



Ingeniería Agronómica

**“Efecto de la suplementación con Melatonina
en el desarrollo embrionario post-ICSI de
ovocitos equinos criopreservados”**

Trabajo final de graduación para optar por el
título de: Ingeniero Agrónomo.

Alumno: Tomás Barberis Aduriz.

Profesor tutor: Ing. Prod. Agrop. Gabriel Clérico.

1. Resumen:

La vitrificación de ovocitos en la especie equina continúa siendo ineficiente en comparación a otras especies de interés doméstico, habiéndose reportado solo 3 nacimientos provenientes de ovocitos vitrificados. Estos resultados pueden ser explicados por el ambiente oxidativo hostil que presenta esta técnica. La melatonina, una hormona antioxidante, podría mejorar la viabilidad de los ovocitos. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la melatonina sobre la maduración de los ovocitos vitrificados, el desarrollo post-ICSI de los embriones y su viabilidad. Los ovocitos inmaduros obtenidos de yeguas de frigorífico fueron mantenidos en medio de holding por 15 horas. Luego fueron vitrificados utilizando un protocolo de 3 pasos en una solución final de 20% Etilen-Glicol, 20% Dimetil Sulfóxido (DMSO) y 0,65M de Trehalosa. En el Experimento 1 se evaluó el efecto de la suplementación con melatonina en el medio de maduración sobre la maduración in vitro de ovocitos. La melatonina no produjo una mejora en la maduración de los ovocitos. El porcentaje de maduración de ovocitos suplementados con melatonina (65% para los no vitrificados y 54% para los vitrificados) y sin suplementar (53% para los no vitrificados y 54% para los vitrificados) no mostraron diferencias significativas estadísticamente ($p=0.19$). En el experimento 2 se evaluó el desarrollo embrionario post ICSI de los ovocitos suplementados con melatonina en el medio de maduración. La melatonina no tuvo efecto en el porcentaje de clivaje ni en la tasa de blastocistos. Los ovocitos vitrificados y suplementados con melatonina tuvieron una tasa de clivaje (61%) y tasa de blastocisto (15%) similar a los no vitrificados, melatonina (+) y melatonina (-) (Clivaje: 75% y 77%, Tasa de blastocistos: 29% y 26% respectivamente). La viabilidad de los embriones fue evaluada con la transferencia a yeguas receptoras. Dentro de los grupos no vitrificados se obtuvo una preñez del 50% y 83% para los tratamientos suplementados con melatonina y los no suplementados, respectivamente. Dentro de los grupos vitrificados, se obtuvo un 17% de preñez para los suplementados con melatonina y un 33% para los no suplementados. Se obtuvieron dos crías, una hembra de un ovocito vitrificado sin suplementar, y un macho de un ovocito vitrificado y suplementado con melatonina. El proceso de vitrificación demostró afectar el desarrollo embrionario post-ICSI de los ovocitos. Para poder determinar si la diferencia en los resultados de preñeces observados es significativa estadísticamente, se debería aumentar el número de embriones transferidos a receptoras en próximos trabajos.

Índice:

1. Resumen	
2. Introducción	
2.1 Importancia de las ART en equinos.....	
2.2 Criopreservación de ovocitos.....	
2.3 ROS: Importancia en los sistemas <i>in vitro</i>	
2.4 Antioxidantes para contrarestar la acción de las ROS.....	
2.5 Suplementación con melatonina como antioxidante.....	
2.6 Hipotesis	
2.7 Objetivos	
3. Materiales y Métodos	
4. Resultados	
5. Discusión	

2. Introducción:

2.1. Importancia de las ART en equinos:

El desarrollo de biotecnologías de reproducción asistida (ART por sus siglas en inglés) en equinos ha sido más lento en comparación con otras especies domésticas (Galli et al., 2013). Entre los principales factores se cita la falta de interés por parte de los criadores de caballos y la escasa disponibilidad de ovarios para investigación. La utilización de ovarios de frigorífico es esencial como fuente de ovocitos en grandes cantidades para el desarrollo de la mayoría de las técnicas de ART *in vitro*. El acceso a los mismos ha sido cada vez más limitado en los últimos años debido a la baja cantidad de frigoríficos de caballos en Argentina y el mundo (Galli et al., 2013).

En la especie equina no es posible producir embriones *in vitro* mediante la técnica convencional de fecundación *in vitro* (FIV), la cual es ampliamente utilizada en bovinos con más de 1.000.000 de embriones producidos para el año 2019 (Viana, 2020). Como alternativa, se logró desarrollar y adaptar la Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI); esta técnica consiste en la inyección de un único espermatozoide dentro de cada ovocito mediante técnicas de micromanipulación. La técnica permite mejorar la eficiencia en el uso del semen de padrillos altamente demandados, ya que con una única pajuela es posible fecundar cientos de ovocitos; también se utiliza para reproductores con muestras de baja calidad, e incluso otros que han muerto y de los cuales solo se conservan pocas dosis. La producción *in vitro* de embriones es una herramienta útil también para casos de yeguas subfértiles (que no logran generar embriones y/o preñeces), u otras que fallecen.

La biotecnología de criopreservación de ovocitos para producción de embriones *in vitro* no ha sido desarrollada aun en la especie equina. Esta técnica permitiría disociar las tareas de obtención de ovocitos y de producción de embriones, ya que los ovocitos pueden ser criopreservados *in situ* (en el haras o campo) y luego ser trasladados al laboratorio sin límite de tiempo o distancia. También se podrían criopreservar ovocitos de yeguas jóvenes cuyo potencial aún no ha sido demostrado, para en un futuro decidir si utilizarlos o no ya que a medida que la yegua envejece, también lo hacen sus ovarios. Gran parte de las especies de équidos salvajes se encuentran en peligro de extinción (Adams et al., 2009); además, el número de razas equinas se encuentra en constante decrecimiento y, dentro de las razas actuales, se encuentran algunas con altos niveles de endogamia por consecuencia de la selección artificial (Ducro et al., 2015; Leegwater et al., 2016; Smits et al., 2012). El almacenamiento genético de ovocitos criopreservados podría ser de utilidad para razas con una baja población, para aumentar el pool genético y evitar que se extingan (De Coster et al., 2020).

2.2 Criopreservación de gametas:

La criopreservación es el enfriamiento a temperaturas menores a 0°C, utilizada para almacenar ovocitos, embriones, semen y tejidos de las gónadas. Una de las técnicas más utilizadas es el enfriamiento lento o procedimiento de enfriado por equilibrio, donde se agrega un crioprotector que cubre a la célula para luego ser enfriada a una tasa determinada por el tamaño de la misma y su permeabilidad. La tasa de descongelado y la eliminación de dicho crioprotector también depende del proceso de enfriado y de las características de la célula. Se le llama enfriado por equilibrio ya que se cree que el resultado es óptimo cuando la tasa de enfriado permite que se establezca un equilibrio entre el agua que se elimina de la célula, es decir la deshidratación, y la tasa a la cual ese agua se incorpora al medio extracelular formando cristales de hielo. Se finaliza el proceso de enfriamiento lento cuando la temperatura se estabiliza entre -30°C y -80°C, para después ser almacenadas en termos de nitrógeno a -196°C (Mazur, 1990).

Hay distintas tasas de enfriamiento óptimas según el tipo de célula y la especie con que se está trabajando. Por ejemplo, la tasa óptima de enfriado para ovocitos y embriones de ovinos es de entre 0.5°C/ min (Karaman Öztürk et al., 2016). Para células de hámster 100°C/min y para glóbulos rojos humanos >1000°C/min (Elliott et al., 1977).

Además del proceso de enfriado por equilibrio, existe el enfriamiento rápido, ultra rápido o vitrificación. En esta técnica la muestra se enfría formando un estado vítreo o cristalino sin la formación de cristales de hielo. La probabilidad de alcanzar el estado vítreo de una muestra depende no solo de los componentes de la solución, sino principalmente de las tasas de enfriamiento. La vitrificación difiere del enfriamiento lento en que la deshidratación y el traspaso del crioprotector a través de la membrana celular ocurre antes de que comience el enfriamiento. Además, el enfriamiento, ocurre en un solo paso donde la muestra se enfría desde una temperatura >0°C a temperaturas bajo cero (-130°C). Esta técnica obtiene mejores resultados en embriones animales en comparación a la del enfriamiento lento. Además, se utiliza menos equipamiento, menos nitrógeno líquido y conlleva menor tiempo de procesado (Shaw & Jones, 2003)

A diferencia del enfriamiento lento, donde la solución de enfriamiento se expande por el aumento de volumen del hielo, el volumen de la solución de vitrificación no varía con la temperatura. Esto convertiría a la vitrificación en una técnica menos dañina para las células (Shaw & Jones, 2003).

La utilización de crioprotectores es fundamental. Sin estos, la mayoría de las células morirían una vez enfriadas a temperaturas bajo cero debido a la formación intracelular de cristales de hielo. Los procedimientos de criopreservación buscan disminuir el daño causado por la formación y crecimiento de estos cristales de hielo. En vitrificación se busca reducir o eliminar la formación de hielo tanto intra como extracelular. En cambio, en el enfriamiento lento se utilizan soluciones para formar hielo extracelular, el cual es esencial para el éxito de la técnica. En este los cristales de hielo intracelular no se forman debido a que el hielo extracelular extrae el agua intracelular hasta que haya muy poca agua libre

dentro de la célula. Esta deshidratación solo ocurre si se permite la formación de hielo extracelular (Shaw & Jones, 2003)

Los núcleos de hielo no dañan la célula debido a su pequeño tamaño (comienzan como 2 pares de moléculas de agua). El daño es producido por los cristales de hielo de mayor tamaño, que fueron originados por un núcleo de hielo al cual se le enlazaron moléculas de agua, generando un aumento de volumen. Otra causa de daño celular en el enfriamiento lento es el avance de la frontera de hielo la cual, al enlazarse a moléculas de agua, produce la acumulación de sales, solutos y gases que pueden tener efectos tóxicos. En el descongelado también se produce daño al formar áreas de agua pura, la cual puede generar un estrés osmótico (Shaw & Jones, 2003)

Las células además de contener agua libre, poseen moléculas de agua ligadas mediante uniones de hidrógeno a átomos de moléculas como proteínas, ARN, ADN y a la membrana fosfolipídica. Estas moléculas son esenciales para mantener la funcionalidad y estructura de la célula. Los procedimientos para el enfriamiento lento y el enfriamiento rápido buscan reducir la formación de grandes cristales de hielo mediante la deshidratación y el ingreso de crioprotectores. Los crioprotectores contrarrestan el daño producido por la deshidratación, ya que actúan sustituyendo a las moléculas de agua en la superficie de las proteínas.

La mayoría de los medios utilizados para la criopreservación de ovocitos y embriones está formada por una solución salina, la cual se le añade crioprotectores capaces de atravesar la membrana plasmática tales como 1,2-Propanodiol, dimetilsulfóxido, etilenglicol y polietilenglicol; además se agrega normalmente un azúcar que se incorpora a la membrana celular (Anchordoguy et al., 1987; Crowe et al., 1988). Las soluciones utilizadas para vitrificación además cuentan con un polímero que facilita la vitrificación a ciertas concentraciones del crioprotector. Esto es debido a que el crioprotector disminuye el punto de congelamiento. En los procesos de enfriamiento para ovocitos y embriones, particularmente en vitrificación, se realiza una adición y dilución gradual de los componentes de la solución, esto tiene como fin disminuir la toxicidad del crioprotector y evitar el estrés osmótico del mismo cuando se calienta (Shaw & Jones, 2003).

Vitrificación de ovocitos equinos

La criopreservación de ovocitos es un proceso por el cual las células decrecen su actividad metabólica y aumenta su capacidad de ser conservadas en el tiempo (Armitage, 1986). La técnica de vitrificación erradica los daños asociados a la formación de cristales de hielo durante el proceso de enfriamiento, lo que le permite a las células mantener su estructura, a diferencia del enfriamiento lento. Los beneficios de la vitrificación por sobre el enfriamiento lento hicieron que en el mundo se adopte cada vez más esta técnica. Sin embargo, nuevos avances sobre la vitrificación se siguen desarrollando ya sea, en métodos abiertos o cerrados, es decir, en contacto directo o indirecto del medio con el nitrógeno líquido.

En bovinos, la criopreservación mediante vitrificación de ovocitos ha demostrado tener buenos resultados. Un trabajo publicado por Dalvit et al. (2012) no reportó diferencias significativas entre la utilización de ovocitos vitrificados y sin vitrificar respecto a la supervivencia y desarrollo embrionario.

En la especie porcina se reportaron nacimientos de lechones de ovocitos vitrificados (Gajda et al., 2015). Aun así, la supervivencia de los ovocitos tras la vitrificación se ve comprometida y la técnica necesita de mayor desarrollo, específicamente en mejorar el balance redox y la defensa antioxidante enzimática y no enzimática (Mateo et al., 2021)

En la especie equina, la técnica de criopreservación ovocitos no ha sido desarrollada aun. Solo 3 nacimientos de potrillos fueron reportados en el mundo a partir de ovocitos vitrificados, 1 solo de los cuales corresponde a la combinación con técnicas de producción *in vitro* de embriones (Maclellan et al., 2002; Ortiz-Escribano et al., 2017). El éxito de la técnica está influenciado por distintos factores propios de los ovocitos utilizados para su desarrollo (que suelen provenir de ovarios de yeguas de frigoríficos) tales como el estadio de maduración del núcleo, la edad de la yegua y la presencia o no de células del cumulo que recubren el ovocito. De coster et al. (2020) reportaron que ovocitos con múltiples células del cumulo a su alrededor evitan la correcta permeabilidad de los crioprotectores. En cambio, ovocitos recubiertos únicamente por la corona radiata permiten un apropiado intercambio de agua y crioprotectores (Ortiz-Escribano et al., 2018).

2.3. ROS: Importancia en los sistemas *in vitro*

Uno de los principales factores que afectan el resultado de la producción *in vitro* de embriones es el estrés oxidativo, el cual es causado por un desbalance entre la producción y eliminación de las especies intracelulares reactivas del oxígeno. Estas ROS (especies reactivas del oxígeno por sus siglas en inglés) provienen de moléculas de oxígeno con uno o más electrones desapareados, como por ejemplo el radical iónico superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH^-), radical peroxil (ROO^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Halliwell, 2012). Son normalmente generadas por el metabolismo regular de la célula, principalmente por la pérdida de electrones durante la fosforilación oxidativa (Fujii et al., 2005).

Las ROS deben ser mantenidas, mediante mecanismos antioxidantes celulares, a niveles bajos y balanceados para el correcto funcionamiento celular. Niveles por encima de los fisiológicos dañan la célula mediante distintos mecanismos como la peroxidación lipídica (Esterbauer et al., 1991), la cual actúa sobre sus membranas por la reacción del oxígeno molecular con los ácidos grasos, la agregación o degradación de proteínas (Park et al., 2010), y por daño en el ADN. (Evans et al., 2004).

Para que haya un correcto desarrollo de los ovocitos, estos deben tener un balance redox adecuado. El estado de redox va a ser resultado de un balance entre la generación de estas moléculas oxidantes y la neutralización por antioxidantes. La homeostasis del estado Redox incide directamente en la producción de gametas y embriones sanos. Una ruptura de este estado, puede impactar en la señalización de procesos, factores de la

transcripción y mecanismos de la epigenética, causando una reducción en la calidad del embrión.

La formación de ATP dentro de la mitocondria causa un aumento en las moléculas de ROS. La generación de ROS ocurre principalmente en el complejo 1 (Donde actúa la NADH Deshidrogenasa) y el complejo 3 (Figura 1). En el complejo 4 el oxígeno molecular es transformado en agua. En esta cadena de electrones, el oxígeno molecular puede ganar un electrón, transformándose en la molécula superóxido, la cual reacciona con ácidos grasos (Inoue et al., 2005). Esto puede producir una reducción en la viabilidad de la célula o desencadenar en la apoptosis o muerte celular programada (Baker & Aitken, 2004).

La propia mitocondria es afectada por el aumento de ROS. El ADN mitocondrial, al no poseer histonas, es susceptible al daño oxidativo. Las ROS pueden fugarse de la mitocondria dañada al citoplasma. (Catt & Henman, 2000). Cualquier disturbio en la mitocondria resulta en un problema para la producción de ATP, esencial para la función de las gametas y embriones (Liu et al., 2000).

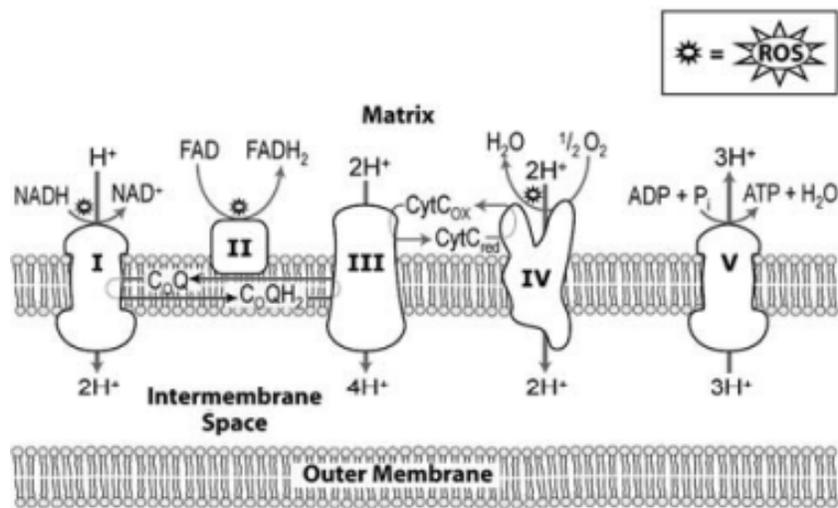


Figura 1: Producción de ROS por la cadena de transporte de electrones. Fuente: (Agarwal et al., 2008)

El líquido folicular tiene en su composición antioxidantes enzimáticos, los cuales oxidan a las especies reactivas del oxígeno a moléculas inocuas (Ambekar et al., 2013). Un correcto balance de ROS permite el desarrollo del ovocito y de otros procesos, como por ejemplo, los relacionados al folículo. Sin embargo, cuando se cambian las condiciones de desarrollo *in vivo* a *in vitro*, los niveles de ROS superan los niveles normales debido a una exposición a factores oxidativos y a la separación del líquido folicular (Kala et al. (2017).

Factores que potencian la producción de ROS en sistemas *in vitro*:

Existe una interacción entre los suplementos que se adicionan al medio de cultivo *in vitro* y el metabolismo del ovocito. Se reportó que la concentración de oxígeno modula los requerimientos de metabolitos en embriones de cerdo después del cultivo *in vitro* del ovocito. Un aumento en la concentración de glucosa suplementada al medio resulta en un aumento en la generación de ROS en el día 1 del embrión, causando un menor desarrollo embrionario (Karja et al., 2006). La adecuada concentración de las fuentes de energía suplementadas al medio es de suma importancia para el desarrollo competente de ovocitos de mamíferos.

En cigotos de ratones y hamsters expuestos a la luz fría de las lámparas fluorescentes, comúnmente utilizada en los laboratorios, genera niveles de ROS mayores en comparación a la exposición a la luz blanca cálida (Partonen & Lönnqvist, 1993)

Con respecto a la temperatura, el cultivo de ovocitos de cerdos a altas temperaturas (41-42°C) durante toda, o parte, de la maduración *in vitro* induce un estrés térmico que genera un aumento en la producción de ROS y por lo tanto un menor potencial de desarrollo embrionario (Li et al., 2016)

La reducción del oxígeno atmosférico durante las ART es beneficiosa para el desarrollo embrionario. Un estudio realizado en ratones determinó que ovocitos madurados a 5% de O₂ atmosférico, dieron como resultado embriones con un conteo celular de un 20-45% mayor que los madurados a 20% de O₂. Se concluyó que los ovocitos madurados a concentraciones de oxígeno similares a las *in vivo* tienen un mejor desarrollo y una mayor actividad metabólica (Preis et al., 2007)

Rol de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la maduración *in-vitro* y la vitrificación de ovocitos:

Los ovocitos utilizados en la maduración *in vitro*, son obtenidos a partir de folículos inmaduros o folículos preovulatorios. Cuando se utilizan ovarios de frigorífico, para las ART en especies domésticas, se recuperan ovocitos a partir de folículos inmaduros únicamente. La maduración de los ovocitos *in vitro* es necesaria debido a que son obtenidos en un estadio inmaduro dentro del ovario. En condiciones *in vivo* varios ovocitos aumentan de tamaño y maduran pero solo uno va a ovular mientras los otros van a morir a través de la atresia folicular. La maduración es un proceso largo, donde el ovocito adquiere la capacidad de ser fecundado y llevar a cabo la embriogénesis. Dentro de esta maduración ocurren varios procesos celulares complejos como la meiosis, el crecimiento citoplasmático, la producción y distribución de organelas, producción de ARN para desarrollar el clivaje embrionario, maduración del núcleo y del citoplasma para continuar con la meiosis. El desafío para la maduración *in vitro* recae en reflejar el cambio ambiental al que está expuesto el folículo en condiciones *in vivo*, sin dañar el ovocito. Además, el mismo ovocito varía en su composición y su tamaño a lo largo de la maduración (Hart & Walls, 2018).

Los factores presentes en el cultivo *in vitro* que favorecen la aparición de ROS son la concentración de oxígeno, la luz, la manipulación de ovocitos y el mismo metabolismo de

los ovocitos (Agarwal et al., 2006) . A diferencia de las condiciones *in vivo*, en *in vitro* no existe una defensa antioxidante ante la generación de ROS en el medio de cultivo. Por lo tanto, se proporcionan las condiciones para que aumente el daño al ADN del ovocito, o también que se desencadene la apoptosis.

La vitrificación está relacionada con la interrupción del balance redox normal, la disminución del contenido de glutatión (GSH) y el aumento de niveles de ROS. Por consecuencia, se producen daños al ADN, a la membrana lipídica y a la mitocondria. Esto puede inducir a la célula a la apoptosis, reducir el clivaje y la viabilidad embrionaria (Gutnisky et al., 2020; Zhao et al., 2016).

Un trabajo publicado por Zhao et al. (2011a) en ovocitos bovinos vitrificados demostró que la vitrificación produjo aumentos en los niveles intracelulares de ROS, además de una alteración en el funcionamiento mitocondrial. En otro trabajo, se demostró que la vitrificación de ovocitos bovinos tuvo un impacto negativo en la maduración *in vitro* de los mismos; los niveles de ROS aumentaron, el contenido de ATP disminuyó y la tasa de blastocistos fue menor en comparación a los ovocitos no vitrificados (Zhao et al., 2011b).

Un estudio de Somfai et al. en la especie porcina, demostró que ovocitos vitrificados, tuvieron una menor viabilidad después del calentamiento. Solo un embrión, a partir de 113 ovocitos vitrificados, logró llegar al estadio de blastocisto (Somfai et al., 2007).

2.4. Antioxidantes para contrarrestar la acción de las ROS:

En condiciones *in vivo*, el sistema fisiológico, posee antioxidantes enzimáticos (Ej: SOD, catalasa y GSH peroxidasa) y antioxidantes no-enzimáticos (Vitamina C, Vitamina E, cisteína) los cuales contrarrestan y minimizan los efectos nocivos de las especies reactivas del oxígeno (ROS). Además existen captadores de estas moléculas presentes en el endometrio y líquido folicular (Guérin et al., 2001). En condiciones *in vitro*, a diferencia de *in vivo*, no existen dichos componentes.

Ha sido descrito que las ROS generadas en condiciones *in vitro* afectan a las mitocondrias, a la fusión entre el espermatozoide y el óvulo, al ADN y al ARN (Agarwal et al., 2006). Los antioxidantes incorporados al medio de cultivo mejoran el desarrollo embrionario al reducir los efectos de las especies reactivas del oxígeno. Entre estos, se encuentran la vitamina E, la vitamina C, la cisteína, la enzima catalasa catalasa, el beta-mercaptoetanol y la taurina.

Se comprobó que la taurina, un antioxidante no enzimático, favorece el desarrollo embrionario temprano. En embriones de ratones que expuestos a especies reactivas del oxígeno (ROS) exógenas, al haber sido suplementados con vitamina C, aumentaron significativamente la tasa de desarrollo hasta el estadio de blastocisto (Wang et al., 2002). Además, varios estudios indican que el ácido ascórbico actuaría evitando el daño a la membrana, resultando en una mayor viabilidad y supervivencia de los ovocitos (Cetica et al., 2001).

La vitamina E, permitiría aumentar el número de embriones bovinos que alcanzan el estadio de blastocisto expandido (Olson & Seidel, 2000). Tao et al. (2004) indicaron que la adición de vitamina C y E como antioxidantes en ovocitos porcinos facilita y promueve la maduración meiótica de los ovocitos; además alfa-tocoferol (Vitamina E) actúa reduciendo el daño producido por las especies reactivas del oxígeno mediante la captura de radicales peróxidos de lípidos. Won-Jun Choi et al. (2007) realizaron un estudio donde sugieren que el ácido ascórbico previene el daño a los microtubulos producido por las especies reactivas del oxígeno(Choi et al., 2007)()

Ali et al. (2003) realizaron estudios en ovocitos bovinos suplementados con cisteína como antioxidante. Sus resultados indican que la adición de este suplemento favoreció la maduración del ovocito, en especial en el desarrollo de los estadios de morula y blastocisto. Entre los antioxidante enzimáticos se encuentra el SOD (superóxido dismutasa). En el mismo estudio se demostró que la adición de SOD favoreció el desarrollo de los embriones bovinos al estadio de blastocisto. Se cree que los efectos favorables son por la reducción de la incidencia de la apoptosis y de beneficios en el desarrollo embrionario.

2.5. Suplementación con melatonina como antioxidante:

La melatonina es una hormona multifuncional producida en la glándula pineal de los vertebrados. Diversos estudios han reportado que esta hormona ayudaría a disminuir los niveles de ROS en sistemas de cultivo *in vitro* mediante estimulación del sistema antioxidante del glutatión (GSH), inhibición de enzimas oxidativas en las células y órganos, reducción de la ruptura del ADN y la peroxidación lipídica en espermatozoides, protección de los ovocitos del daño producido por radicales libres, y mejoramiento de la maduración citoplasmática y nuclear de los ovocitos (Danilova et al., 2004; Galano et al., 2013; Papis et al., 2007; Tamura et al., 2008). Además, puede mejorar los resultados de fecundación *in vitro* de ovocitos de roedores, mejorar el desarrollo embrionario y aumentar el número de recuento de blastocistos (Hemadi et al., 2009; Reiter et al., 2009).

Zhan et al. (2016) comprobaron que la suplementación con 10^{-9} mol/L de melatonina en el medio de vitrificación en embriones de ratones vitrificados, aumentó la tasa de blastocistos y favoreció el desarrollo de los embriones de 2 a 4 células, mientras que concentraciones de 10^{-6} y 10^{-12} mol/L no favorecieron el desarrollo.

Soto-heras et al. (2018) llevaron a cabo un estudio donde compararon los efectos de la melatonina y la cisteamina como antioxidantes en embriones provenientes de ovocitos de cabra que fueron madurados en condiciones *in vitro*. El grupo tratado con melatonina fue el que obtuvo la mayor tasa de formación de blastocisto, en comparación a los tratados con cisteamina y al grupo sin antioxidantes. Tanto el grupo tratado con melatonina como el tratado con cisteamina presentaron niveles menores de ROS con respecto al grupo de control.

Además del efecto antioxidante de la melatonina, la misma activa enzimas antioxidantes, como la catalasa, el SOD, entre otras) mediante la regulación epigenética

del genoma (Zapico & Montes, 2005). También mejora la funcionalidad de la mitocondria del ovocito, aumentando la producción de ATP (Song et al., 2016).

En un estudio con ovocitos vitrificados de ratones suplementados con melatonina concluyeron que una concentración de 10^{-7} mol/L. que mejoró la regulación del potencial de la membrana celular, el contenido de ATP, disminuyó la concentración de ROS y aumentó la concentración del antioxidante enzimático GSH. Por lo tanto, la maduración *in vitro* de los ovocitos vitrificados fue mayor. También, la suplementación con melatonina al 10^{-7} mol/L mejoró la morfología del citoesqueleto durante la meiosis (Wu et al., 2019)

En un estudio acerca de la suplementación con melatonina sobre ovocitos vitrificados bovinos se encontró que el estrés oxidativo causado por el aumento de especies reactivas del oxígeno (ROS) genera un aumento en el ingreso de cationes de calcio (Ca^{+2}) al citoplasma y a la vez a la mitocondria. Esto aumentó el metabolismo mitocondrial, generando aún más ROS, por lo tanto mayores niveles de estrés oxidativo. En los ovocitos suplementados con melatonina se redujeron los niveles de ROS, por consecuencia disminuyeron los niveles de cationes de calcio (Ca^{+2}) (Zhao et al., 2016).

Hasta la fecha, no se han realizado estudios sobre el efecto de la suplementación con melatonina en la producción de embriones *in vitro* de la especie equina. Tampoco se reportaron estudios acerca del efecto de la melatonina post-vitrificación de los ovocitos. En base a los estudios previamente citados, donde se demuestra que la vitrificación resulta en un aumento de las ROS en los ovocitos de otras especies, el objetivo general del presente trabajo es estudiar el efecto de la suplementación con melatonina en el medio de maduración *in vitro* de ovocitos equinos vitrificados inmaduros.

Hipótesis:

La suplementación con melatonina en el medio de maduración de ovocitos vitrificados en vesícula germinal disminuiría las ROS y los daños producidos por estas, y mejoraría la tasa de maduración de los ovocitos y su viabilidad.

Objetivo general

Estudiar el efecto de agregado de melatonina al medio de maduración *in vitro* de ovocitos equinos vitrificados inmaduros.

Objetivos específicos

- Comparar el desarrollo embrionario post-ICSI de ovocitos con y sin suplementación de melatonina.
- Evaluar la viabilidad post transferencia a receptoras sincronizadas de los embriones producidos a partir de ovocitos con y sin suplementación de melatonina.

Materiales y métodos

Los ovocitos equinos utilizados fueron obtenidos de ovarios de yeguas de un frigorífico de nombre Lamar SA. situado en la ciudad de Mercedes a aproximadamente 1 hora de distancia del Laboratorio de Biotecnología y Reproducción Animal. El traslado de los ovarios se realizó en una conservadora isotérmica a temperatura ambiente, buscando que el tiempo desde la faena hasta el procesamiento sea menor de 4 horas.

Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron colocados en un colador metálico y se les extrajo la membrana ovárica utilizando tijeras esterilizadas; esto se realiza para facilitar la visualización de cada folículo (Figura 2). Luego, fueron lavados repetidas veces utilizando una solución salina (NaCl) al 8% para poder eliminar restos de tejidos y sangre. Posteriormente se colocaron en un baño con la misma solución dentro de vasos de



precipitado de 2 litros. La solución se atemperó a 32°C antes de colocar los ovarios.



Figura 2: Identificación de folículos luego de haber retirado la membrana ovárica.

Para el procesamiento individual de los ovarios se utilizaron bandejas de vidrio, bisturís n°24 y curetas para hueso estériles. Los folículos seleccionados fueron de tamaño menor a 35mm y se les realizó un corte para descartar el líquido folicular y permitir el ingreso de la cureta de hueso. Se evitaron los folículos con sangre en el líquido folicular. Se realizaron 3 raspajes por folículo con el fin de aumentar la probabilidad de extraer el ovocito. Una vez raspados, se descargó el contenido de la cureta en un tubo tipo falcon de 50ml con 15ml de solución TALP (Bavister & Yanagimachi, 1977) y 2 μ L/ml de heparina sódica para evitar formación de coágulos.

Posteriormente, se realizó la búsqueda de los ovocitos. Esto se hizo en una placa de Petri de 100ml con ayuda de una grilla de búsqueda. Se colocó 1ml del pellet donde se encontraban los ovocitos junto a 4ml de solución TALP para diluir, clarificar e identificar más fácilmente los complejos cúmulus-ovocito (COCs). Con una lupa estereoscópica de 40X de magnificación, en un ambiente con baja intensidad lumínica, se seleccionaron los COCs según su calidad. Se buscaron COCs con un citoplasma intacto, homogéneo y dejando las capas de células del cúmulus. Se repitió la selección para toda la muestra obtenida. El exceso de células del cúmulus fue removido en un medio de Hapes-TALP utilizando un tip de 275 μ m y pipeteador de ovocitos Stripper® (Cooper Surgical, USA). Por último, fueron transferidos a microtubos de centrifuga de 2ml con medio de holding a 22°C por 15hs.

Vitrificación y calentamiento de ovocitos

A continuación se realizó la vitrificación de los ovocitos y el calentamiento de los mismos utilizando un protocolo de 3 pasos adaptado de Lane et al. (1999). Se utilizaron cajas de Petri Universal GPS® (LifeGlobal, Cooper Surgical, EEUU) con pocillos cóncavos para sumergir a los ovocitos en las distintas soluciones de vitrificación y calentamiento. En la Tabla 1 se detallan las tres soluciones por las que pasaron los ovocitos secuencialmente así como el volumen utilizado y los tiempos de exposición. Todas las soluciones de vitrificación y calentamiento fueron formuladas con la misma solución base, compuesta por un medio para cultivo de células (Medio 199) y 20% de suero fetal bovino.

Tabla 1: 3 pasos para la vitrificación de ovocitos.

Solución de vitrificación	Dimetil-Sulfóxido (DMSO)	Etilen-Glicol	Trehalosa	Volumen	Tiempo de exposición
VS1 (23°C)	5% (0,7M)	5% (0,9M)	-	100µL	45 segundos
VS2 (23°C)	10% (1,4M)	10% (1,8M)	-	100µL	45 segundos
VS3 (23°C)	20% (2,8M)	20% (3,6M)	0,65M	100µL	30 segundos

Para mover a los ovocitos por las distintas soluciones se utilizaron pipetas Pasteur de borosilicato, adosadas a un filtro de 0,22µm y a una boquilla. Como dispositivo de vitrificación se utilizó el Cryotop®. Se introdujeron de a 5 ovocitos por dispositivo con una mínima cantidad de solución de vitrificación VS3. El Cryotop® fue sumergido de manera rápida en nitrógeno líquido. Los ovocitos vitrificados se mantuvieron al menos 7 días a -196°C antes de ser removidos.

El calentamiento de los ovocitos se realizó en placas Cryotec® (USCryotec, EEUU). Una vez calentados, los ovocitos fueron movidos secuencialmente por las soluciones de calentamiento detalladas en la Tabla 2 para lograr la dilución de los crioprotectores. Tanto los ovocitos vitrificados y calentados como los no vitrificados, se dejaron 90 minutos en medio de cultivo sin hormonas, a 38,2°C, con una atmósfera húmeda gaseada con 6% de CO2 para que el citoesqueleto y las organelas se estabilicen.

Tabla 2: 3 pasos para el calentamiento de ovocitos.

Solución de calentamiento	Trehalosa	Volumen	Tiempo de exposición
WS1 (38°C)	0,25M	1800µL	1 minuto
WS2 (38°C)	0,19M	100µL	1 minuto
WS3 (38°C)	0,125M	100µL	1 minuto

Maduración *in vitro*, ICSI y cultivo embrionario

La maduración *in vitro* fue realizada en un medio desarrollado para el cultivo de células (Medio 199) al que se le agregó insulina-transferrina-selenio, 1mM de piruvato de sodio, 100mM de cisteamina, 0.1mg/mL de FSH (Folltropin-V; Vetoquinol, EEUU) y 25mg/mL de gentamicina (Antibiótico). Se maduraron en grupos de hasta 10 COCs por cada 100ml. Los COCs fueron incubados durante 28hs a 38.2°C en atmósfera controlada con humedad y 6% de CO₂.

Los ovocitos que extruyeron el primer corpúsculo polar fueron considerados maduros (Figura 4). El semen utilizado para la Inyección Intracitoplasmática (ICSI) provino de un padrillo probado con éxito en esta técnica. La pajuela, donde se encontraba congelado el semen, fue cortada bajo nitrógeno líquido y transferida a un tubo de centrifua junto con 3ml de solución TALP. El semen se mantuvo a temperatura ambiente por 25 minutos evitando el contacto lumínico para que recuperen la motilidad. Se extrajo 1µL de la solución con el semen y se añadió a una gota de 3µL de una solución específica para micromanipulación (PVP al 7% ,Sage, Cooper Surgical, USA). La inyección fue realizada utilizando un microscopio invertido Nikon Ti-U con micromanipuladores y microinyectores Narishige. Los ovocitos maduros se ubicaron en gotas de 100 µL de TALP y con ayuda de una micropipeta de 7 µm (diámetro externo) se inyectó un espermatozoide.

Al 5to día del cultivo *in vitro* se renovó el medio, los ovocitos sin fertilizar se descartaron; aquellos que presentaban 16 o más blastómeras y los que evidenciaban fragmentación citoplasmática fueron registrados. Para clasificar a los embriones se utilizó una escala de 1 a 4 (Tabla 3); únicamente aquellos de grado 1 y 2 fueron transferidos a receptoras sincronizadas.

Tabla 3: Clasificación de embriones.

Grado 1	<ul style="list-style-type: none"> • Blastocistos simétricos, de color homogéneo y con una cavidad blastocística notable. • Una capa del trofotodermo reflectiva. • Ausencia de fragmentación citoplasmática. • Zona pelúcida delgada.
Grado 2	<ul style="list-style-type: none"> • Incluye a los blastocistos con forma irregular, leve fragmentación citoplasmática. • Menor evidencia de la capa del trofotodermo.
Grado 3	<ul style="list-style-type: none"> • Embriones con gránulos citoplasmáticos. • Gran espacio perivitelino. • Ausencia del trofotodermo.
Grado 4	<ul style="list-style-type: none"> • Embriones con fragmentación citoplasmática. • Ausencia del trofotodermo.

- | | |
|--|---|
| | <ul style="list-style-type: none">• Zona pelucida dañada. |
|--|---|

Experimento 1- Maduración *in vitro* de ovocitos con y sin suplementación con melatonina

Para la suplementación con melatonina se utilizó melatonina M5250 preparada en conjunto con el medio de cultivo de células 199 (Figura 3). Esta preparación se agregó al medio de maduración de los ovocitos a una concentración de 10^{-9} M. Ante la limitada disponibilidad de ovocitos para realizar un ensayo de toxicidad preliminar, se utilizó una concentración de melatonina previamente probada en la especie bovina (Tian et al., 2014). Los COCs recuperados (452) fueron asignados de manera aleatoria a alguno de los tratamientos descritos en la Tabla 4.



Figura 3. Melatonina en polvo M5250 Sigma

Tabla 4: Tratamientos de suplementación con melatonina durante la maduración.

Vitrificado : - Melatonina: -	n=137
Vitrificado: - Melatonina: +	n=100
Vitrificado: + Melatonina: -	n=106
Vitrificado: + Melatonina: +	n=110

Experimento 2 - Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y cultivo *in vitro* embrionario

Los cigotos fueron cultivados en un medio compuesto por DMEM-F12, Global Total (Dos medios de cultivos celulares en una relación 54:40) con 6% de suero fetal bovino (GE Healthcare HyClone™ Fetal Bovine), 0.1mM de piruvato de sodio y 10mg/mL de gentamicina. Se incubaron en una incubadora de CO₂ a una temperatura de 38.2°C con una composición atmosférica de 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂. En la Tabla 5 se detallan el número de ovocitos maduros que fueron asignados al experimento 2. La viabilidad de los embriones fue evaluada mediante la transferencia a 19 yeguas receptoras sincronizadas asignadas al experimento; el procedimiento fue realizado en el Haras El Dok por veterinarios entrenados.

Tabla 5: Embriones seleccionados.

Vitrificado : - Melatonina: -	n=65
Vitrificado: - Melatonina: +	n=73
Vitrificado: + Melatonina: -	n=59
Vitrificado: + Melatonina: +	n=57

Análisis estadístico

Para el análisis de los efectos de la suplementación con melatonina en la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos, el desarrollo embrionario y su viabilidad se utilizó el modelo probit con una distribución binomial del error. El modelo lineal generalizado fue realizado con el software InfoStat (Version 2020, Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) con un nivel de significancia estadística de P<0.05.

Resultados

Experimento 1

En la Tabla 6 se puede observar que, por un lado, la vitrificación no produjo una disminución en el porcentaje de ovocitos madurados (Figura 4). Por otro lado, los grupos suplementados con melatonina (65% para los no vitrificados y 54% para los no vitrificados) no muestran una diferencia significativa con respecto a los no suplementados (53% para los no vitrificados y 54% para los vitrificados). Si bien se observó una tendencia de aumento en el porcentaje de ovocitos maduros del grupo No vitrificado pero suplementado con melatonina en comparación al Control -, la diferencia no fue significativa estadísticamente ($p=0.19$).

Tabla 6: Resultados de maduración *in vitro* de ovocitos vitrificados y no vitrificados, sin suplementar y suplementados con melatonina.

Grupo	n	Maduros	Lisados
Vitrificado : - Melatonina: -	137	73 (53%)	64 (47%)
Vitrificado : - Melatonina: +	100	65 (65%)	35 (35%)
Vitrificado : + Melatonina: -	106	57 (54%)	69 (46%)
Vitrificado : + Melatonina: +	110	59 (54%)	51 (46%)

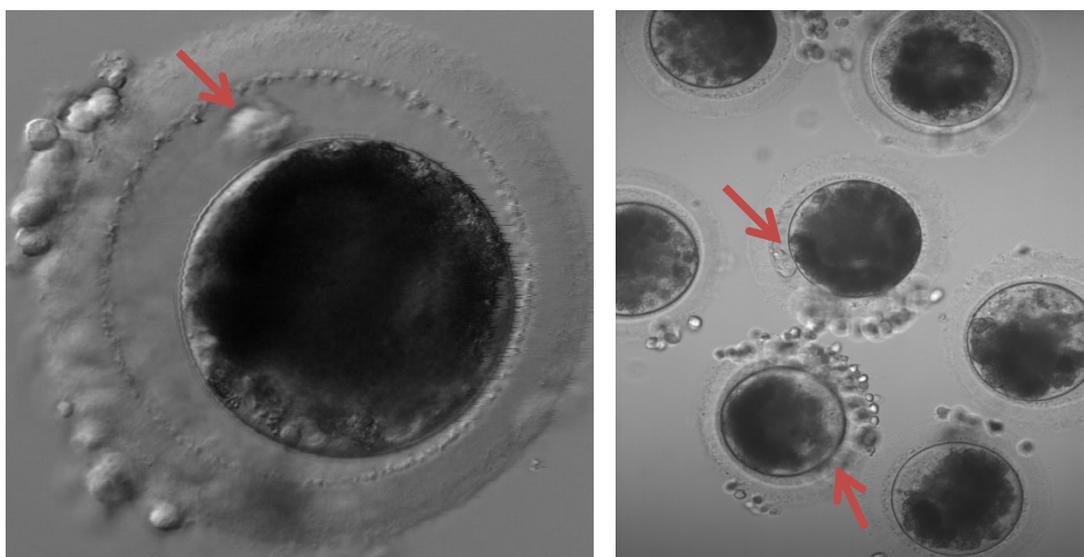


Figura 4. Imágenes obtenidas por el autor correspondiente a ovocitos en estadio de MII luego de 28 hs de maduración *in vitro* en presencia de 10^{-9} Mol de melatonina. A) Ovocito del grupo vitrificado

melatonina; B) Ovocitos del grupo control con melatonina. Las flechas indican los corpúsculos polares, signos de que se encuentran en estadio de MII.

Experimento 2

En la Tabla 7 se observa que dentro de los grupos de ovocitos no vitrificados, la suplementación con melatonina no muestra diferencia significativa en lo que respecta al porcentaje de clivaje. Tampoco hubo diferencias significativas entre el grupo suplementados con melatonina y el grupo sin suplementar en ovocitos vitrificados respecto al porcentaje de clivaje.

En los grupos de ovocitos no vitrificados la suplementación con melatonina no tuvo efecto en la tasa de blastocistos (26% para los no suplementados y 29% para los suplementados con melatonina). Tampoco se presentaron diferencias significativas en los grupos de ovocitos vitrificados, en lo que respecta la tasa de blastocistos (Figura 5).

Tabla 7: Resultados Post-ICSI de embriones.

Grupo	n (Inyectados)	Clivaje	Blastocistos (/Inyectados)	Receptoras	Preñeces
Vitrificado:- Melatonina: -	73	56 (77%) a	19 (26%) a	6	5 (83%)
Vitrificado: - Melatonina: +	65	49 (75%) a	19 (29%) a	4	2 (50%)
Vitrificado: + Melatonina: -	57	26 (46%) b	5 (8%) b	3	1 (33%)
Vitrificado: + Melatonina: +	59	36 (61%) ab	9 (15%) ab	6	1 (17%)

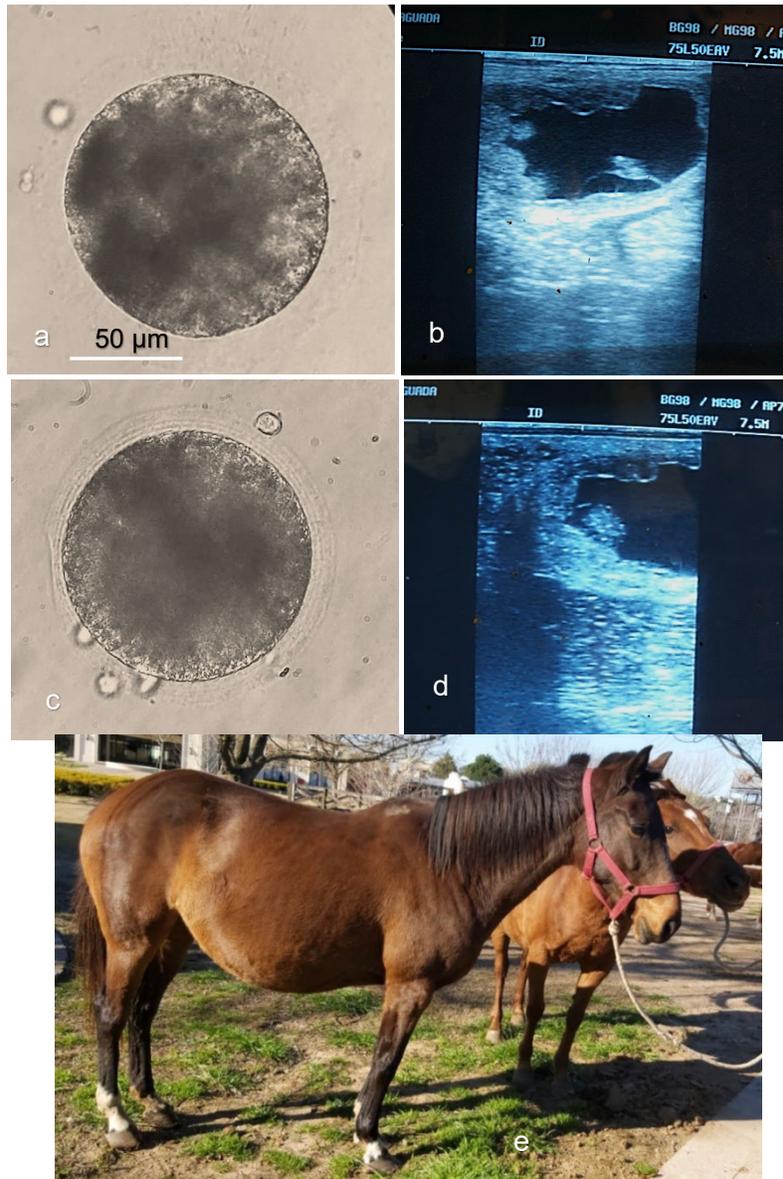


Figura 5: Día 7 Post-ICSI. Blastocistos provenientes de ovocitos vitrificados que fueron transferidos a yeguas receptoras. A) Blastocisto de grado 2 de ovocito vitrificado y suplementado con melatonina. B) Imagen del ultrasonido que confirma la preñez después de la transferencia del mismo embrión a una yegua sincronizada. C) Blastocisto de grado 2 de ovocito vitrificado sin suplementar con melatonina. D) Confirmación de preñez con ultrasonido. E) Yegua receptora en el día 270 de la preñez del embrión de ovocito vitrificado y suplementado con melatonina. FUENTE: Clérico et al., 2021

Discusión:

El aumento de niveles de ROS en ovocitos afecta la funcionalidad de la mitocondria, compromete los niveles de calcio dentro de la misma y por consecuencia afecta la viabilidad del ovocito, afectando la tasa de desarrollo (Ortiz-Escribano et al., 2018).

La concentración de melatonina utilizada en estos experimentos fue de 10-9mol/L, la cual fue comprobada ser óptima en otros estudios, como por ejemplo el de Zhan et al. (2016) que trabajó sobre embriones de ratones vitrificados. En un trabajo realizado por Wu et al. (2019), sobre la suplementación de melatonina en ovocitos vitrificados de ratones y madurados *in vitro*, la concentración con la cual obtuvieron mejores resultados fue la de 10-7mol/L. En otro estudio de Gao et al., (2012) sobre embriones vitrificados y madurados *in vitro* de ratones se comprobó que altas dosis de melatonina suplementada durante la maduración (10-3mol/L) resultó contraproducente, disminuyendo la tasa de blastocistos. Estas observaciones podrían indicar que los efectos de la melatonina dependen de la dosis de la misma. En estos experimentos no se realizó un trabajo previo para encontrar la concentración óptima de melatonina para ovocitos equinos. En futuros estudios se podría realizar una prueba preliminar, quizás esta concentración no es óptima.

Soto-heras et al. (2018) llevaron a cabo un estudio donde compararon los efectos de la melatonina y la cisteamina como antioxidantes en embriones provenientes de ovocitos de cabra que fueron madurados en condiciones *in vitro*. El grupo tratado con melatonina fue el que obtuvo la mayor tasa de formación de blastocisto, en comparación a los tratados con cisteamina y al grupo sin antioxidantes. Tanto el grupo tratado con melatonina como el tratado con cisteamina presentaron niveles menores de ROS con respecto al grupo de control.

Se reportó que la suplementación con melatonina en ovocitos de cabra madurados *in vitro* tuvo como resultado una mayor tasa de blastocistos en comparación al grupo control y al grupo tratado con cisteamina. En nuestro estudio, los ovocitos vitrificados y suplementados con melatonina tuvieron una tasa de clivaje (61%, 75%, 77%) y tasa de blastocisto (15%, 29% y 26%) similar a los no vitrificados, melatonina (+) y melatonina (-). Estas observaciones indicarían los beneficios aportados por la melatonina en reducir los daños de la vitrificación y favorecer el desarrollo embrionario a partir de ovocitos equinos vitrificados.

El número de ovocitos lisados es menor en los grupos tratados con melatonina, en comparación a los no suplementados con melatonina, tanto para los vitrificados como para los no vitrificados. Estos resultados podrían ser explicados debido a los beneficios de la suplementación con melatonina en ovocitos reportados en otros estudios como la estimulación del antioxidante del glutatión (GSH) que llevaría a una reducción en los niveles perjudiciales de ROS y una menor apoptosis. Otro beneficio reportado de la melatonina es la de proteger a los ovocitos del daño producido por los radicales libres. Esta observación sumada a la reducción en la tasa de lisados del grupo no vitrificado pero suplementado con melatonina, en comparación al grupo no suplementado, podría indicar una mejor supervivencia debido a la suplementación.

Los niveles de clivaje y tasa de blastocistos, en el grupo vitrificado y suplementado con melatonina, no presentaron diferencias significativas en comparación a los controles sin vitrificar. Esto podría indicar una mejora del desarrollo embrionario de ovocitos vitrificados, lo cual coincide con las observaciones de Zhang et al. (2016) para ovocitos de cerdos vitrificados.

Los porcentajes de preñez varían en porcentaje pero no presentan diferencia significativa. Dentro de los grupos suplementados con melatonina, los tratamientos sin vitrificar y vitrificados presentaron menores porcentajes de preñez (50% y 17% respectivamente) en comparación a los grupos sin suplementar, vitrificados y no vitrificados (33% y 83% respectivamente). Uno de los factores que podría estar afectando los porcentajes de preñeces es el bajo número de n. Por otro lado, los menores porcentajes de preñez en los grupos vitrificados, en comparación a su contraparte sin vitrificar, coincide con los resultados de Ortiz-Escribano et al., donde el logro de una preñez se ve comprometida por la vitrificación de ovocitos inmaduros.

Conclusión

En base a los resultados e información obtenida en este trabajo se concluye que la suplementación con melatonina sobre ovocitos que fueron vitrificados mejoró el desarrollo embrionario post-ICSI.

Debido a la reducción del número de ovocitos lisados en los grupos tratados con melatonina, con respecto a los no tratados, se puede concluir que la melatonina favoreció a la reducción de niveles de ROS por lo tanto, mejoró la viabilidad de los mismos.

Como resultado de uno de los ovocitos vitrificados y suplementados con melatonina se obtuvo un potrillo (Figura 6). Hasta la fecha, es el primer reporte del uso de la melatonina en el cultivo *in vitro* e ICSI en equinos. También es el primer intento en mejorar el desarrollo embrionario de ovocitos vitrificados que resultó en dos crías. Para obtener mejores resultados con respecto al efecto de la melatonina en el porcentaje de preñez, es necesario que se hagan más estudios con una mayor cantidad de receptoras.



Figura 6. Potrillo (izquierda) y potranca (derecha) nacidos a partir de ovocitos vitrificados. El potrillo de un ovocito suplementado con melatonina y la potranca de un ovocito sin suplementar.

Bibliografia:

- Adams, G. P., Ratto, M. H., Collins, C. W., & Bergfelt, D. R. (2009). Artificial insemination in South American camelids and wild equids. *Theriogenology*, *71*(1), 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.005>
- Agarwal, A., Gupta, S., Sekhon, L., & Shah, R. (2008). Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: From molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants and Redox Signaling*, *10*(8), 1375–1403. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1964>
- Agarwal, A., Said, T. M., Bedaiwy, M. A., Banerjee, J., & Alvarez, J. G. (2006). Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertility and Sterility*, *86*(3), 503–512. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.02.088>
- Ambekar, A.S., Nirujogi, R.S., Srikanth, S.M., Chavan, S., Kelkar, D.S., Hinduja, I., Zaveri, K., Prasad, T.S.K., Harsha, H.C., Pandey, A., Mukherjee, S., 2013. Proteomic analysis of human follicular fluid: a new perspective towards understanding folliculogenesis. *J. Proteome* *87*, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.017>.
- Anchordoguy, T. J., Rudolph, A. S., Carpenter, J. F., & Crowe, J. H. (1987). Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, *24*(4), 324–331. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(87\)90036-8](https://doi.org/10.1016/0011-2240(87)90036-8)
- Baker, M. A., & Aitken, R. J. (2004). The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *216*(1–2), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.068>
- Bavister, B. D., & Yanagimachi, R. (1977). The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction*, *16*(2), 228–237. <https://doi.org/10.1095/biolreprod16.2.228>
- Catt, J. W., & Henman, M. (2000). Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Human Reproduction*, *15*(SUPPL. 2), 199–206. https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_2.199
- Choi, W. J., Banerjee, J., Falcone, T., Bena, J., Agarwal, A., & Sharma, R. K. (2007). Oxidative stress and tumor necrosis factor- α -induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure. *Fertility and Sterility*, *88*(4 SUPPL.), 1220–1231. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.02.067>
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F., Rudolph, A. S., Wistrom, C. A., Spargo, B. J., & Anchordoguy, T. J. (1988). Interactions of sugars with membranes. *BBA - Reviews on Biomembranes*, *947*(2), 367–384. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(88\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0304-4157(88)90015-9)
- D. Cetica, L. N. Pintos, G. C. Dalv, P. (2001). Antioxidant Enzyme Activity and Oxidative Stress in Bovine Oocyte In Vitro Maturation. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, *51*(1), 57–64. <https://doi.org/10.1080/15216540119253>
- Danilova, N., Krupnik, V. E., Sugden, D., & Zhdanova, I. V. (2004). Melatonin stimulates cell proliferation in zebrafish embryo and accelerates its development. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental*

Biology, 18(6), 751–753. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0544fje>

- De Coster, T., Velez, D. A., Van Soom, A., Woelders, H., & Smits, K. (2020). Cryopreservation of equine oocytes: Looking into the crystal ball. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(5), 453–467. <https://doi.org/10.1071/RD19229>
- Ducro, B. J., Schurink, A., Bastiaansen, J. W. M., Boegheim, I. J. M., van Steenbeek, F. G., Vos-Loohuis, M., Nijman, I. J., Monroe, G. R., Hellinga, I., Dibbits, B. W., Back, W., & Leegwater, P. A. J. (2015). A nonsense mutation in B3GALNT2 is concordant with hydrocephalus in Friesian horses. *BMC Genomics*, 16(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1936-z>
- Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H., 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 81–128. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6).
- Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S., 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat. Res.* 567, 1–61. <https://doi.org/10.1016/J.MRREV.2003.11.001>.
- Fujii, J., Iuchi, Y., Okada, F., 2005. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-43>
- Galano, A., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2013). On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *Journal of Pineal Research*, 54(3), 245–257. <https://doi.org/10.1111/jpi.12010>
- Galli, C., Colleoni, S., Duchi, R., Lagutina, I., & Lazzari, G. (2013). Equine assisted reproduction and embryo technologies. *Anim. Reprod*, 10(3), 334–343.
- Gao, C., Han, H. B., Tian, X. Z., Tan, D. X., Wang, L., Zhou, G. Bin, Zhu, S. E., & Liu, G. S. (2012). Melatonin promotes embryonic development and reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos. *Journal of Pineal Research*, 52(3), 305–311. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00944.x>
- Guérin, P., El Mouatassim, S., & Ménézo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*, 7(2), 175–189. <https://doi.org/10.1093/humupd/7.2.175>
- Gutnisky, C., Morado, S., Gadze, T., Donato, A., Alvarez, G., Dalvit, G., & Cetica, P. (2020). Morphological, biochemical and functional studies to evaluate bovine oocyte vitrification. *Theriogenology*, 143, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.037>
- Halliwell, B., 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr. Rev.* 70, 257–265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>.
- Hart, R., & Walls, M. (2018). In vitro maturation of oocytes. *Encyclopedia of Reproduction*, 56(3), 159–162. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64855-9>
- Hemadi, M., Abolhassani, F., Akbari, M., Sobhani, A., Pasbakhsh, P., Ährlund-Richter, L., Modaresi, M. H., & Salehnia, M. (2009). Melatonin promotes the cumulus-oocyte complexes quality of vitrified-thawed murine ovaries; with increased mean number of

follicles survival and ovary size following heterotopic transplantation. *European Journal of Pharmacology*, 618(1–3), 84–90.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.07.018>

Inoue, M., Sato, E. F., Nishikawa, M., Park, A.-M., Kira, Y., Imada, I., & Utsumi, K. (2005). Mitochondrial Generation of Reactive Oxygen Species and its Role in Aerobic Life. *Current Medicinal Chemistry*, 10(23), 2495–2505.
<https://doi.org/10.2174/0929867033456477>

Kala, M., Shaikh, M.V., Nivsarkar, M., 2017. Equilibrium between anti-oxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. *Reprod. Med. Biol.* 16, 28–35. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12013>.

Karaman Öztürk, E., Demir, K., Arici, R., Birler, S., Pabuccuoğlu, S., & Evecen, M. (2016). Effect of different cooling rates on embryo survivability and pregnancy rates in freezing sheep embryos. *Istanbul Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 42(2), 150–155. <https://doi.org/10.16988/iuvfd.2016.74824>

Karja, N. W. K., Kikuchi, K., Fahrudin, M., Ozawa, M., Somfai, T., Ohnuma, K., Noguchi, J., Kaneko, H., & Nagai, T. (2006). Development to the blastocyst stage, the oxidative state, and the quality of early development stage of porcine embryos cultured in alteration of glucose concentrations in vitro under different oxygen tensions. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-54>

Lane, M., Schoolcraft, W. B., Gardner, D. K., & Phil, D. (1999). Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and Sterility*, 72(6), 1073–1078. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00418-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00418-5)

Leegwater, P. A., Vos-Loohuis, M., Ducro, B. J., Boegheim, I. J., Steenbeek, F. G., Nijman, I. J., Monroe, G. R., Bastiaansen, J. W. M., Dibbits, B. W., Goor, L. H., Hellinga, I., Back, W., & Schurink, A. (2016). Dwarfism with joint laxity in Friesian horses is associated with a splice site mutation in B4GALT7. *BMC Genomics*, 17(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3186-0>

Li, Y., Wang, J., Zhang, Z., Yi, J., He, C., Wang, F., Tian, X., Yang, M., Song, Y., He, P., & Liu, G. (2016). Resveratrol compares with melatonin in improving in vitro porcine oocyte maturation under heat stress. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0093-9>

Liu, L., Trimarchi, J. R., & Keefe, D. L. (2000). Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. *Biology of Reproduction*, 62(6), 1745–1753. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.6.1745>

Mazur, P. (1990). Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophysics*, 17(1), 53–92.
<https://doi.org/10.1007/BF02989804>

Olson, S. E., & Seidel, G. E. (2000). Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biology of Reproduction*, 62(2), 248–252. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.2.248>

Ortiz-Escribano, N., Bogado Pascottini, O., Woelders, H., Vandenberghe, L., De

- Schauwer, C., Govaere, J., Van den Abbeel, E., Vullers, T., Ververs, C., Roels, K., Van De Velde, M., Van Soom, A., & Smits, K. (2018). An improved vitrification protocol for equine immature oocytes, resulting in a first live foal. *Equine Veterinary Journal*, 50(3), 391–397. <https://doi.org/10.1111/evj.12747>
- Papis, K., Poleszczuk, O., Wenta-Muchalska, E., & Modlinski, J. A. (2007). Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration. *Journal of Pineal Research*, 43(4), 321–326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00479.x>
- Park, S.Y., Yoon, S.J., Hakomori, S. itiroh, Kim, J.M., Kim, J.Y., Bernert, B., Ullman, T., Itzkowitz, S.H., Kim, J.H., 2010. Dimeric Le(a) (Le(a)-on-Le(a)) status of beta-haptoglobin in sera of colon cancer, chronic inflammatory disease and normal subjects. *Int. J. Oncol.* 36, 1291–1297. <https://doi.org/10.3892/ijo>.
- Partonen, T., & Lönnqvist, J. (1993). Effects of light on mood. *Annals of Medicine*, 25(4), 301–302. <https://doi.org/10.3109/07853899309147287>
- Preis, K. A., Seidel, G. E., & Gardner, D. K. (2007). Reduced oxygen concentration improves the developmental competence of mouse oocytes following in vitro maturation. *Molecular Reproduction and Development*, 74(7), 893–903. <https://doi.org/10.1002/mrd.20655>
- Production, U., Piglets, O. F., From, D., Oocytes, M., & Using, V. (2015). *Uccessful production of piglets derived from mature oocytes vitrified using*. 36(1), 8–18.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Mayo, J. C., & Sainz, R. M. (2009). Melatonin and reproduction revisited. *Biology of Reproduction*, 81(3), 445–456. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075655>
- Shaw, J. M., & Jones, G. M. (2003). Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*, 9(6), 583–605. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg041>
- Smits, K., Hoogewijs, M., Woelders, H., Daels, P., & Van Soom, A. (2012). Breeding or assisted reproduction? Relevance of the horse model applied to the conservation of endangered equids. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(SUPPL.4), 239–248. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02082.x>
- Somfai, T., Ozawa, M., Noguchi, J., Kaneko, H., Kuriani Karja, N. W., Farhudin, M., Dinnyés, A., Nagai, T., & Kikuchi, K. (2007). Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. *Cryobiology*, 55(2), 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.06.008>
- Song, C., Peng, W., Yin, S., Zhao, J., Fu, B., J., Mao, T., Wu, H., & Zhang, Y. (2016). Melatonin improves age-induced fertility decline and attenuates ovarian mitochondrial oxidative stress in mice. *Scientific Reports*, 6(October), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep35165>
- Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Taketani, T., Matsuoka, A., Yamagata, Y., Shimamura, K., Morioka, H., Ishikawa, H., Reiter, R. J., & Sugino, N. (2008). Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects

- oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*, 44(3), 280–287. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00524.x>
- Tian, X. Z., Wang, F., He, C. J., Zhang, L., Tan, D. X., Reiter, R. J., Xu, J., Ji, P. Y., & Liu, G. S. (2014). Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: A mechanistic approach. *Journal of Pineal Research*, 57(3), 239–247. <https://doi.org/10.1111/jpi.12163>
- Tomás-Zapico, C., & Coto-Montes, A. (2005). A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *Journal of Pineal Research*, 39(2), 99–104. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00248.x>
- Viana, J. (2020). 2019 Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. *Embryo Transfer Newsletter*, 38(4), 14–26.
- Wang, X., Falcone, T., Attaran, M., Goldberg, J. M., Agarwal, A., & Sharma, R. K. (2002). Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertility and Sterility*, 78(6), 1272–1277. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04236-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04236-X)
- Wu, Z., Pan, B., Qazi, I. H., Yang, H., Guo, S., Yang, J., Zhang, Y., Zeng, C., Zhang, M., Han, H., Meng, Q., & Zhou, G. (2019). Melatonin Improves In Vitro Development of Vitrified-Warmed Mouse Germinal Vesicle Oocytes Potentially via Modulation of Spindle Assembly Checkpoint-Related Genes. *Cells*, 8(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/cells8091009>
- Zhao, X. M., Du, W. H., Wang, D., Hao, H. S., Liu, Y., Qin, T., & Zhu, H. Bin. (2011a). Effect of cyclosporine pretreatment on mitochondrial function in vitrified bovine mature oocytes. *Fertility and Sterility*, 95(8), 2786–2788. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.089>
- Zhao, X. M., Du, W. H., Wang, D., Hao, H. S., Liu, Y., Qin, T., & Zhu, H. Bin. (2011b). Recovery of mitochondrial function and endogenous antioxidant systems in vitrified bovine oocytes during extended in vitro culture. *Molecular Reproduction and Development*, 78(12), 942–950. <https://doi.org/10.1002/mrd.21389>
- Zhao, X. M., Hao, H. S., Du, W. H., Zhao, S. J., Wang, H. Y., Wang, N., Wang, D., Liu, Y., Qin, T., & Zhu, H. Bin. (2016). Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes. *Journal of Pineal Research*, 60(2), 132–141. <https://doi.org/10.1111/jpi.12290>