalización se induce la expresión de factores similares al crecimiento epidermal (EGF-like) que al actuar sobre sus receptores en las células del cumulus activan a MAPK1/3, la cual bloquea la comunicación entre el ovocito y las CC, ocasionando una disminución en los niveles de cGMP y por lo tanto de cAMP (Tripathi, Prem Kumar and Chaube, 2010). Asimismo, por la disminución de cAMP se da una baja en los niveles de PKA, consecuentemente no se activa WEEB1, y CDK1 se desfosforila, previniendo la degradación de CCNB1/2. A su vez MAPK1/3 en las células del cumulus estimula la expresión de *Has2*, *Ptx3* y *Tnfaip6* para la producción de ácido hialurónico que activa la expansión de las CC (Fülöp et al., 2003; Ochsner et al., 2003; Ashkenazi et al., 2005) (Fig. 8).



**Figura 8. Factores para la activación de la meiosis.**

Modelo representativo de los mecanismos de reanudación meiótica inducida por LH. El aumento preovulatorio de LH provoca el cierre de las uniones gap en el folículo e impide el paso de cGMP a los ovocitos, esto a su vez aumenta la degradación del cAMP por la PDE3A. Los niveles bajos de cAMP y PKA ya no pueden activar WEE1B e inactivar CDC25B, y CDK1 se vuelve catalíticamente activo, que en conjunto con CCNB1/2 forma al MPF activado, desencadenando el reinicio de la meiosis.

Basado en (He et al., 2021).

## MADURACIÓN *IN VITRO*

Durante la maduración de los ovocitos, estos adquieren su capacidad de ser fertilizados al completar la primera división meiótica por el proceso de maduración nuclear y citoplasmática, liberando su primer cuerpo polar y alcanzando la etapa de metafase II (MII) (Lonergan and Fair, 2016). *In vitro*, la maduración se realiza a partir de ovocitos recuperados de folículos antrales (Chang *et al.*, 2014), que pueden ser obtenidos de ovarios de matadero, especialmente para fines de investigación, o bien de yeguas en pie mediante aspiración intravaginal o por el flanco (K. Hinrichs, 2010). Hasta la fecha, para aumentar la tasa de recuperación de ovocitos, el método más exitoso para la colección en ovarios de yegua es mediante la técnica de curetaje de folículos individuales, algunos laboratorios procesan folículos desde los 3 mm (Katrin Hinrichs, 2010), e inclusive en el caso de un bajo número de ovocitos disponibles por ovario se han visto orillados a utilizar todos los COCs disponibles independientemente de su morfología a la colección. Como se mencionó, en yeguas se pueden obtener ovocitos Ex o Cp, siendo que los ovocitos clasificados como Ex, han demostrado tener tasas más elevadas de maduración en comparación con los Cp (Hinrichs *et al.*, 1993), por lo que la eliminación del criterio de selección morfológico previo a la IVM ha implicado una disminución en el éxito de esta técnica (Katrin Hinrichs, 2010).

La IVM puede realizarse simplemente colocando ovocitos inmaduros en medio de cultivo, sin embargo, la calidad del mismo afecta la tasa de maduración tanto nuclear como citoplasmática, lo cual tiene repercusión directa en la competencia del ovocito después de la fertilización (Hinrichs and Choi, 2005). Se han utilizado diferentes medios para IVM, incluyendo el medio TCM199, EMMI (equine maturation medium), Dulbecco medio modificado Eagle / F12, adicionados con piruvato, antibióticos, sueros, albumina o reemplazos de suero, así como hormonas, siendo la más común FSH (5 mU), bajo condiciones de humedad y 5% CO<sub>2</sub>, y temperaturas de incubación de 37.9 a 38.5°C durante 24 a 36 horas antes de la fertilización (Carnevale, 2016). Actualmente existen medios comerciales para la IVM de ovocitos equinos, suplementados con hormonas gonadotrópicas específicas de especie, gentamicina y libres de suero (IVF Bioscientific).

Como se señaló, los ovocitos Ex y Cp obtenidos de los folículos equinos tienen resultados diferentes durante el proceso de IVM, previamente se ha demostrado que el tiempo óptimo de maduración es de 24 a 30 h para los ovocitos Ex y de 30 a 36 h para los ovocitos Cp, por lo que se ha implementado la programación del inicio de la maduración mediante el uso de medio Holding, en el cual los ovocitos equinos pueden mantenerse durante la noche a temperatura ambiente antes de colocarlos en un cultivo de maduración (Choi et al. 2006).

Posterior a la maduración *in vitro* se debe llevar a cabo la evaluación de los ovocitos para la consecuente fertilización, mientras que en la mayoría de las especies el grado de expansión de las CC puede ser utilizado como un indicador morfológico de la maduración del ovocito (Gordon, 2003), en equinos se requiere la remoción de las CC mediante pipeteo y uso de enzimas como la hialuronidasa para evaluar la presencia del primer cuerpo polar, sin embargo el único indicador de maduración y competencia ovocitaria en esta especie es la fertilización (Conti and Franciosi, 2018).

## FERTILIZACIÓN *IN VITRO*

La fertilización inicia cuando un espermatozoide entra al ovocito, activando la fosfolipasa C iniciando la liberación de los gránulos corticales, el reinicio de la meiosis y la formación de

los pronucleos (Evsikov and De Evsikova 2009). La fertilización *in vitro* se realiza en la mayoría de las especies mediante la técnica de co-cultivo, la cual consiste en incubar ovocitos madurados, *in vitro* o *in vivo*, junto con espermatozoides capacitados, durante la incubación se espera que los espermatozoides lleven a cabo la reacción acrosomal y fertilicen al ovocito para dar lugar a un cigoto. En equinos la IVF es una técnica limitada, siendo hasta hace un par de años únicamente viable mediante la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), la cual consiste en manipular al ovocito previamente madurado e inyectar un espermatozoide directamente en su citoplasma (Reyes-Perea, 2019), si bien es una técnica que se ha reportado funcional en esta especie, para que se lleve a cabo se requiere de personal y equipo altamente especializado, lo que disminuye su uso clínico, además de limitar el entendimiento de la fisiología de la fertilización en esta especie (Katrin Hinrichs, 2022), por lo que diversos investigadores buscan la estandarización de la técnica de IVF mediante co-cultivo en equinos (Bart Leemans, 2016).

La mayor limitante para desarrollar un protocolo de IVF repetible en equinos es el poco conocimiento que se tiene respecto a la capacitación espermática de esta especie (Bart Leemans, 2019). En general se sabe que este proceso consiste en la eliminación de factores decapacitantes de la membrana plasmática, la reorganización lipídica de la membrana y la activación de cascadas intracelulares que permitan la activación de la hipermotilidad (Bart Leemans, 2016). A diferencia de otras especies, al incubar los espermatozoides de equino en condiciones de IVF convencionales como es un medio adicionado con  $\text{HCO}_3$ , calcio y albumina, ninguna de estas características se presenta (Tremóneda et. al, 2003), por lo que se han utilizado protocolos con diferentes compuestos experimentales para inducir la capacitación espermática, como son el ionóforo de calcio A23187, heparina, cafeína, progesterona, procaína entre otros, y ninguno de estos factores parece ser funcional para la capacitación del esperma equino (Palmer et. al, 1991; Bezard et.al, 1992; Choi et. al, 1994, Dell'aquila et. al 1997, Hinrichs et. al, 2002; McPartlin et. al, 2009). Reportándose únicamente el nacimiento de dos potros a partir de la IVF de ovocitos madurados *in vivo* y aspirados vía transvaginal, co-cultivados con semen capacitado con ionoforo de calcio A23187 (Palmer et. al, 1991), sin embargo, desde entonces no se ha logrado replicar el resultado.

*In vivo* en la especie equina, se sabe que la fertilización y formación de pronúcleos en el oviducto ocurre 12 horas después de la inseminación (Enders et. al, 1987), por lo que se ha

propuesto que el esperma equino requiere de un periodo largo para alcanzar la capacitación, en comparación con otras especies. Con base en este razonamiento, se reportó un protocolo funcional para la fertilización por co-cultivo de ovocitos madurados *in vitro*, con el cual se propone la preincubación prolongada del semen para lograr su capacitación utilizando un medio de mantenimiento adicionado con D-penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE) en el cual se concluyó que el semen fresco preincubado por 22 horas en un medio TALP con PHE alcanza la capacitación y es capaz de fertilizar a casi el 100% de los ovocitos a las 3 horas de co-cultivo, logrando desarrollarse hasta blastocistos aptos para su transferencia y dando lugar al nacimiento de 4 potro sanos (Hinrichs, et. al, 2022). Sin embargo, aún no se han reportado replicaciones de este trabajo, además de que no se conoce el efecto que PHE tenga al utilizarse para la co-incubación con semen criopreservado y descongelado.

## CULTIVO DE EMBRIONES *IN VITRO*

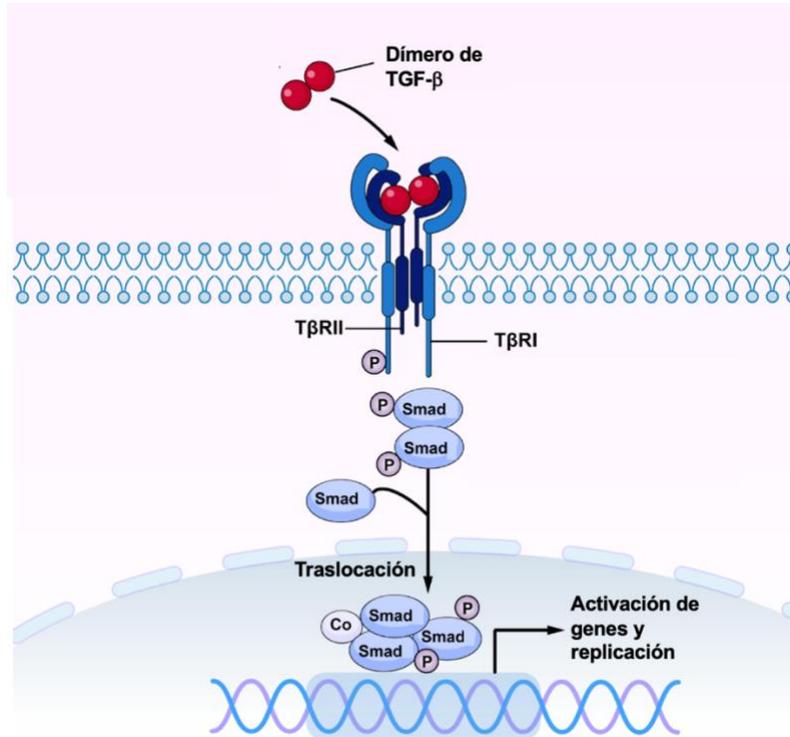
Hasta la fecha, el paso más complicado durante la IVEP es el cultivo exitoso de presuntos cigotos hasta la etapa de blastocisto (K. Hinrichs, 2018). Aunque las modificaciones en los medios y las condiciones de incubación han aumentado las tasas de éxito en protocolos experimentales, sigue siendo común que durante los programas clínicos se obtenga entre el 10 al 20% de embriones del total de ovocitos fertilizados (Morris, 2018). La variabilidad en la fertilidad es un reflejo intrínseco de las diferencias entre razas, sin embargo factores como es la disponibilidad y calidad del semen, o el tiempo de cultivo de embriones, que varía desde los 8 hasta los 12 días, influyen en el éxito obtenido (K. Hinrichs, 2010).

A pesar de que la tendencia es estandarizar los protocolos para disminuir el efecto extrínseco en la producción de embriones, se ha realizado poca investigación sobre los efectos del medio en el desarrollo de embriones *in vitro*. El medio más comunmente utilizado es DMEM/F12 que contiene 17 mM de glucosa, adicionado con 10% de suero fetal bovino, en condiciones de 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 90% N<sub>2</sub>, a 38.2°C, aunque se desconoce el efecto directo de este medio en el desarrollo de los blastocistos (Hinrichs and Choi, 2005).

## SUPERFAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- $\beta$ )

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) es un grupo de al menos 35 proteínas, divididas en las subfamilias de; las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), del factor de crecimiento y diferenciación (GDF), de activinas/inhibinas, del factor neurotrópico derivado de células gliales (GDNF) y de la hormona anti-mülleriana (AMH). Todas siendo similares en estructura pero con diversas funciones ampliamente distribuidas en el cuerpo de mamíferos y que han demostrado ser esenciales en la vida pre y post-natal. Comúnmente para que estas proteínas alcancen su bioactividad deben formar homo o heterodímeros unidos por enlaces covalentes (Knight and Glistler, 2006) y unirse a receptores de superficie tipo Serina/Treonina kinasa tipo I y tipo II (Miyazawa *et al.*, 2002), esta unión desencadena la fosforilación y activación de moléculas llamadas Smads, las cuales se traslocan hacia el núcleo de la célula blanco para modular la expresión de genes a través de la interacción de diversos factores de transcripción (Knight and Glistler, 2006) (Fig. 9).

Diversos estudios en mamíferos han demostrado que los ligandos, receptores y vías de señalización asociados a la superfamilia TGF- $\beta$  se expresan en los ovocitos y en las células ovaricas desde etapas embrionarias; por ejemplo, en las células de la teca se ha reportado que para la transición del folículo primordial a primario se requieren de la participación de BMP4 y BMP7 (Lee *et al.*, 2004), mientras que la AMH es necesaria para el mantenimiento del reservorio de folículos primordiales (McNatty and Sawers, 1975). Además, propiamente el ovocito desempeña un papel importante en la regulación del desarrollo del folículo y modula su microentorno mediante la producción del factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9), y proteína morfogenética ósea 15 (BMP15), por lo que las acciones de estas dos han sido ampliamente estudiadas.



**Figura 9. Vía de señalización canónica de TGF-β a través de SMADs.**

Al activarse el dímero de TGF-β se une a los receptores serina/treonina kinasa tipo II, activando los tipo I que a su vez promueven la vía mediante el complejo de proteínas Smad2/3/4 que se transloca al núcleo para dar la señalización de activación de genes y replicación.

Modificado de (Gu et al., 2020).

## Factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9)

Dentro de las funciones más destacadas de GDF9 en el contexto folicular, se ha comprobado que la ausencia de esta proteína inhibe el progreso del desarrollo folicular más allá de la etapa primaria (Dong et al., 1996; Juengel et al., 2002). Además, investigaciones han demostrado que la exposición in vitro de tejido ovárico de roedores (Hayashi et al., 1999; Nilsson & Skinner 2002, 2003; Wang & Roy 2004) y seres humanos (Hreinsson et al., 2002) a GDF9 estimula la transición del folículo primario a las siguientes etapas de desarrollo. En contraste, se ha observado que en ratones knockout para GDF9 (Dong et al., 1996), en ovejas homocigotas para mutaciones inactivadoras naturales del gen *Gdf9* (Hanrahan et al., 2004), y en ovejas inmunizadas activamente contra GDF9 (Juengel et al., 2002), el avance del folículo más allá de la etapa primaria no ocurre.

Estudios previos realizados por Elvin et al. (2000) y Gilchrist et al. (2006) han demostrado la capacidad de GDF9 para simular ciertas funciones ovocitarias al llevar a cabo cultivos in vitro de células de la granulosa (CG) en ausencia de ovocitos. Entre estas funciones se encuentra la regulación negativa de la síntesis de progesterona, que promueve el crecimiento de las células de la granulosa (B. Gilchrist et al., 2006), así como la regulación positiva de la expansión de las células de la corona radiada (CC) (Dragovic et al., 2005).

Para confirmar estas funciones, se han llevado a cabo investigaciones utilizando ratones knockout para la expresión de GDF9. Los resultados indicaron que la inhibición de esta proteína resulta en la ausencia de folículos terciarios y la falta de desarrollo normal de folículos en etapas posteriores a las primarias. Además, las células de la granulosa no desarrollaron receptores para FSH en estos ratones, lo que llevó a la acumulación de folículos primordiales con degeneración anómala y luteinización espontánea en los ovarios (Sanfins et al., 2018).

### **Proteína morfogenética ósea 15 (BMP15)**

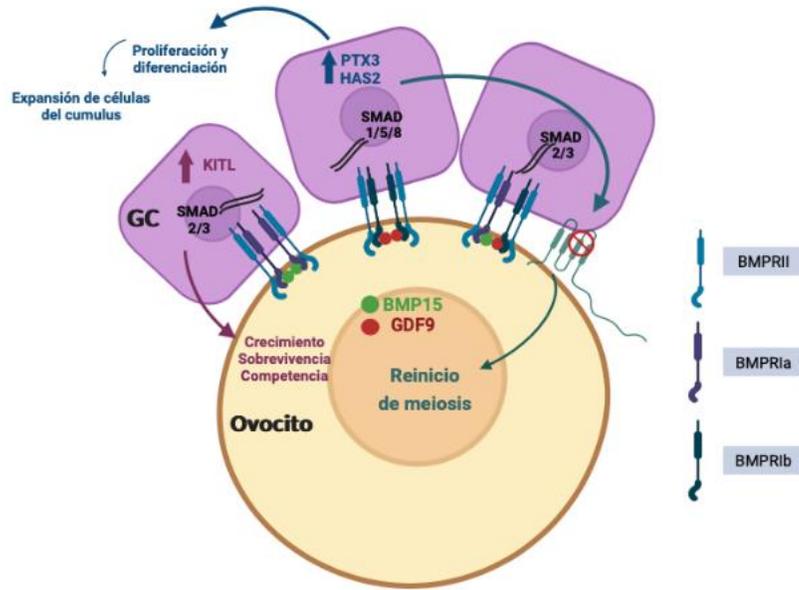
Por otro lado, se ha observado que BMP15 tiene la capacidad de estimular la proliferación de células de la granulosa indiferenciadas antes de su dependencia de FSH, y su ausencia resulta en infertilidad (Otsuka et al., 2000). Además, experimentos in vitro han demostrado que la adición de BMP15 promueve la proliferación y modula la expresión de hormonas esteroides en las células de la granulosa (Otsuka & Shimasaki, 2002). Se ha constatado que la expresión de este factor alcanza su punto máximo durante la expansión de las células de la corona radiada después de la maduración del ovocito (Paulini & Melo, 2011). En un estudio, You-Qiang et al. demostró que la implementación de protocolos de superovulación en ratonas homocigotas recesivas para la expresión de BMP15 resultó en una disminución significativa en el número de ovocitos obtenidos en MII.

Además, las ratonas con mutaciones nulas en el gen *Bmp15* presentan subfertilidad y un fenotipo ovárico debilitado (Yan et al., 2001). Por contraste, las ovejas homocigotas con mutaciones en *Bmp15* son completamente infértiles, y el desarrollo folicular se detiene en la etapa primordial (Juengel et al., 2002; Hanrahan et al., 2004). De manera similar, un estudio realizado por Qing et al. en 2019 reveló que las cerdas knockout para la expresión de BMP15 suprimida

experimentaron alteraciones significativas en la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa. Además, el desarrollo de receptores para FSH se vio afectado, lo que provocó una disminución en la producción de estradiol y una reducción en la calidad y madurez de los ovocitos (Qin et al., 2019). Por otra parte, se han realizado experimentos de inmunización contra GDF9 y BMP15 en bovinos y ovinos, dando como resultado un desarrollo folicular anormal, así como alteración en el ciclo estral y la tasa de ovulación (Paulini and Melo, 2011a).

### **Mecanismo de acción durante la maduración**

Al ser secretados por el ovocito, estos factores actúan mediante receptores transmembranales pertenecientes a la familia de los receptores de proteína morfogenética ósea (BMPR) que se dividen en dos subtipos (De Caestecker, 2004), GDF9 se une al receptor BMPRIa y BMPR2 (Mazerbourg *et al.*, 2004), mientras que BMP15 se une a BMPRIb y BMPRII (Vitt *et al.*, 2002), cuando se unen a estos receptores se forma un dímero en el cual el receptor tipo II activa al tipo I, una vez activados se propaga la señal mediante proteínas SMADs que actúan en el núcleo como factores de transcripción para la expresión de genes específicos como son *Has2*, *Ptgs2*, *Tnfaip6*, *Ptx3* que dan lugar a la expansión del cumulus; mientras que la expresión de *Areg* y *Ereg* da lugar al subsecuente reinicio de la meiosis mediante la activación de la vía MAPK1/3 (Fig.10). Asimismo, se ha reportado que esta vía de señalización inhibe la expresión de *StAR* previniendo la luteinización temprana de las CG (Paulini and Melo, 2011b). Estas funciones demuestran que GDF9 y BMP15 son reguladores clave de la función normal de las CC. Esta comunicación entre el complejo ovocito – células del cumulus (COC) regulada por parte de los OSFs es fundamental para la maduración y competencia de los ovocitos que a su vez influye en el desarrollo embrionario temprano (Ka *et al.*, 1997; Fulka, First and Moor, 1998; Tanghe *et al.*, 2002).



**Figura 10. Funciones de los factores secretados por el ovocito durante la maduración.**

El ovocito produce Factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9) y Proteína morfogenética ósea 15 (BMP15), los cuales encuentran sus receptores BMPRIa, BMPRIb y BMPRII en la membrana de las células de la granulosa (CG), lo que promueve la activación de los complejos Smad1/5/8 y Smad2/3 que se transloca al núcleo de la CG para activar la expresión de genes involucrados con la proliferación y diferenciación de las CC (Has2, Ptx3), así como participar en el reinicio de la meiosis.

### **GDF9 y BMP15 como tratamiento exógeno durante la IVM**

Debido a la relevancia de estos factores, se han utilizado previamente adicionados al medio de maduración en diversas especies. En ratones se reportó que la adición de >100 ng/ml de GDF9 y BMP15 al medio de maduración aumentó significativamente la expansión de las CC, además de que favoreció la glicolisis necesaria para el desarrollo del ovocito y nutrición de las CC (Koji Sugira et. al, 2007). Por otra parte, en ovarios de cerda se utilizaron las proteínas en dosis de 200 ng/ml individualmente o combinadas y aunque no se demostró que afectara el número o viabilidad de las CC, así como tampoco las tasas de maduración, se reportó un aumento en el número de células del trofoectodermo durante el cultivo de embriones previamente madurados con estos factores, demostrando así que se favoreció la calidad embrionaria, lo cual depende directamente de la competencia ovocitaria obtenida durante la maduración (Kim, Kim and Shim, 2016). De igual manera, al ser adicionado en el medio para madurar ovocitos bovinos, Caixeta et. al, reportaron que aumentaba significativamente el porcentaje de COCs expandidos a grado 3, utilizando una dosis de 100 ng/mL de BMP15, dentro de sus resultados también,

reportaron un aumento en la expresión relativa de genes marcadores de maduración y expansión como son *Areg*, *Ereg*, *Ptgs2*, *Ptx2* y *Tnfaip6* (Caixeta *et al.*, 2013a).

### **GDF9 y BMP15 en equinos**

A pesar de que las funciones de los factores GDF9 y BMP15 han sido ampliamente estudiadas en otras especies, en equinos no es el mismo caso, hasta el 2017 se reportó por primera vez la expresión de estos factores en el tejido ovárico de yeguas, siendo esta, mayor en los folículos en la etapa de reclutamiento y crecimiento (Stefaniuk-Szmukier *et. al.*, 2017), sin embargo no se conoce si estos factores actúan de la misma manera y en los mismos procesos como en los previamente descritos en bovinos y murinos. De igual manera, en yeguas se reportó que al inmunizar contra BMP15 se redujo significativamente el número de ovulaciones, además, al inmunizar contra ambos factores el tamaño de los folículos previo a la ovulación se vió disminuido, al igual que en las otras especies, la ciclicidad y el comportamiento estral se reportó alterado (Davis *et al.*, 2018). Considerando los antecedentes es posible que la función de GDF9 y BMP15 sea igualmente relevante en equinos como en otras especies, por lo que se propone añadirlo como tratamiento para la IVM de ovocitos de yeguas para comprender así mejor su función durante la maduración, fertilización y desarrollo embrionario temprano en esta especie.

## JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la población mundial de caballos es mayor a 58 millones, distribuyéndose mayormente en el continente americano (55.2%), siendo México el segundo lugar con más de 6 millones de ejemplares, y con una tendencia a aumentar la población de esta especie para actividades recreativas y deportivas (FAO, 2018), su desempeño en estas actividades es resultado de diversas variables incluyendo genética, salud y temperamento, los ejemplares con características deseables son utilizados para reproducción en combinación con su actividad principal.

Además de su importancia en actividades deportivas, previamente se ha reportado que el caballo doméstico puede ser utilizado como modelo para la optimización de preservación y producción de embriones de especies salvajes de équidos (Smiths et al., 2012), los cuales se encuentran en la lista roja de animales en peligro de extinción, como reportado por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) (Adams et. al, 2009). Considerando la relevancia de esta especie, es necesario ofrecer opciones que aumenten la viabilidad en el uso de las tecnologías reproductivas y así mejorar las tasas de éxito para lograr la preservación genética de los animales de alto valor, así como asegurar un modelo para la implementación en especies en peligro de extinción.

Debido a que los procesos por los cuales los ovocitos de equinos alcanzan la maduración y competencia meiótica aún no se han definido, es importante considerar la función previamente descrita de los OSFs, GDF9 y BMP15, como una alternativa para mejorar la tasa de maduración y definir su participación en el proceso de maduración de ovocitos equinos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la adición de GDF9 y/o BMP15 al medio de maduración *in vitro* mejora las tasas de maduración y fertilización de los ovocitos equinos.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Realizar la maduración *in vitro* de ovocitos equinos con BMP15 y/o GDF9 exógenos.
2. Determinar las tasas de expansión de las células del cumulus siguiendo los criterios previamente descritos (Hinrichs et al., 2005).
3. Determinar las tasas de maduración mediante la evaluación de la distribución de la cromatina utilizando la tinción de Hoechst y microscopio de fluorescencia.
4. Evaluar la expresión relativa de los receptores de los factores secretados por los ovocitos en las células del cumulus después de haber realizado la maduración *in vitro*, mediante la técnica de qPCR.
5. Evaluar la expresión de los marcadores genéticos de maduración y expansión en las células del cumulus después de haber realizado la maduración *in vitro*, mediante la técnica de qPCR.
6. Determinar la tasa de segmentación de los ovocitos fertilizados mediante la técnica de co-cultivo, previamente madurados *in vitro* con BMP15 y/o GDF9 versus el control.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los químicos utilizados durante el proceso de maduración fueron adquiridos de IVF Bioscience (Cornwall, United Kingdom), al menos que se establezca lo contrario.

### RECUPERACIÓN DEL COMPLEJO CUMULUS OVOCITO

Los ovocitos fueron recuperados de ovarios de yeguas de rastro y fueron transportados al laboratorio en un recipiente aislante a temperatura ambiente dentro de las primeras dos horas post-colección. Una vez en el laboratorio, se diseccionó el tejido extraovárico y se lavaron los ovarios tres veces con solución salina (9% NaCl) atemperada a 37°C. Para la obtención de los COCs, los folículos con un diámetro <25mm fueron cortados con una hoja de bisturí y se descartó el líquido folicular, posteriormente la pared folicular fue raspada con una cureta quirúrgica para recuperar las células de la granulosa y el ovocito, los cuales fueron lavados en medio EQ-OPU previamente atemperado a 37°C. Una vez en el medio EQ-OPU se mantuvieron las células hasta su precipitación y posteriormente se realizó la búsqueda y selección de los COCs. Al finalizar la recolección de todos los COCs, fueron lavados tres veces en medio EQ-Wash y finalmente colocados en grupos de 15 en un tubo de borosilicato con 1.25mL de medio Holding y almacenados a temperatura ambiente, lejos de la luz por hasta 16 horas.

### SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GDF9 Y BMP15

Con base en experimentos previamente realizados en bovinos (Caixeta *et al.*, 2013), ratones (Yeo *et al.*, 2008) y porcinos (Kim, Kim and Shim, 2016), se realizaron pruebas utilizando dosis decrecientes de GDF9 y BMP15. Las dosis evaluadas fueron 175 ng/ml, 100 ng/ml y 50 ng/ml, así como una combinación de ambas. La evaluación se centró en el porcentaje de COCs dañados después de la incubación.

Los resultados indicaron que el grupo con dosis de 175 ng/ml y 100 ng/ml mostró un promedio del 40% de degradación en los COCs incubados. En contraste, el grupo con 50 ng/ml presentó solo un 10% de degradación. Por consiguiente, se decidió seleccionar la dosis de 50 ng/ml como la más adecuada para la continuación de este trabajo.

## MADURACIÓN IN VITRO

El medio de maduración (medio EQ-IVM) se colocó en platos de cuatro pozos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en 500  $\mu$ L adicionado con 50ng de GDF9 y/o BMP15 (Cuadro 1). Y se atemperó a 38.2°C y 6%CO<sub>2</sub> durante dos horas previo a la incubación de los ovocitos.

**Cuadro 1. Grupos experimentales**

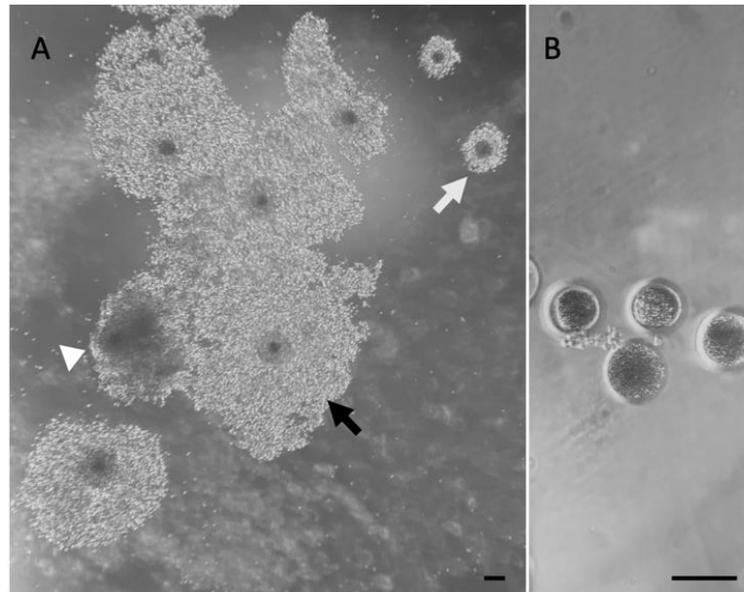
<b>Grupo control</b>	Sin factores exógenos	
<b>Grupos experimentales</b>	GDF9	50 ng/ml
	BMP15	50 ng/ml
	GDF9 y BMP-5	50 ng/ml + 50 ng/ml

Para realizar la IVM de los ovocitos, estos fueron lavados una vez en medio EQ-IVM antes de ser colocados en el medio experimental, la maduración se realizó en grupos de 10 COCs durante 36 horas a 38.2°C y 6% CO<sub>2</sub>.

## EVALUACIÓN DE LA MADURACIÓN

### **Expansión de las células del cumulus**

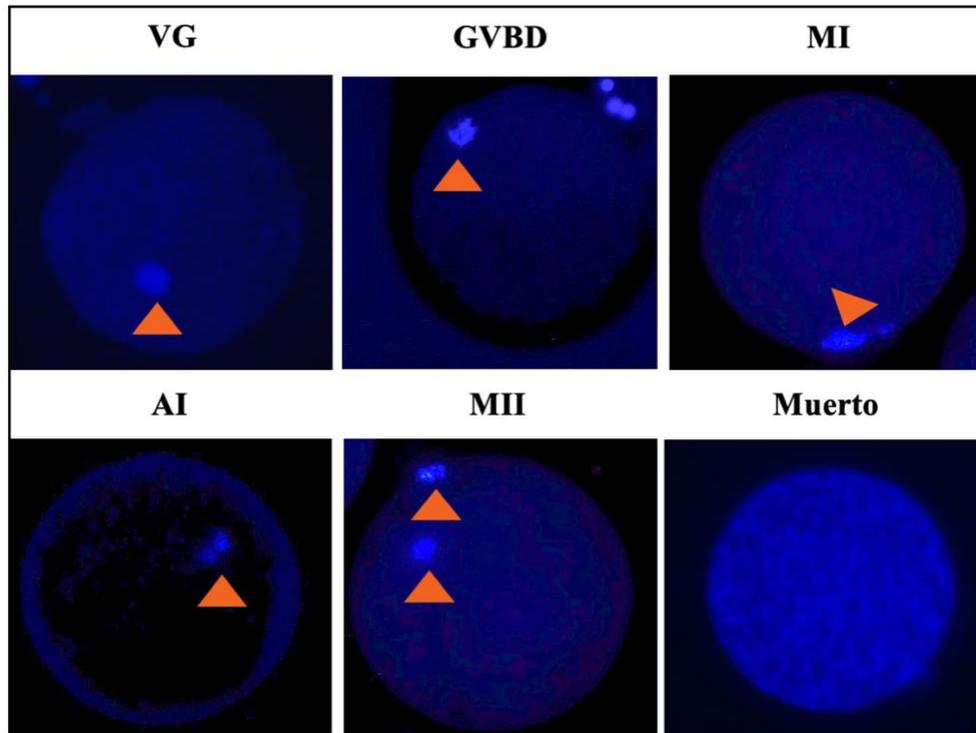
Después de la IVM, los COCs fueron evaluados y clasificados con base en el número de capas de CC: expandidos 1 (CC compactas y completas con bordes lisos), expandidos 2 (2-5 capas de CC con bordes granulares), expandidos 3 (más de 5 capas de CC expandidas con bordes granulares), o desnudos (Hinrichs *et al.*, 2005) (Fig. 11).



**Figura 11. Imágenes representativas del grado de expansión de los COC después del cultivo.**  
 (A) grados de expansión, grado 1, flecha blanca; grado 2, triángulo blanco; grado 3, flecha negra. (B) ovocitos desnudos y/o degradados después del cultivo.  
 Barras: 145 um.

### **Configuración de la cromatina**

Los COCs fueron desnudados utilizando una pipeta RI EZ-Grip adaptada a una punta de diámetro 145nm Vial RI EZ-Tip (CooperSurgical Fertility, Balleruck, Demarc) con medio EQ-Wash adicionado con hialuronidasa de testículos bovinos tipo I-S (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Los ovocitos desnudos fueron fijados con una solución de formaldehído tamponado 2% durante 24h a 4°C. Posteriormente fueron teñidos con Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) al 5% en PBS y montados en portaobjetos utilizando medio Perma Fluor Aqueous Mounting Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Posteriormente se utilizó el microscopio de fluorescencia Axio Observer.Z1 (Zeiss), con una excitación de 400-nm dada por el ZenSoftware Pro 2012. Se observó la disposición cromosómica y el cuerpo polar. Se clasificó la configuración de cromatina de los ovocitos como vesícula germinal (GV), ruptura de la vesícula germinal (GVBD), metafase I (MI), anafase I (AI) metafase II (MII), o muerto (Águila *et al.*, 2017) (Fig. 12).



**Figura 12. Imágenes representativas de la configuración de la cromatina después de la IVM y tinción con Hoechst 33342.**

Se muestran fotografías evaluadas con microscopía de fluorescencia, dónde observa la cromatina en estados de vesícula germinal (VG), con la cromatina compacta; ruptura de vesícula germinal (GVBD), metafase I (MI), anafase I (AI), metafase II (MII) y muerto sin cromatina.

## FERTILIZACIÓN POR CO-CULTIVO

### Preparación del semen

Se descongeló el semen a 37°C durante 60 segundos, se tomó una gota para su evaluación en AndroScope® (Minitube, Ontario, CA) y se utilizó G-MOPS (Vitrolife) como medio para separación del semen por la técnica de swim up, en el cual se dejó incubar a 37°C durante 20 minutos a 45° de inclinación, posteriormente el sobrenadante se centrifugo a 2,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente (22°C), el pellet se reconstituyo en medio HBSS con calcio y magnesio (Thermo Fisher Scientific) adicionado con 4.7mg/mL de BSA (Sigma-Aldrich).

Una vez lavado el semen se diluyó 1µl del semen en 24 µl de agua y se utilizaron 10µl de esta dilución para contabilizar el semen en la cámara de Neubauer, después del conteo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\# sp \times 5 \times 25 \times 10,000 \times \% \text{ de motilidad} = \#sp/mL$$

Dónde:

- # sp: es el promedio de espermatozoides contados en cada extremo de la cámara de Neubauer.
- 5: factor de multiplicación por el número de cuadrantes de la cámara.
- 25: factor de dilución (1:25)
- 10,000: constante de profundidad de la cámara de Neubauer.

Se calculó el volumen necesario para obtener 100,000 espermatozoides viables por gota de fertilización de 50µl, el volumen obtenido se diluyó en medio IVF para obtener la dosis deseada, la cual se agregó al medio de fertilización IVF-PHE (descrito en preincubación y co-cultivo).

### **Preincubación y co-cultivo**

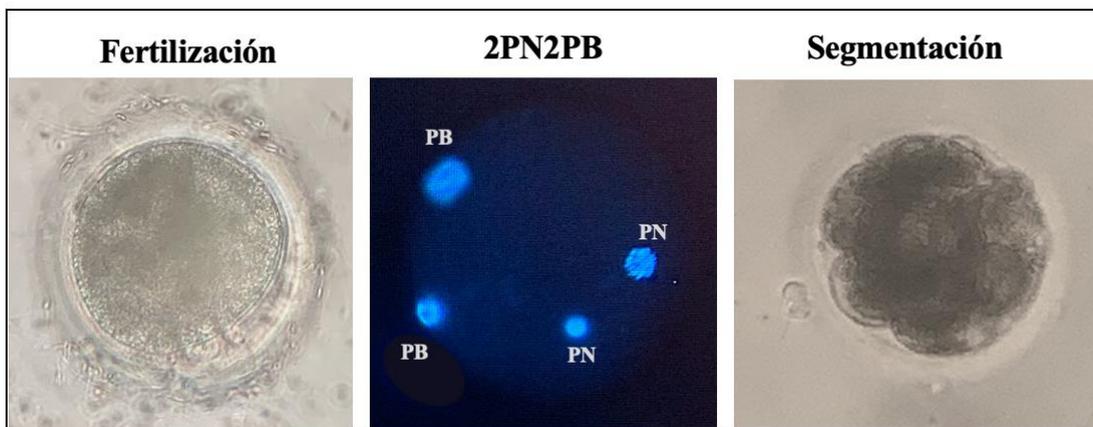
Se preparó PHE con una concentración de 9µM de hipotaurina, 18µM de penicilamina y 1.8µM epinefrina, de la solución se utilizó 40µl/mL de medio EQ-IVF y se colocaron 4 gotas de 50µl por caja de petri de 30mm cubiertas en aceite mineral. Los platos se dejaron equilibrar al menos 6 horas antes de la colocación del semen a 38.5°C y 5%CO<sub>2</sub>. Posteriormente se adicionó el volumen necesario para obtener 100,000 espermatozoides viables por gota y se dejó preincubar de 0 a 6 horas, de acuerdo con la réplica experimental, antes de agregar máximo 3 COC por gota de fertilización y se dejaron en co-cultivo de 1 a 3 horas de acuerdo con el grupo experimental.

### **Cultivo de embriones (IVC)**

Se utilizó la solución EQ-IVC para hacer 5 gotas de 50µl por caja de petri, cubiertas en aceite mineral y se dejaron equilibrar a 38.5°C y 5%CO<sub>2</sub> durante al menos 6 horas. Posterior al tiempo de co-cultivo los ovocitos se lavaron de detritos celulares, espermatozoides y exceso de células del cumulus con una pipeta RI EZ-Grip adaptada a una punta de diámetro 145nm Vial RI EZ-Tip (CooperSurgical Fertility, Balleruck, Demarc) y se colocaron en las gotas de IVC, donde primero se lavaron dos veces y posteriormente se colocaron en grupos de 2 a 3 por gota durante 24 horas. A las 24 a 36 horas se realizó un recambio de 20µl de medio de una gota no utilizada en la misma caja de petri y se dejaron 24 horas más para su evaluación.

## Evaluación de fertilización

Al terminar el tiempo de co-cultivo se evaluó la tasa de segmentación por morfolofología mediante el microscopio estereoscópico. Posteriormente los cigotos fueron fijados con una solución de formaldehído tamponado 2% durante 24h a temperatura ambiente y teñidos con Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) al 5% en PBS y montados en portaobjetos utilizando medio Perma Fluor Aqueous Mounting Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Posteriormente se utilizó el microscopio de fluorescencia Axio Observer.Z1 (Zeiss), con una excitación de 400-nm dada por el ZenSoftware Pro-2012. Se observó la disposición de la cromatina, así como la presencia de los cuerpos polares. Se clasificó la configuración como MII (metafase II), 2PN (presencia de ambos pronúcleos), 2PN+2PB (presencia de ambos pronúcleos y de ambos cuerpos polares), degradado (cromatina desordenada o falta de ella) (Adaptado de Hinrichs et. al, 2022) (Figura 13).



**Figura 13. Imágenes representativas de la evaluación de la fertilización post cultivo de embriones.**

Fertilización; se observa la presencia de un ovocito con extrusión del PB1, así como la presencia de espermatozoides alrededor de la ZP; 2PN2PB, imagen representativa de la presencia de ambos pronúcleos y ambos cuerpos polares: indicativo de fertilización; Segmentación, se observa citoplasma dividido en blastómeros a los 3 días post-IVF.

# EVALUACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN LAS CÉLULAS DEL CUMULUS

## Extracción de RNA

El RNA fue aislado de las células del cumulus utilizando Arcturus PicoPure RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo las instrucciones del laboratorio. Durante el cual se utilizó solución de extracción en el cual se dejaron las células a -80°C durante la noche para posteriormente realizar la extracción por columnas, dónde se añadió a la muestra etanol al 70% y se centrifugó a 16,000 rcf durante 30 segundos, posteriormente se utilizaron dos soluciones de lavado con las cuales se centrifugó a 8,000 rcf por un minuto. Finalmente la muestra se transfirió a un tubo de colección en 20 ul de solución de elución. Todas las soluciones, así como tubos y columnas fueron parte del kit comercial.

## RT-qPCR

Se realizó RT-PCR utilizando 200ng de RNA total y el kit SuperScript VILO cDNA Synthesis. Se realizó qPCR en un volumen total de 15µL con 1µL de cDNA y 2x Power SYBR Green PCR Master Mix on a CFX-96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Ltd., Hercules, CA, USA). Los parámetros del termociclador para la amplificación fueron 3 min a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 59°C, y 30 a 72°C.

**Cuadro 2. Lista de primers utilizados para qPCR**

Nombre	Forward	Reverse	Accession	Referencia
<i>BMPRI1B</i>	AAGGCAAGAAGCAGGAGGTTT	TATCAAGGAAGTTTGCCCTCGT	XM_023637705.1	Diseñado
<i>BMPRI1A</i>	CAAAACAAAAACCTTTGCTTCCTGA	ACCATCAGTCATCCATTTGTGC	XM_023648657.1	Diseñado
<i>BMPRI2</i>	AGCCAACACAGTGGCACATA	TCAGTCGAGTGTCTCACCA	XM_023622414.1	Diseñado
<i>AREG</i>	TCCTCGGCTCAGCCCATTAT	ACAGGGGAGATCTCACTTCCTGA		Contreras (2021)
<i>EREG</i>	ACAATCCACGTGTGGCTCAA	AACCCACTTCACACCTGCAA		Contreras (2021)
<i>PTGS2</i>	CCCCCAGGGCACAAATATGA	TGACTTAAATCCACCCCGTGAC		Contreras (2021)
<i>HAS2</i>	CACAGACAGGCTGAGGACAA	ACAGGCTTTGGATGATGATGAGG		Pawlak (2012)

<i>PTX3</i>	TGCCCGCAGGTTGTGAA	AGACTCAAGCCTCAGTGGTC	XM_023623202.1	Diseñado
<i>TNFAIP6</i>	CCATGGCTTTGTGGGAAGATAC	TTGGAAACCTCCTGCGGTC	NM_001081906.1	Diseñado
<i>GAPDH</i>	TGATTCCACCCATGGCAAGT	CATCGCCCCATTTGATGTTG		Contreras (2021)
<i>Actin B</i>	CCAGCACGATGAAGATCAAG	GTGGACAATGAGGCCAGAAT		Bogaert (2006)

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables respuesta que se evaluaron fueron:

- Porcentaje de ovocitos en cada grado de maduración (Exp 1-3) con cada uno de los tratamientos (control, 50 ng/ml GDF9, 50 ng/ml BMP15 y un mix de ambos).
- Porcentaje de ovocitos en etapa de GV, GVBD, MI, AI, MII o degradados con cada uno de los tratamientos (control, 50 ng/ml GDF9, 50 ng/ml BMP15 y un mix de ambos).

Los valores porcentuales fueron transformados a su valor arcoseno para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y un análisis de comparaciones múltiples DMSH (Tukey-Kramer).

- Expresión relativa de los genes de interés en comparación con los housekeepings en el grupo control y el grupo de 50ng/ml BMP15.

Los valores fueron transformados a su valor logarítmico base 10 para para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y un T de student para comparar ambos grupos.

Consulte ANEXOS para diseño experimental.

## RESULTADOS

### EFFECTO DE GDF9 Y BMP15 EN LA EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CUMULUS

Se evaluó el efecto de los tratamientos en la expansión de las células del cumulus de acuerdo a las clasificaciones grado 1 a 3 o desnudo, siendo el grado 3 el mayor nivel de expansión (Hinrichs, 2005). No se encontraron diferencias significativas entre grado 1, 2 y desnudo ( $P>0.05$ ), sin embargo, para el grado de expansión 3, se encontró un aumento estadísticamente significativo en los COCs madurados con BMP15, en comparación con el Control, GDF9 y el MIX ( $P<0.05$ ) (Cuadro 3).

*Cuadro 3. Porcentajes promedio del grado de expansión de las CC (+/- error estándar)*

Tratamiento	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Desnudo
Control	35.75 (+/- 3.7)	23.00 (+/- 8.5)	34.00 (+/- 3.1) <sup>a</sup>	7.25 (+/- 7)
GDF9	45.00 (+/- 5)	25.75 (+/- 3.4)	27.5 (+/- 2.5) <sup>a</sup>	5.00 (+/- 2.8)
BMP15	33.25 (+/- 2.4)	18.25 (+/- 6.8)	46.00 (+/- 4.8) <sup>b</sup>	5.00 (+/- 2.8)
MIX	48.25 (+/- 6.8)	25.00 (+/- 9.6)	20.75 (+/- 5.4) <sup>a</sup>	6.50 (+/- 6.5)

(Grado 1, 2, 3 y desnudo) en cada grupo experimental (Control, GDF9 (50 ng/ml), BMP15 (50 ng/ml) o MIX (50 ng BMP15 + 50 ng GDF9/ml), diferentes superíndices muestran diferencias estadísticas entre el grupo ( $P<0.05$ ).

### EFFECTO DE GDF9 Y BMP15 EN LA CONFIGURACIÓN DE LA CROMATINA

Como la expansión de las células del cúmulo no es un indicador de la maduración de los ovocitos en el caballo, se decidió evaluar la maduración nuclear mediante tinción de cromatina. Al comparar la distribución de la cromatina entre los grupos experimentales, se observaron diferencias significativas en el grupo de ovocitos adicionados con BMP15, con un aumento significativo en el porcentaje de ovocitos que alcanzaron la MII, indicativo de maduración

( $P < 0.005$ ) (Cuadro 4). Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticas en el resto de los grupos ( $P > 0.05$ ). Imágenes representativas de diferentes configuraciones de cromatina se muestran en la Figura 12.

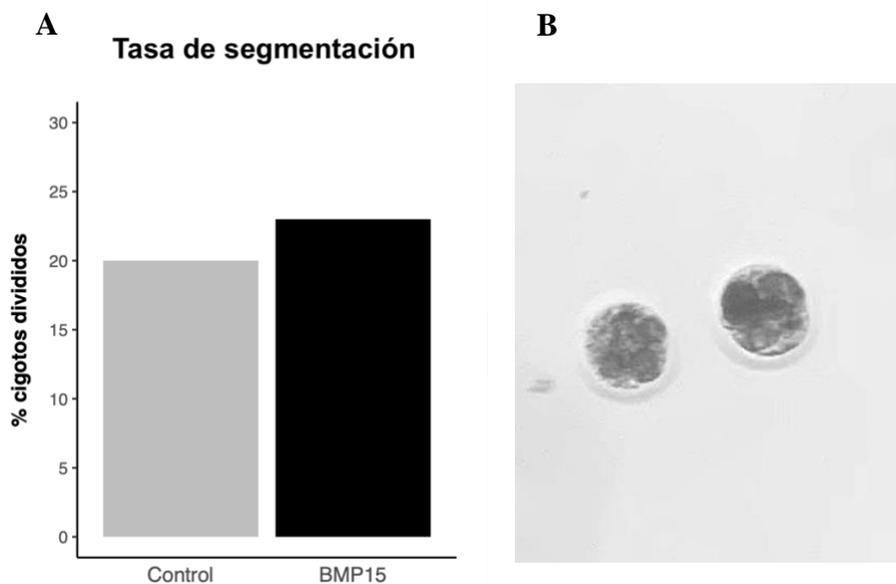
**Cuadro 4. Porcentajes promedio en cada clasificación de configuración de cromatina (+/- error estándar)**

Tratamiento	GV	GVBD	MI	AI	MII	Degradado
<b>Control</b>	0 (+/-0)	13.505 (+/-7.8)	6.25 (+/-6.34)	28.77 (+/-11.73)	3.25 (+/-3.24)	42.25 (+/- 12.7)
<b>GDF9</b>	7.25 (7.24)	12.5 (+/-5.14)	12.25 (+/-8.9)	15 (+/-5.6)	3.25 (+/-3.24)	37 (+/-14.34)
<b>BMP15</b>	5.5 (+/-5.5)	27 (+/-19.6)	2.78 (+/-2.7)	15 (+/-2.79)	36.25 (+/-6.5) **	12.75 (+/- 7.5)
<b>MIX</b>	3.25 (+/-3.2)	2.5 (+/-2.5)	23.25 (+/-9.15)	27.5 (+/-11.08)	5 (+/- 5)	23.25 (+/-10.8)

GV (vesícula germinal); GVBD (ruptura de vesícula germinal); MI (metafase I); AI (anafase I), MII (metafase II) y degradados en cada grupo experimental (Control, GDF9 (50 ng/ml), BMP15 (50 ng/ml), o MIX (50 ng BMP15 + 50 ng GDF9/ml), \*\* muestra diferencias estadísticas ( $p < 0.005$ ).

## EFEECTO DE BMP15 EN LA TASA DE SEGMENTACIÓN

Se evaluó la segmentación el día 3 después de la fertilización por co-cultivo, no se encontraron diferencias entre el grupo control contra el grupo de BMP15 de 50 ng/mL con tasas del 20 % y 23 %, respectivamente (Fig. 14).



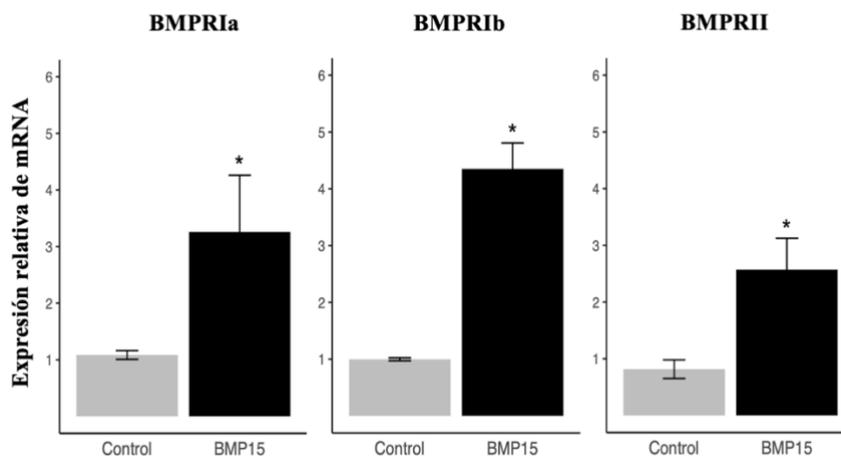
**Figura 14. Efecto de BMP15 en la tasa de segmentación**

A) Tabla de porcentaje de segmentación post fertilización de ovocitos madurados en un medio control contra BMP15. B) Imagen representativa de segmentación a las 72 horas.

## EFEECTO DE BMP15 EN LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES BMP

Con base en los hallazgos anteriores, se sugirió que BMP15 inducía la maduración de los ovocitos. Para obtener una visión molecular de este efecto, se realizaron las comparaciones específicamente del grupo de tratamiento con BMP15 contra el control.

Se evaluó la expresión relativa de los receptores *BMPRIa*, *BMPRIb* y *BMPRII*. Se encontró un aumento significativo en la expresión de los tres receptores de BMP en el grupo BMP15 en comparación con el control ( $P < 0.05$ ) (Fig. 15).

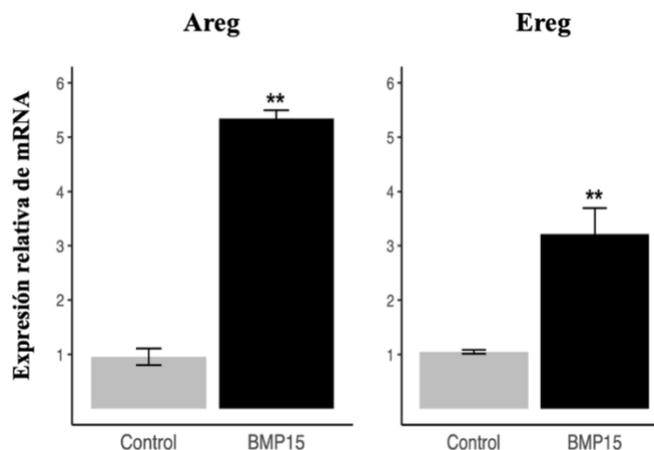


**Figura 15. Expresión relativa de *BMPRIa*, *BMPRIb* y *BMPRII*.**

Comparación en la expresión relativa de ARNm de *BMPRIa*, *BMPRIb* y *BMPRII* en las células del cúmulo después de IVM en un medio de control contra BMP15 (50 ng/ml). \* es indicativa de significación estadística ( $P < 0.05$ ).

## EFEECTO DE BMP15 EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES MOLECULARES DEL REINICIO DE LA MEIOSIS

Se evaluó la expresión relativa de *Areg* (anfirregulina) y *Ereg* (epirregulina), que son marcadores de reanudación de la meiosis, se observaron aumentos estadísticamente significativos de ambos genes en el grupo adicionado con 50 ng/ml en comparación con el control ( $P < 0.005$ ) (Fig.16).

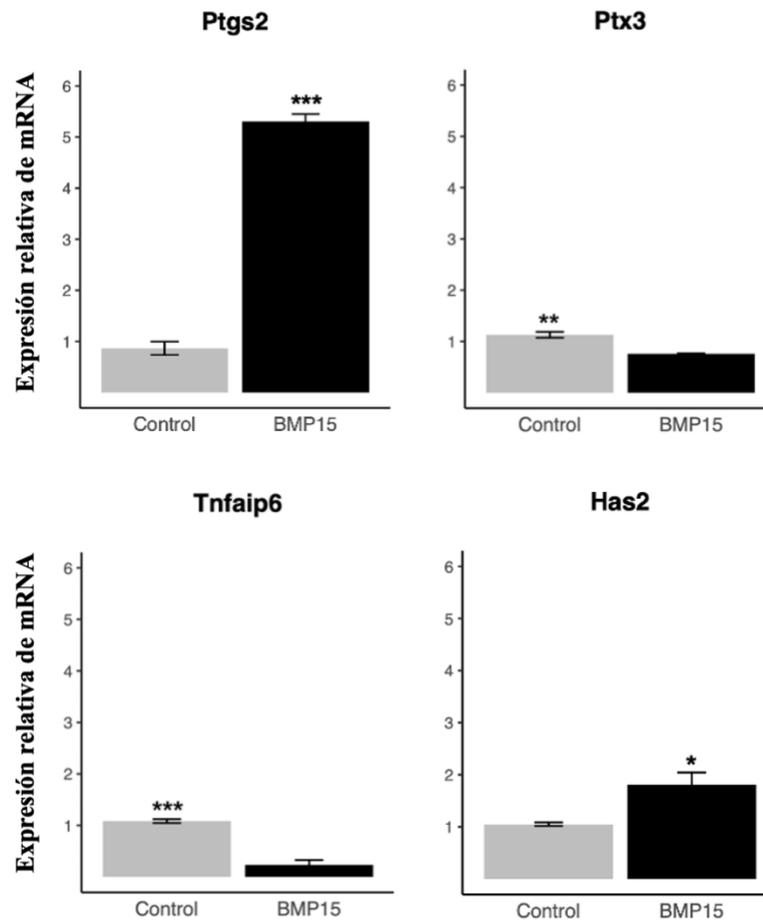


**Figura 16. Expresión relativa de *Areg* y *Ereg*.**

Comparación en la expresión relativa de ARNm de *Areg* y *Ereg* en las células del cúmulo después de IVM en un medio de control contra BMP15 (50 ng/ml).\*\* es indicativa de significación estadística ( $P < 0.005$ ).

## EFFECTO DE BMP15 EXPRESIÓN DE MARCADORES MOLECULARES DE LA EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CUMULUS

Para evaluar el efecto de BMP15 en la expansión de las células del cumulus (CC), examinamos los genes involucrados en la síntesis de ácido hialurónico (HA) (*Has2* y *Ptgs2*) y en la organización de la matriz extracelular (*Ptx3* y *Tnfaip6*). La expresión relativa de mRNA de *Ptgs2* y *Has2* fueron significativamente más altos en el grupo BMP15 ( $P < 0.001$  y  $P < 0.05$ , respectivamente). Sin embargo, para *Tnfaip6* y *Ptx3*, el grupo control mostró expresiones relativas significativamente más altas ( $P < 0.001$  y  $P < 0.005$ , respectivamente) (Fig. 17).



**Figura 17. Expresión relativa de *Ptgs2*, *Ptx3*, *Tnfaip6* y *Has2*.**

Comparación en la expresión relativa de mRNA de *Ptgs2*, *Ptx3*, *Tnfaip6* y *Has2* del cúmulo después de IVM en un medio de control contra BMP15 (50 ng/ml). Se encuentran diferencias significativas en diferentes niveles: \* ( $P < 0.05$ ); \*\* ( $P < 0.005$ ), \*\*\* ( $P < 0.001$ ).

## DISCUSIÓN

Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que GDF9 y BMP15 se utilizan como tratamiento exógeno para la maduración de ovocitos equinos. Estudios previos han demostrado que cuando se añaden de manera exógena, estos factores promueven la expansión de las células del cumulus en ratones (Koji Sugira et al., 2007) y en COCs bovinos (Caixeta et al., 2013). En ambas especies, este efecto de expansión se asoció directamente con la maduración nuclear del ovocito. En esta investigación, se encontraron diferencias significativas en el grado de expansión de las células del cumulus al añadir BMP15, en comparación con el grupo de control, GDF9 y MIX (Cuadro 3), lo cual sugiere que este factor en el COC equino podría presentar funciones similares durante la expansión del CC, como aquellas descritas en otras especies, no obstante, en caballos, a diferencia de otras especies, la expansión de las CC no es un marcador específico de la maduración (Hinrichs, 2010), lo cual es apoyado por los resultados obtenidos en esta investigación (ver Cuadro 3 y Cuadro 4), sin embargo se requieren otras evaluaciones para complementar el efecto de los tratamientos.

La evaluación de distribución de la cromatina como indicador de la maduración mostro que la adición de 50 ng/ml de BMP15 al medio de maduración aumentó significativamente el porcentaje de ovocitos que alcanzaron la metafase II (MII) ( $36.25 \pm 6.5$ ), en comparación con los demás grupos (control, GDF9 y MIX) (Cuadro 4). Esto sugiere que BMP15 promueve la maduración nuclear en ovocitos equinos. Investigaciones previas en ovejas (Rouhollahi, 2013) y bovinos (Gilchrist, 2006) han reportado que tanto GDF9 como BMP15, ya sea individualmente o en combinación, promueven significativamente la maduración nuclear del ovocito. Sin embargo, en esta investigación, los hallazgos indican que el efecto de maduración solo es evidente cuando los COCs son tratados con BMP15. Los resultados obtenidos en este estudio podrían atribuirse a la falta de conocimiento sobre la proporción fisiológica de expresión de GDF9 y BMP15 en el folículo de la especie estudiada. Crawford y McNatty en 2012 informaron que cada especie presenta una proporción específica, siendo GDF9 significativamente menor en especies mono-ovulatorias. Por lo tanto, es posible que los equinos al ser una especie mono-ovulatorias podrían tener dicho comportamiento. Por lo que futuras investigaciones deben ser enfocadas a delucidar este aspecto.

Después de que los ovocitos fueron sometidos a maduración, aquellos tratados con BMP15 y el medio de control fueron sometidos a fertilización mediante el método de co-cultivo. Los ovocitos fertilizados fueron luego cultivados durante 72 horas hasta la evaluación de la segmentación. Curiosamente, el porcentaje de cigotos divididos no varió entre los grupos. Investigaciones anteriores realizadas en cerdos (Ju Kim, 2016) han informado que no hay diferencias significativas en las tasas de maduración y división cuando se agrega GDF9 o BMP15, en comparación con el grupo de control, sin embargo, el estudio encontró diferencias estadísticas en el número total de células en la etapa de blastocisto. Esto sugiere que se necesita más investigación para determinar si BMP15 puede tener un efecto positivo en etapas posteriores del desarrollo embrionario.

Investigaciones previas han establecido que la expresión de los receptores BMPR está directamente influenciada por la presencia de factores TGF, y se requiere regulación positiva para mejorar su señalización en diversas actividades biológicas en las células (Miyazono, 2000). Durante esta investigación, se recopilaron CC para evaluar la expresión de los receptores TGF- $\beta$ . Se observó un aumento significativo en la expresión de *BMPR1a*, *BMPR1b* y *BMPR2* en el grupo tratado con BMP15 en comparación con el grupo de control (Figura 15). Estos resultados pueden sugerir que en el ovocito equino este comportamiento es consistente con lo descrito anteriormente.

En línea con los hallazgos sobre la expresión de los BMPR, en esta investigación se observó un aumento significativo en la expresión de *Areg*, *Ereg*, *Ptgs2* y *Has2* en las células de la corona radiada del grupo tratado con BMP15 en comparación con el grupo de control (Figura 16 y 17). Esta sobre regulación de *Areg* y *Ereg* sugiere que BMP15 puede activar la expresión de receptores para factores de crecimiento epidérmico (EGF-like) durante la cascada de maduración del ovocito. Se ha descrito actividad similar en respuesta a BMP15 en cerdos y ratones (Cilchrist et al., 2014; Eppig, You-Qiang y Koji, 2008). Además, la elevada expresión de *Ptgs2* y *Has2*, genes esenciales para la expansión de las células del cumulus, coincide con informes anteriores en humanos, ratones y bovinos cuando se agregó BMP15 al medio de maduración (Jia Peng, 2013; Rouhollahi et al., 2013; Caixeta et al., 2013), sin embargo la expresión relativa de *Ptx3* y *Tnfaip6*, esenciales para la organización de la matriz extracelular, fue significativamente mayor en el grupo control, por lo que aún hace falta delucidar el efecto de

la expresión de estos genes en el COC equino, ya que se contrapone con el resto de los hallazgos. Sin embargo, los resultados son consistentes con la idea de que BMP15 desempeña un papel crucial en la regulación de genes clave involucrados en la función de las células de la corona radiada y la maduración del ovocito en diferentes especies, incluido el equino (Jia Peng, 2013; Rouhollahi et al., 2013; Caixeta et al., 2013).

Basándonos en los resultados obtenidos, se sugiere que el efecto de BMP15 en el complejo cumulus-ovocito equino es comparable a lo que se ha descrito previamente en otras especies. Sin embargo, todavía hay muchos aspectos que requieren más investigación, como el impacto de BMP15 en el desarrollo de embrioblastos, que cómo se ha reportado previamente en porcinos, aumenta significativamente el número de células totales en el blastocisto (Yeo et al., 2008; Kim, Kim and Shim, 2016), mientras que en bovinos mejora el porcentaje de blastocistos obtenidos (Hussein *et al.*, 2011). Además, se requiere más investigación para saber si al igual que en ratones (Dragovic *et al.*, 2005), humanos (Moore, Otsuka and Shimasaki, 2003), y ovinos (Christoforou and Efthimia, 2017), la BMP15 actúa mediante la vía canónica a través de SMADS para promover la maduración del COC equino, o bien si utilizan sinérgicamente alguna vía no canónica como p38-MAPK, la cual se ha visto activada en ovinos, o ERK-MAPK como previamente reportado en ratones (Mottershead, Ritter and Gilchrist, 2012; Reader *et al.*, 2016).

## CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos a través de los protocolos de IVM e IVF utilizados en el presente trabajo, se determina que la adición de BMP15 en dosis de 50 ng/ml al medio de maduración de ovocitos equinos favorece la maduración meiótica, así como demuestra tener un efecto positivo en la expresión del mRNA de los receptores *Bmpr1a*, *Bmpr1b* y *Bmpr2*. Además de favorecer la expresión del mRNA de marcadores moleculares del reinicio de meiosis como son *Areg* y *Ereg* (parte de la vía MAPK1/3 para la maduración ovocitaria).

De igual manera se concluye que BMP15 aumento la expresión de *Ptgs2* y *Has2*, los cuales han sido previamente descritos como marcadores de proliferación de las células del cumulus. Asimismo, se concluye que BMP15 y el medio control funcionan de manera similar durante la fertilización y segmentación, sin embargo, es pertinente estudiar más a fondo el efecto que este factor pudiera tener en la viabilidad en etapas más avanzadas del desarrollo embrionario.

Por otra parte se concluye que la adición de GDF9 en la misma dosis, así como el tratamiento aditivo de ambos factores (GDF9 + BMP15), no demostró tener efecto sobre la maduración ovocitaria, sin embargo aún es necesario delucidar la función que GDF9 tenga en el complejo cumulus-ovocito de esta especie.

## ANEXOS

### DISEÑO EXPERIMENTAL

En el presente estudio se midieron las siguientes variables de respuesta en cada grupo por medio de un análisis de varianza (ANOVA):

#### **Tasa de expansión con efecto de tratamiento:**

- Control: Porcentaje de ovocitos que alcanzaron el grado de expansión 1, 2, 3 o desnudo a las 36 horas de maduración sin aditivos.
- GDF9: Porcentaje de ovocitos que alcanzaron el grado de expansión 1, 2, 3 o desnudo a las 36 horas de maduración utilizando 50 ng/mL de GDF9.
- BMP15: Porcentaje de ovocitos que alcanzaron el grado de expansión 1, 2, 3 o desnudo a las 36 horas de maduración utilizando 50 ng/mL de BMP15.
- MIX: Porcentaje de ovocitos que alcanzaron el grado de expansión 1, 2, 3 o desnudo a las 36 horas de maduración utilizando 50 ng/mL de GDF9 + 50 ng/mL de BMP15.

Para el análisis de varianza (ANOVA) se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$\gamma_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

- $\gamma$  es la variable respuesta (tasa de grado de expansión)
- $\mu$  es la media global de las observaciones.
- $\alpha_i$  es el efecto del tratamiento (Control, GDF9, BMP15 o MIX)
- $\epsilon_{ij}$  es el error aleatorio considerando el tratamiento.

#### **Tasa de maduración con efecto del tratamiento:**

- Control: Porcentaje de ovocitos en configuración de cromatina GV, GVBD, MI, AI, MII o degradados a las 36 horas de maduración sin aditivos.

- GDF9: Porcentaje de ovocitos en configuración de cromatina GV, GVBD, MI, AI, MII o degradados a las 36 horas de maduración utilizando 50 ng/mL de GDF9.
- BMP15: Porcentaje de ovocitos en configuración de cromatina GV, GVBD, MI, AI, MII o degradados a las 36 horas de maduración utilizando 50 ng/mL de BMP15.
- MIX: Porcentaje de ovocitos en configuración de cromatina GV, GVBD, MI, AI, MII o degradados a las 36 horas de maduración utilizando 50 ng/mL de GDF9 + 50 ng/mL de BMP15.

Para el análisis de varianza (ANOVA) se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$\gamma_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

- $\gamma$  es la variable respuesta (tasa de cada configuración de la cromatina)
- $\mu$  es la media global de las observaciones.
- $\alpha_i$  es el efecto del tratamiento (GDF9, BMP15 o MIX)
- $\epsilon_{ij}$  es el error aleatorio considerando el tratamiento.

Se compararon las medias de los grados de expansión 1, 2, 3 o desnudo de los COCs a las 36 horas en los grupos Control, GDF9, BMP15 o MIX con el análisis estadístico Tukey-Kramer DMSH (diferencia mínima significativa honesta).

Para el análisis se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$DMSH = q_{k,(n-k)}^{\alpha} \sqrt{\frac{CM_{error}}{2}} \left( \frac{1}{n_i} \right)$$

Dónde:

- $q_{k,(n-k)}^{\alpha}$  es el grado de libertad del error.
- $CM_{error}$  son los cuadrados medios del error.

- $n_i$  son las repeticiones de los tratamientos (Control, GDF9, BMP15 o MIX).

Asimismo, se compararon las medias de las siguientes variables por medio de la prueba de t de Student.

- Receptores BMPr: Comparación de la expresión relativa del gen *Bmpr1a*, *Bmpr1b*, y *Bmpr2* entre las CC de los COCs incubados con 50 ng/mL de BMP15 contra el Control.
- AREG y EREG: Comparación de la expresión relativa del gen *Areg* y *Ereg* entre las CC de los COCs incubados con 50 ng/mL de BMP15 contra el Control
- Marcadores de expansión: Comparación de la expresión relativa del gen *Has2*, *Ptgs2*, *Tnfaip6* y *Ptx3* entre las CC de los COCs incubados con 50 ng/mL de BMP15 contra el Control.

Se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$t = \frac{(x1 - x2)}{SED}$$

Dónde:

t es la diferencia entre las medias.

x1 es la media obtenida para la expresión relativa de los genes en el grupo Control.

x2 es la media obtenida para la expresión relativa de los genes en el grupo BMP15.

SED es el error estándar de diferencia entre las medias de las muestras.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. VISTA DORSAL DEL TRACTO REPRODUCTIVO DE LA YEGUA.	4
FIGURA 2. ANATOMÍA DEL OVARIO Y FOLICULOGÉNESIS EN LA YEGUA	5
FIGURA 3. CAMBIOS ENDÓCRINOS Y OVÁRICOS DURANTE EL CICLO ESTRAL DE LA YEGUA.	8
FIGURA 4. FOLICULOGÉNESIS Y OVOGÉNESIS	10
FIGURA 5. OVOCITO EQUINO DENTRO DEL FOLÍCULO <i>IN SITU</i> .	11
FIGURA 6. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS CATEGORÍAS MORFOLÓGICAS DEL COMPLEJO CUMULUS-OVOCITO EQUINO.	12
FIGURA 7. MECANISMO PARA EL MANTENIMIENTO DEL ARRESTO MEIÓTICO EN EL OVOCITO.	14
FIGURA 8. FACTORES PARA LA ACTIVACIÓN DE LA MEIOSIS.	15
FIGURA 9. VÍA DE SEÑALIZACIÓN CANÓNICA DE TGF- $\beta$ A TRAVÉS DE SMADS.	20
FIGURA 10. FUNCIONES DE LOS FACTORES SECRETADOS POR EL OVOCITO DURANTE LA MADURACIÓN.	23
FIGURA 11. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DEL GRADO DE EXPANSIÓN DE LOS COC DESPUÉS DEL CULTIVO.	29
FIGURA 12. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LA CONFIGURACIÓN DE LA CROMATINA DESPUÉS DE LA IVM Y TINCIÓN CON HOECHST 33342.	30
FIGURA 13. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LA EVALUACIÓN DE LA FERTILIZACIÓN POST CULTIVO DE EMBRIONES.	32
FIGURA 14. EFECTO DE BMP15 EN LA TASA DE SEGMENTACIÓN	37
A) TABLA DE PORCENTAJE DE SEGMENTACIÓN POST FERTILIZACIÓN DE OVOCITOS MADURADOS EN UN MEDIO CONTROL CONTRA BMP15.	
B) IMAGEN REPRESENTATIVA DE SEGMENTACIÓN A LAS 72 HORAS.	37
FIGURA 15. EXPRESIÓN RELATIVA DE <i>BMPRIA</i> , <i>BMPRIB</i> Y <i>BMPRII</i> .	38
COMPARACIÓN EN LA EXPRESIÓN RELATIVA DE ARNm DE <i>BMPRIA</i> , <i>BMPRIB</i> Y <i>BMPRII</i> EN LAS CÉLULAS DEL CÚMULO DESPUÉS DE IVM EN UN MEDIO DE CONTROL CONTRA BMP15 (50 NG/ML). * ES INDICATIVA DE SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA (P<0.05).	38
FIGURA 16. EXPRESIÓN RELATIVA DE <i>AREG</i> Y <i>EREG</i> .	39
COMPARACIÓN EN LA EXPRESIÓN RELATIVA DE ARNm DE <i>AREG</i> Y <i>EREG</i> EN LAS CÉLULAS DEL CÚMULO DESPUÉS DE IVM EN UN MEDIO DE CONTROL CONTRA BMP15 (50 NG/ML). ** ES INDICATIVA DE SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA (P<0.005).	39
FIGURA 17. EXPRESIÓN RELATIVA DE <i>PTGS2</i> , <i>PTX3</i> , <i>TNFAIP6</i> Y <i>HAS2</i> .	40
COMPARACIÓN EN LA EXPRESIÓN RELATIVA DE MRNA DE <i>PTGS2</i> , <i>PTX3</i> , <i>TNFAIP6</i> Y <i>HAS2</i> DEL CÚMULO DESPUÉS DE IVM EN UN MEDIO DE CONTROL CONTRA BMP15 (50 NG/ML). SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS EN DIFERENTES NIVELES: * (P< 0.05); ** (P<0.005), *** (P<.001).	40

## LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. GRUPOS EXPERIMENTALES	28
CUADRO 2. LISTA DE PRIMERS UTILIZADOS PARA QPCR	33
CUADRO 3. PORCENTAJES PROMEDIO DEL GRADO DE EXPANSIÓN DE LAS CC (+/- ERROR ESTÁNDAR)	35
CUADRO 4. PORCENTAJES PROMEDIO EN CADA CLASIFICACIÓN DE CONFIGURACIÓN DE CROMATINA (+/- ERROR ESTÁNDAR)	36

## ABREVIATURAS

<b>AI</b>	Anafase I
<b>AMH</b>	Hormona Anti-Mülleriana
<b>AMP</b>	Adenosin monofosfato
<b>ANDEVA</b>	Análisis de varianza
<b>Areg</b>	Gen anfirregulina
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>BMP15</b>	Proteína morfogenética ósea 15
<b><i>Bmpr</i></b>	Gen del receptor de proteína morfogenética ósea
<b>BSA</b>	Suero de albumina bovina
<b>BTC</b>	Betacelulina
<b>cAMP</b>	Adenosin monofosfato cíclico
<b>CC</b>	Células del cumulus
<b>CCNB1/2</b>	Ciclina B ½
<b>CDK1</b>	Cinasa dependiente de ciclina 1
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>CG</b>	Células de la granulosa
<b>cGMP</b>	Guanosin monofosfato cíclico
<b>CL</b>	Cuerpo lúteo
<b>CO2</b>	Dioxido de carbono
<b>COC</b>	Complejo cumulus-ovocito
<b>Cp</b>	Cumulus compacto
<b>CT</b>	Células de la teca
<b>Cx</b>	Conexina
<b>DMSH</b>	Análisis de diferencia mínima significativa honesta
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EGF-like</b>	Proteínas parecidas al factor de crecimiento epidermal
<b>EMMI</b>	Medio de maduración equino
<b><i>Ereg</i></b>	Gen epirregulina
<b>Ex</b>	Cumulus expandido
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
<b>FSH</b>	Hormona foliculoestimulante
<b>G3P</b>	Proteína G3 rica en glicina

<b>GDF9</b>	Factor de crecimiento y diferenciación 9
<b>GDFN</b>	Factor neurotrópico derivado de células gliales
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de gonadotropinas
<b>GTP</b>	Guanosin trifosfato
<b>GV</b>	Vesícula germinal
<b>GVBD</b>	Ruptura de la vesícula germinal
<b>HA</b>	Ácido hialurónico
<b>Has2</b>	Gen de hialuronano sintasa 2
<b>HCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato
<b>ICSI</b>	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
<b>IVC</b>	Cultivo de embriones <i>in vitro</i>
<b>IVEP</b>	Producción de embriones <i>in vitro</i>
<b>IVF</b>	Fertilización <i>in vitro</i>
<b>IVM</b>	Maduración <i>in vitro</i>
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógenos
<b>MI</b>	Metafase I
<b>MII</b>	Metafase II
<b>MPF</b>	Factor promotor de la maduración
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrógeno
<b>NPPC</b>	Péptido natriurético precursor tipo C
<b>NPR2</b>	Receptor del péptido natriurético 2
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno
<b>OSFs</b>	Factores secretados por el ovocito
<b>PB</b>	Cuerpo polar
<b>PBS</b>	Búffer fosfato salino
<b>PDE3</b>	Fosfodiesterasa
<b>PGF<sub>2</sub></b>	Prostaglandina F <sub>2</sub> alfa
<b>PHE</b>	D-Penicilamina, hipotaurina y epinefrina
<b>PKA</b>	Proteína cinasa
<b>PN</b>	Pronúcleo
<b>Ptgs2</b>	Gen de prostaglandina-endoperoxido sintasa 2
<b>Ptx3</b>	Gen de pentraxina 3
<b>qPCR</b>	Reacción en la cadena de la polimerasa en tiempo real
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RT-PCR</b>	Reacción en la cadena de la polimerasa en retrotranscriptasa
<b>SMAD</b>	Proteína Smad
<b>TGF-β</b>	Factor del crecimiento transformante beta
<b>Tnfaip6</b>	Gen 6 inducible por el factor de necrosis tumoral
<b>UICN</b>	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
<b>ZP</b>	Zona pelúcida

## REFERENCIAS

- Adams, G.P. and Bosu, W.T. (1988) 'Reproductive physiology of the nonpregnant mare. An overview and update', *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, 4(2), pp. 161–176. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30634-X](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30634-X).
- Águila, L. *et al.* (2017) 'Sperm capacitation pretreatment positively impacts bovine intracytoplasmic sperm injection', *Molecular Reproduction and Development* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1002/mrd.22834>.
- Ashkenazi, H. *et al.* (2005) 'Epidermal growth factor family members: Endogenous mediators of the ovulatory response', *Endocrinology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2004-0588>.
- Baumgarten, S.C. and Stocco, C. (2018) 'Granulosa cells', *Encyclopedia of Reproduction*, pp. 8–13. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64623-8>.
- Benammar, A. *et al.* (2021) 'The Mare: A Pertinent Model for Human Assisted Reproductive Technologies?', *Animals 2021, Vol. 11, Page 2304*, 11(8), p. 2304. Available at: <https://doi.org/10.3390/ANI11082304>.
- Bodensteiner, K.J. *et al.* (1999) 'Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries', *Biology of Reproduction* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.2.381>.
- Brankin, V. *et al.* (2005) 'Evidence for a functional bone morphogenetic protein (BMP) system in the porcine ovary', *Domestic Animal Endocrinology*, 28(4), pp. 367–379. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.01.001>.
- Brinsko, S.P. and Blanchard, T.L. (2011) *Manual of equine reproduction*. 3rd edition. Edited by Elsevier Health Sciences. Mosby/Elsevier.
- Bristol, S.K. and Woodruff, T.K. (2004) 'Follicle-Restricted Compartmentalization of Transforming Growth Factor  $\beta$  Superfamily Ligands in the Feline Ovary', *Biology of Reproduction*, 70(3), pp. 846–859. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.021857>.
- Brück, I., Greve, T. and Hyttel, P. (1999) 'Morphology of the oocyte-follicular connection in the mare', *Anatomy and embryology*, 199(1), pp. 21–28. Available at: <https://doi.org/10.1007/S004290050205>.

De Caestecker, M. (2004) 'The transforming growth factor- $\beta$  superfamily of receptors', *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 15(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2003.10.004>.

Caixeta, E.S. *et al.* (2013a) 'Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes', *Reproduction*, 146(1), pp. 27–35. Available at: <https://doi.org/10.1530/REP-13-0079>.

Caixeta, E.S. *et al.* (2013b) 'Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes', *Reproduction*, 146(1), pp. 27–35. Available at: <https://doi.org/10.1530/REP-13-0079>.

Carnevale, E.M. (2016) 'Advances in Collection, Transport and Maturation of Equine Oocytes for Assisted Reproductive Techniques', *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 32(3), pp. 379–399. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.07.002>.

Chang, E.M. *et al.* (2014) 'In vitro maturation of human oocytes: Its role in infertility treatment and new possibilities', *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 41(2), pp. 41–46. Available at: <https://doi.org/10.5653/cerm.2014.41.2.41>.

Christoforou and Efthimia (2017) 'The effects of oocytes on Smad signaling pathways in granulosa cells'. Available at: <http://researcharchive.vuw.ac.nz/handle/10063/6233> (Accessed: 14 November 2023).

Conti, M. and Chang, R.J. (2015) *Folliculogenesis, Ovulation, and Luteogenesis*. Seventh Ed, *Endocrinology: Adult and Pediatric*. Seventh Ed. Elsevier Inc. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-18907-1.00125-6>.

Conti, M. and Franciosi, F. (2018) 'Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events', *Human Reproduction Update*, 24(3), pp. 245–266. Available at: <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMX040>.

Coutinho da Silva, M.A. (2008) 'When should a mare go for assisted reproduction?', *Theriogenology*, 70(3), pp. 441–444. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.05.039>.

Crowell-Davis, S.L. (2007) 'Sexual behavior of mares', *Hormones and behavior*, 52(1), pp. 12–17. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2007.03.020>.

Da, B. *et al.* (2006) 'RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS EQÜINOS COM Cumulus oophorus COMPACTO POR CURETAGEM DA PAREDE FOLICULAR', *Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science*, 7(4), pp. 417–422. Available at: <https://revistas.ufg.br/vet/article/view/871> (Accessed: 13 July 2023).

Davies Morel, M.C.G. (2008) 'Equine reproductive physiology, breeding and stud management', p. 378. Available at: [https://books.google.com/books/about/Equine\\_Reproductive\\_Physiology\\_Breeding.html?hl=es&id=1WqBj-OgzaAC](https://books.google.com/books/about/Equine_Reproductive_Physiology_Breeding.html?hl=es&id=1WqBj-OgzaAC) (Accessed: 5 June 2023).

Davis, K.A. *et al.* (2018) 'Effects of immunization against bone morphogenetic protein-15 and growth differentiation factor-9 on ovarian function in mares', *Animal Reproduction Science*, 192(August 2017), pp. 69–77. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.015>.

Dong, J. *et al.* (1996) 'Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis', *Nature* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1038/383531a0>.

Dragovic, R.A. *et al.* (2005) 'Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion', *Endocrinology*, 146(6), pp. 2798–2806. Available at: <https://doi.org/10.1210/EN.2005-0098>.

Eppig, J.J. *et al.* (2004) 'Regulation of Mammalian Oocyte Maturation', *The Ovary: Second Edition*, pp. 113–129. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-012444562-8/50008-2>.

Erickson, G.F. *et al.* (1985) 'The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships', *Endocrine reviews*, 6(3), pp. 371–399. Available at: <https://doi.org/10.1210/EDRV-6-3-371>.

Erickson, G.F. (2000) 'The Graafian Follicle: A Functional Definition', in *Ovulation*. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-0-387-21508-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-0-387-21508-2_3).

Fair, T. (2003) 'Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence', *Animal Reproduction Science* [Preprint]. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00091-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00091-5).

Findlay, J.K. *et al.* (2000) 'The roles of activins, inhibins and estrogen in early committed follicles', *Molecular and Cellular Endocrinology* [Preprint]. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00243-9](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00243-9).

Fitzpatrick, S.L. *et al.* (1998) 'Expression of growth differentiation factor-9 messenger ribonucleic acid in ovarian and nonovarian rodent and human tissues', *Endocrinology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1210/endo.139.5.6014>.

Fulka, J., First, N.L. and Moor, R.M. (1998) 'Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation', *Molecular Human Reproduction* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1093/molehr/4.1.41>.

Fülöp, C. *et al.* (2003) 'Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice', *Development* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.00422>.

Galloway, S.M. *et al.* (2000) 'Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner', *Nature Genetics* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1038/77033>.

Gilchrist, R.B., Ritter, L.J. and Armstrong, D.T. (2004) 'Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals', in *Animal Reproduction Science*. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.017>.

Ginsburg, M., Snow, M.H.L. and McLaren, A. (1990) 'Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation', *Development* [Preprint].

Ginther, O.J. (1992) 'Reproductive Biology of the Mare', *Reproductive Biology of the Mare*. Edited by O.J. Ginther, pp. 135–172. Available at: [http://scholar.google.com/scholar?q=related:ynD5fh-TQRsJ:scholar.google.com/&hl=en&num=20&as\\_sdt=0,5&as\\_ylo=1992&as\\_yhi=1992](http://scholar.google.com/scholar?q=related:ynD5fh-TQRsJ:scholar.google.com/&hl=en&num=20&as_sdt=0,5&as_ylo=1992&as_yhi=1992) (Accessed: 6 June 2023).

Gittens, J.E.I. and Kidder, G.M. (2005) 'Differential contributions of connexin37 and connexin43 to oogenesis revealed in chimeric reaggregated mouse ovaries', *Journal of cell science*, 118(Pt 21), pp. 5071–5078. Available at: <https://doi.org/10.1242/JCS.02624>.

Gordon, I. (ed.) (2003) *Laboratory production of cattle embryos*, *Laboratory production of cattle embryos*. Wallingford: CABI. Available at: <https://doi.org/10.1079/9780851996660.0000>.

Gu, Y.Y. *et al.* (2020) 'Diverse Role of TGF- $\beta$  in Kidney Disease', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, p. 505124. Available at: <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.00123/BIBTEX>.

Hawley, L.R., Enders, A.C. and Hinrichs, K. (1995) 'Comparison of Equine and Bovine Oocyte-Cumulus Morphology within the Ovarian Follicle', *Biology of Reproduction*, 52(monograph\_series1), pp. 243–252. Available at: [https://doi.org/10.1093/BIOLREPROD/52.MONOGRAPH\\_SERIES1.243](https://doi.org/10.1093/BIOLREPROD/52.MONOGRAPH_SERIES1.243).

He, M. *et al.* (2021) 'Mechanisms of Oocyte Maturation and Related Epigenetic Regulation', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. Available at: <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.654028>.

Hinrichs, K. *et al.* (1993) 'In vitro maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy', *Biology of reproduction*, 48(2), pp. 363–370. Available at: <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD48.2.363>.

Hinrichs, K. *et al.* (2005) 'Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: Changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence', *Biology of Reproduction* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036012>.

Hinrichs, K. (2010) 'In Vitro Production of Equine Embryos: State of the Art', *Reproduction in Domestic Animals*, 45(SUPPL. 2), pp. 3–8. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2010.01624.X>.

Hinrichs, Katrin (2010) 'The equine oocyte: Factors affecting meiotic and developmental competence', *Molecular Reproduction and Development*, 77(8), pp. 651–661. Available at: <https://doi.org/10.1002/MRD.21186>.

Hinrichs, K. (2018) 'Assisted reproductive techniques in mares', *Reproduction in Domestic Animals*, 53, pp. 4–13. Available at: <https://doi.org/10.1111/rda.13259>.

Hinrichs, K. and Choi, Y.H. (2005) 'Assisted Reproductive Techniques in the Horse', *Clinical Techniques in Equine Practice*, 4(3), pp. 210–218. Available at: <https://doi.org/10.1053/J.CTEP.2005.07.002>.

Hinrichs, K. and Williams, K.A. (1997) 'Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse', *Biology of reproduction*, 57(2), pp. 377–384. Available at: <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD57.2.377>.

Hussein, T.S. *et al.* (2011) 'Temporal effects of exogenous oocyte-secreted factors on bovine oocyte developmental competence during IVM', *Reproduction, Fertility and Development*, 23(4), pp. 576–584. Available at: <https://doi.org/10.1071/RD10323>.

Hutt, K.J. and Albertini, D.F. (2007) 'An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis', *Reproductive BioMedicine Online*, 14(6), pp. 758–764. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60679-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60679-7).

Hyttel, P. *et al.* (1997) 'Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle', in *Theriogenology*. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(96\)00336-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00336-6).

Irvine, C.H.G. and Alexander, S.L. (1994) 'The dynamics of gonadotrophin-releasing hormone, LH and FSH secretion during the spontaneous ovulatory surge of the mare as revealed by intensive sampling of pituitary venous blood', *The Journal of endocrinology*, 140(2), pp. 283–295. Available at: <https://doi.org/10.1677/JOE.0.1400283>.

Ka, H.H. *et al.* (1997) 'Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated in vitro', *Biology of Reproduction* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.6.1478>.

Kim, M.J., Kim, Y.J. and Shim, H. (2016a) 'Treatment of Exogenous GDF9 and BMP15 during In vitro Maturation of Oocytes increases the Cell Number of Blastocysts in Pigs', *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 31(1), pp. 9–12. Available at: <https://doi.org/10.12750/jet.2016.31.1.9>.

Kim, M.J., Kim, Y.J. and Shim, H. (2016b) 'Treatment of Exogenous GDF9 and BMP15 during In vitro Maturation of Oocytes increases the Cell Number of Blastocysts in Pigs', *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 31(1), pp. 9–12. Available at: <https://doi.org/10.12750/jet.2016.31.1.9>.

Knight, P.G. and Glister, C. (2006a) 'TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development', *Reproduction*, 132(2), pp. 191–206. Available at: <https://doi.org/10.1530/rep.1.01074>.

Knight, P.G. and Glister, C. (2006b) 'TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development', *Reproduction*, pp. 191–206. Available at: <https://doi.org/10.1530/rep.1.01074>.

Kol, S. and Adashi, E.Y. (1995) 'Intraovarian factors regulating ovarian function', *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1097/00001703-199506000-00010>.

Lee, W.S. *et al.* (2004) 'Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary', *Molecular reproduction and development*, 69(2), pp. 159–163. Available at: <https://doi.org/10.1002/MRD.20163>.

Lonergan, P. and Fair, T. (2016) 'Maturation of Oocytes in Vitro', *Annual Review of Animal Biosciences*, 4(1), pp. 255–268. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110822>.

Matzuk, M.M. *et al.* (2002) 'Intercellular communication in the mammalian ovary: Oocytes carry the conversation', *Science* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1071965>.

Mazerbourg, S. *et al.* (2004) 'Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5', *Molecular Endocrinology*, 18(3), pp. 653–665. Available at: <https://doi.org/10.1210/me.2003-0393>.

McKinnon, A.O. *et al.* (2011) 'Equine Reproduction', 2nd edition. Available at: <https://www.wiley.com/en-kr/Equine+Reproduction%2C+2nd+Edition-p-9780470961872> (Accessed: 5 June 2023).

McNatty, K.P. and Sawers, R.S. (1975) 'Relationship between the endocrine environment within the Graafian follicle and the subsequent rate of progesterone secretion by human granulosa cells in vitro', *The Journal of endocrinology*, 66(3), pp. 391–400. Available at: <https://doi.org/10.1677/JOE.0.0660391>.

Millier, S.G., Whitelaw, P.F. and Smyth, C.D. (1994) 'Follicular oestrogen synthesis: the "two-cell, two-gonadotrophin" model revisited', *Molecular and Cellular Endocrinology* [Preprint]. Available at: [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(94\)90278-X](https://doi.org/10.1016/0303-7207(94)90278-X).

Miyazawa, K. *et al.* (2002) 'Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling', *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 7(12), pp. 1191–1204. Available at: <https://doi.org/10.1046/J.1365-2443.2002.00599.X>.

Moore, R.K., Otsuka, F. and Shimasaki, S. (2003) 'Molecular Basis of Bone Morphogenetic Protein-15 Signaling in Granulosa Cells', *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), pp. 304–310. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.M207362200>.

Morris, L.H.A. (2018) 'The development of in vitro embryo production in the horse', *Equine Veterinary Journal*, 50(6), pp. 712–720. Available at: <https://doi.org/10.1111/EVJ.12839>.

Mottershead, D.G., Ritter, L.J. and Gilchrist, R.B. (2012) 'Signalling pathways mediating specific synergistic interactions between GDF9 and BMP15', *Molecular Human Reproduction*, 18(3), pp. 121–128. Available at: <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAR056>.

Nagy, P., Guillaume, D. and Daels, P. (2000) 'Seasonality in mares', *Animal Reproduction Science*, 60(61), pp. 245–262. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00133-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00133-0).

Norris, R.P. *et al.* (2009) 'Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte', *Development* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.035238>.

Ochsner, S.A. *et al.* (2003) 'Disrupted function of tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated gene 6 blocks cumulus cell-oocyte complex expansion', *Endocrinology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2003-0487>.

Orisaka, M. *et al.* (2009) 'Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development', *Journal of ovarian research*, 2(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/1757-2215-2-9>.

Paulini, F. and Melo, E.O. (2011a) 'The Role of Oocyte-Secreted Factors GDF9 and BMP15 in Follicular Development and Oogenesis', *Reproduction in Domestic Animals*, 46(2), pp. 354–361. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01739.x>.

Paulini, F. and Melo, E.O. (2011b) 'The Role of Oocyte-Secreted Factors GDF9 and BMP15 in Follicular Development and Oogenesis', *Reproduction in Domestic Animals*, 46(2), pp. 354–361. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01739.x>.

Rajkovic, A., Pangas, S.A. and Matzuk, M.M. (2006) 'Follicular development: Mouse, sheep, and human models', in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50015-4>.

Raz, T. and Aharonson-Raz K. (2012) *Ovarian Follicular Dynamics During the Estrous Cycle in the Mare*. Available at: [https://www.researchgate.net/publication/285915689\\_Ovarian\\_Follicular\\_Dynamics\\_During\\_the\\_Estrous\\_Cycle\\_in\\_the\\_Mare](https://www.researchgate.net/publication/285915689_Ovarian_Follicular_Dynamics_During_the_Estrous_Cycle_in_the_Mare) (Accessed: 6 June 2023).

Reader, K.L. *et al.* (2016) 'Signalling pathways involved in the synergistic effects of human growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15', *Reproduction, Fertility and Development*, 28(4), pp. 491–498. Available at: <https://doi.org/10.1071/RD14099>.

Richani, D. and Gilchrist, R.B. (2018) 'The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence', *Human Reproduction Update*, 24(1), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMX029>.

Roser, J.F. *et al.* (1982) 'Effect of PGF-2 alpha on LH receptors in the equine corpus luteum.', *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 32, pp. 235–245.

Sánchez, F. and Smitz, J. (2012) 'Molecular control of oogenesis', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(12), pp. 1896–1912. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013>.

Sanfins, A., Rodrigues, P. and Albertini, D.F. (2018) 'GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(10), pp. 1741–1750. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1268-4>.

Sela-Abramovich, S. *et al.* (2006) 'Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation', *Endocrinology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2005-1011>.

Squires, E. (2020) 'Current Reproductive Technologies Impacting Equine Embryo Production', *Journal of equine veterinary science*, 89. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2020.102981>.

Steven P. Brinsko, T.L.B.D.D.V.J.S.C.C.L. (2011) *Manual of Equine Reproduction*. Available at: [https://books.google.ca/books?hl=es&lr=&id=rzV7DjV\\_mr8C&oi=fnd&pg=PP1&dq=equine+reproductive+physiology+anatomy&ots=5fkr2tLQN&sig=2PabBVpbSaLq\\_4TJEwwFyPBWTyg&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.ca/books?hl=es&lr=&id=rzV7DjV_mr8C&oi=fnd&pg=PP1&dq=equine+reproductive+physiology+anatomy&ots=5fkr2tLQN&sig=2PabBVpbSaLq_4TJEwwFyPBWTyg&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false) (Accessed: 5 June 2023).

Tanghe, S. *et al.* (2002) 'Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization', *Molecular Reproduction and Development* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1002/mrd.10102>.

Tripathi, A., Prem Kumar, K. V. and Chaube, S.K. (2010) 'Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes', *Journal of Cellular Physiology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.22108>.

Turathum, B. *et al.* (2021) 'The Function of Cumulus Cells in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and Fertilization'. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells10092292>.

Vitt, U.A. *et al.* (2002) 'Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9', *Biology of Reproduction*, 67(2), pp. 473–480. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.2.473>.

Yeo, C.X. *et al.* (2008) 'Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice', *Human Reproduction*, 23(1), pp. 67–73. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/dem140>.





