

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Efecto del tratamiento de superovulación y de la edad de la coneja sobre parámetros de calidad ovocitaria

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: MARÍA PÉREZ GARCÍA

TUTORA: CARMEN NATURIL ALFONSO

Curso Académico: 2017/2018

VALENCIA, JULIO 2018

Título del TFG: Efecto del tratamiento de superovulación y de la edad de la coneja sobre parámetros de calidad ovocitaria.

Alumna: María Pérez García

Tutora Académica: Carmen Naturil Alfonso

Valencia, Julio 2018

Resumen: Uno de los factores más importantes que afectan a la infertilidad femenina es la baja calidad ovocitaria. Factores tales como la edad, la nutrición o los tratamientos de superovulación son determinantes tanto en el número como en la calidad de los ovocitos obtenidos. La superovulación, es una de las técnicas más utilizadas en biotecnología reproductiva para aumentar la cantidad de óvulos que pueden ser recogidos por hembra donante. Sin embargo, una de las limitaciones de este tipo de tratamientos es la respuesta impredecible del ovario y el impacto que puede suponer en la tasa de fecundación y el desarrollo embrionario. Por su parte, existen diversos marcadores de calidad ovocitaria, tales como la expresión génica, morfología o la determinación basal de hormonas en suero que suponen una herramienta útil para evaluar la viabilidad, la calidad y la competencia de los ovocitos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar de qué manera afectan los tratamientos de superovulación y factores como la edad sobre la calidad ovocitaria. Para ello, en un primer experimento se determinó la respuesta ovulatoria al tratamiento de superovulación y se analizó la expresión de los genes MSY2, MATER, ITPR1, ITPR2, ITPR3, eIF4E, PAR1, PAPOL-A, PAPOL-G, ZAR1 y YY1, siendo estos genes marcadores para la maduración, desarrollo y activación de los ovocitos. Además, para corroborar los resultados obtenidos en el primer experimento, se realizó un segundo experimento en el que se analizó la tasa de implantación y viabilidad de embriones de hembras superovuladas tanto nulíparas como multíparas transferidos a hembras primíparas.

Los resultados obtenidos mostraron una respuesta ovulatoria superior en hembras superovuladas nulíparas, frente al resto de grupos experimentales, aunque el grupo experimental de hembras superovuladas multíparas también mostró una respuesta favorable. Por su parte, también se encontraron diferencias significativas entre los óvulos provenientes de hembras control y los óvulos provenientes de hembras superovuladas en cuanto a expresión génica se refiere. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre óvulos provenientes de hembras multíparas y nulíparas superovuladas. Finalmente, también se observaron diferencias significativas entre el grupo de hembras control y el grupo de hembras superovuladas en cuanto a la tasa de implantación y porcentaje de viabilidad se refiere, siendo aquellas hembras control nulíparas las que mostraron mejores resultados.

Palabras clave: superovulación, edad, calidad ovocitaria, expresión génica, tasa de implantación, viabilidad embrionaria, conejo.

Title: Effect of superovulation treatment and age of the rabbit doe on oocyte quality parameters.

Abstract: One of the most important factors that affect female infertility is the low oocyte quality. Factors such as age, nutrition and superovulation treatments are determinant both in the number and quality of the oocytes obtained. Superovulation is one of the most used techniques in reproductive biotechnology to increase the number of oocytes that can be collected by donor female. However, one of the limitations of this type of treatments is the unpredictable response of the ovary and the impact it can have on the rate of fertilization and embryonic development. On the other hand, there are several oocyte quality markers, such as genetic expression, morphology or the basic determination of hormones in serum, which are a useful tool to assess the viability, quality and the competence of oocytes.

The objective of this work was to evaluate how superovulation treatments and factors such as age on oocyte quality. In a first experiment, the ovulation response to the ovulation treatment was determined, and the expression of the MSY2, MATER, ITPR1, ITPR2, ITPR3, eIF4E, PAR1, PAPOL-A, PAPOL-G, ZAR1 and YY1 genes were analyzed. These genes are markers for maturation, development and activation of oocytes. In addition, to corroborate the results obtained in the first experiment, a second experiment was carried out in which the implantation and viability rate of embryos of superovulated females, both nulliparous and multiparous, were analyzed and transferred to primiparous females.

The results obtained showed a superior ovulatory response in superovulated nulliparous females, compared to the rest of the experimental groups, although the experimental group of multiparous superovulated females also showed a favorable response. On the other hand, significant differences were found between the ovules coming from control females and the ovules coming from superovulated females in relation to gene expression. However, no significant differences were found between ovules from multiparous females and superovulated nulliparous females. Finally, significant differences were also observed between the group of control females and the group of superovulated females in terms of implantation rate and percentage of viability, being those nulliparous control females the ones that showed the best results.

Key words: superovulation, age, oocyte quality, gene expression, implantation rate, embryonic viability, rabbit.

Títol: Efecte del tractament de superovulació i de l'edat de la conilla sobre paràmetres de qualitat ovocitaria.

Resum: Un dels factors més importants que afecten la infertilitat femenina és la baixa qualitat ovocitaria. Factors com ara l'edat, la nutrició o els tractaments de superovulació són determinants tant en el nombre com en la qualitat dels ovocits obtinguts. La superovulació, és una de les tècniques més utilitzades en biotecnologia reproductiva per a augmentar la quantitat d'òvuls que poden ser arreplegats per femella donant. No obstant això, una de les limitacions d'este tipus de tractaments és la resposta impredecible de l'ovari i l'impacte que pot suposar en la taxa de fecundació i el desenvolupament embrionari. Per la seua banda, hi ha diversos marcadors de qualitat ovocitaria, com ara l'expressió gènica, morfologia o la determinació basal d'hormones en sèrum que suposen una ferramenta útil per a avaluar la viabilitat, la qualitat i la competència dels ovocits.

L'objectiu d'este treball va ser avaluar de quina manera afecten els tractaments de superovulació i factors com l'edat sobre la qualitat ovocitaria. Per a això, en un primer experiment es va determinar la resposta ovulatòria al tractament d'ovulació i es va analitzar l'expressió dels gens MSY2, MATER, ITPR1, ITPR2, ITPR3, eIF4E, PAR1, PAPE-LA, PAPOL-G, ZAR1 i YY1, sent estos gens marcadors per a la maduració, desenvolupament i activació dels ovocits. A més, per a corroborar els resultats obtinguts en el primer experiment, es va realitzar un segon experiment en què es va analitzar la taxa d'implantació i viabilitat d'embrions de femelles superovulades tant nul·líparas com múltiples transferits a femelles primíparas.

Els resultats obtinguts van mostrar una resposta ovulatòria superior en femelles superovulades nul·líparas, enfront de la resta de grups experimentals, encara que el grup experimental de femelles superovulades múltiples també va mostrar una resposta favorable. Per la seua banda, també es van trobar diferències significatives entre els òvuls provinents de femelles control i els òvuls provinents de femelles superovulades en conte a expressió gènica es referix. No obstant això, no es van trobar diferències significatives entre òvuls provinents de femelles múltiples i nul·líparas superovulades. Finalment, també es van observar diferències significatives entre el grup de femelles control i el grup de femelles superovulades quant a la taxa d'implantació i percentatge de viabilitat es referix, sent aquelles femelles control nul·líparas les que van mostrar millors resultats.

Paraules claus: superovulació, edat, qualitat ovocitaria, expressió gènica, taxa d'implantació, viabilitat embrionària, conill.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que me han ayudado a conseguir llevar a cabo este trabajo. A todas ellas les quiero dar las gracias por dedicarle parte de su tiempo, ya que, sin su ayuda no hubiera sido posible.

En primer lugar, quiero darle las gracias a mi tutora Carmen, por estar siempre disponible para resolverme cualquier duda, y por todo el tiempo y dedicación puesto en este trabajo. También a José, por todos sus consejos, su dedicación y transmitirme su pasión por la investigación.

Gracias también a todas las personas del laboratorio, a Paco, David, Ximo, Luis, Marina y en especial a Amparo, por su infinita paciencia y dedicar más tiempo del que tenías para atender cualquier duda que surgiera.

Por supuesto, no podría olvidarme de ella. Gracias Ana, por hacer que las horas pasaran más deprisa. Por las risas y los agobios compartidos. Gracias por hacer que todo fuera mucho más fácil. ¡Tremendo combo el que formamos!

Gracias a Linda, por traernos un trocito de Italia al laboratorio y transmitirnos tu pasión por los animales.

Cómo no, gracias a mis compañeras y amigas biotecnólogas 'cósmicas', por ser tan iguales y a la vez tan diferentes a mí. Cuatro años dan para mucho. Horas de biblioteca y clases con muchos cafés de por medio, pero también viajes, fiestas y risas, muchas risas. Estos años no hubiesen sido lo mismo sin vosotras.

A mis conquenses de toda la vida, porque gracias a ellas, conocí lo que es la verdadera amistad.

Gracias a mi familia, a los que están y a los que, por desgracia, ya no. A mi hermana y en especial a mis padres. Gracias por confiar en mí de manera incondicional. Todo lo que he conseguido y conseguiré será siempre gracias a vosotros.

Finalmente, gracias a ti, Edu, por ser mi principal pilar de apoyo. Por entenderme, por hacerme reír y por cuidarme como lo haces. Gracias por hacerme tan feliz.

¡Muchas gracias a todos!

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.2 Conejo como modelo animal	1
1.1.1 Peculiaridades del conejo: anatomía y ovulación inducida.....	2
1.2 Tratamiento de superovulación	3
1.3 Factores que afectan a la calidad ovocitaria	4
1.3.1 Efecto de la superovulación.....	4
1.3.2 Efecto de la edad	5
1.3.3 Efecto de la maduración in vitro	6
1.3.4 Efecto de la nutrición y obesidad.....	7
1.4 Marcadores de calidad ovocitaria	7
1.4.1 Morfología.....	7
1.4.3 Determinación basal de hormonas en suero	8
1.4.3 Expresión génica	9
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
3.1 Diseño experimental.....	11
3.2 Animales	12
3.3 Tratamiento de superovulación	13
3.4 Experimento 1: Respuesta ovulatoria y expresión génica de los ovocitos.....	13
3.4.1 Recuperación de óvulos.....	13
3.4.2 Extracción de ARN mensajero.....	14
3.4.3 Cuantificación relativa mediante PCR en tiempo real (qPCR)	15
3.5 Experimento 2: Viabilidad de embriones de origen superovulado in vivo.....	16
3.5.1 Recuperación de embriones	16
3.5.2 Viabilidad embrionaria in vivo. Transferencia embrionaria.....	17
3.5.3 Viabilidad embrionaria: implantación embrionaria.....	19
3.6.4 Análisis estadístico	19
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1 Experimento 1: Análisis de la respuesta al tratamiento de superovulación	20
4.2 Experimento 1: Expresión génica de los ovocitos	20
4.3 Experimento 3: Análisis de viabilidad de embriones.....	25
5. CONCLUSIONES	27
6. BIBLIOGRAFÍA.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis en la coneja
Figura 2	Diseño experimental del experimento 1. Respuesta ovulatoria y expresión génica de los ovocitos
Figura 3	Diseño experimental del experimento 2. Viabilidad de embriones de origen superovulado in vivo
Figura 4	Ovarios de hembras superovuladas multíparas con cicatrices de ovulación
Figura 5	Dyanbeads unidas al ARNm de los ovocitos y al imán
Figura 6	Semen recuperado mediante el empleo de una vagina artificial
Figura 7	Colocación de la coneja en posición de cúbito para laparoscopia
Figura 8	Tasa de ovulación para cada grupo experimental
Figura 9	Expresión génica del gen MATER para cada grupo experimental
Figura 10	Expresión génica del gen PAPOL-A para cada grupo experimental
Figura 11	Expresión génica del gen PAPOL-G para cada grupo experimental
Figura 12	Expresión génica del gen ZAR1 para cada grupo experimental
Figura 13	Tasa de implantación para cada grupo experimental
Figura 14	Porcentaje de viabilidad para cada grupo experimental

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 **Cebadores utilizados en la PCR a tiempo real, secuencia y tamaño del fragmento amplificado**

Tabla 2 **Programa de tiempos y temperaturas para la qPCR**

ABREVIATURAS

ADNc: ADN complementario (complementary DNA; cDNA)

AMH: hormona antimulleriana

ANOVA: Análisis de la varianza.

ARNm: ARN mensajero

ATP: adenosín trifosfato

BMP-15: proteína morfogenética ósea 15

BSA: bovine serum albumine (albúmina sérica bovina)

CTP: péptido carboxi terminal

DPBS: Dulbecco's phosphate buffer saline (tampón fosfato salino de Dulbecco)

eCG: gonadotropina coriónica equina

FSH: hormona folículo-estimulante

FSH-CTP: corifolitropina alfa

GDF9: factor de crecimiento/diferenciación 9

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas

hCG: gonadotropina coriónica humana

IA: inseminación artificial

LH: hormona luteinizante

ML: multíparas

NL: nulíparas

qPCR: quantitative polymerase chain reaction (PCR cuantitativa a tiempo real)

rhFSH: hormona folículo-estimulante recombinante humana

ROS: especies reactivas del oxígeno

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcriptasa reversa

TO: tasa de ovulación

TR: tasa de recuperación

1. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de reproducción asistida requieren la obtención de un gran número de ovocitos y embriones para manejo *in vitro*. Estas técnicas involucran estimulación ovárica, control del crecimiento folicular, recuperación de ovocitos, preparación e inseminación espermática, cultivo, diagnóstico pre-implantacional y selección embrionaria, crioconservación y transferencia de embriones, y soporte luteal (Georgiou et al., 2018). Este conjunto de técnicas se ha convertido en una práctica de rutina en medicina reproductiva para superar problemas de fertilidad en la especie humana debido a que cada vez existe mayor número de parejas infértiles a causa de un aumento del estrés, la falta de ejercicio y la contaminación ambiental, siendo la infertilidad una condición en la que no tiene lugar un embarazo exitoso normal (Kim et al., 2017). Por su parte, la edad avanzada también supone un factor de riesgo para la infertilidad femenina, así como para la pérdida de embarazo y las anomalías fetales (Sauer, 2015).

A pesar del incremento en el uso de estas técnicas, cada vez existe más preocupación respecto a su seguridad, puesto que son varios los casos en los que se han visto alteraciones a lo largo de la gestación y la edad adulta (Hur et al., 2015).

1.2 Conejo como modelo animal

El conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) es muy utilizado como animal experimental en estudios biotecnológicos, en genética y reproducción (Cortell et al., 2014). Además, se trata de un modelo comúnmente utilizado en la investigación de enfermedades humanas y en toxicidad de fármacos (Kamaruzaman et al., 2013). El conejo ha sido el modelo clásico manejado en embriología y biología reproductiva, ya que existen numerosas características que hacen de él un modelo animal perfectamente adecuado para este tipo de estudios, como son el conocimiento exacto de la cronología del desarrollo embrionario y la etapas de la gestación; blastocistos de gran tamaño, susceptibles de manipulación; así como morfología placentaria similar a la humana (Fischer et al., 2012).

El conejo es una de las pocas especies en las que la ovulación es inducida por apareamiento, lo que resulta en un embarazo exactamente definido (horas o días después del coito) (Bakker & Baum, 2000). Además, los conejos son bien conocidos por su capacidad de reproducirse rápidamente. Las hembras son capaces de concebir pocas horas después de dar a luz para que puedan amamantar mientras están gestando. Esto significa que es posible que una sola hembra dé a luz a más de 60 crías cada año (Harcourt-Brown, 2017).

Además, se trata de un animal de pequeño tamaño, de fácil manejo y con un coste de mantenimiento relativamente bajo. Esto hace del conejo uno de los mamíferos más utilizados en investigación (Stübinger & Dard 2013).

1.1.1 Peculiaridades del conejo: anatomía y ovulación inducida

En términos generales, los conejos alcanzan la madurez sexual entre los 5 y 6 meses de edad. Las hembras son capaces de concebir entre los 4 y 4½ meses de edad (Rodríguez, 1999), siendo la duración de la gestación entre 30 y 33 días (Rodríguez, 2004) y el tamaño medio de la camada entre 4 y 10 (Harcourt-Brown, 2017).

Los conejos son ovuladores inducidos sin ciclo estral definido, aunque sí que existe un ritmo cíclico en la receptividad sexual (Harcourt-Brown, 2017). Es decir, aunque no tengan un ciclo estral regular, sí se han descrito periodos de 4 a 10 días de mayor receptividad.

El apareamiento estimula la ovulación aproximadamente 10 horas después del coito. Las ovulaciones pueden ser inducidas no solo por el apareamiento, sino también mediante el uso de fármacos (Geyer et al., 2016), u otros estímulos ovulatorios para conseguir la ovulación artificial de la coneja, como puede ser la administración exógena de GnRH o hCG, que simularán la secreción de GnRH hipofisaria o la inyección intramuscular o intravenosa de hCG o LH, que simulará la descarga endógena de LH (Vicente et al., 1994) (Figura 1).

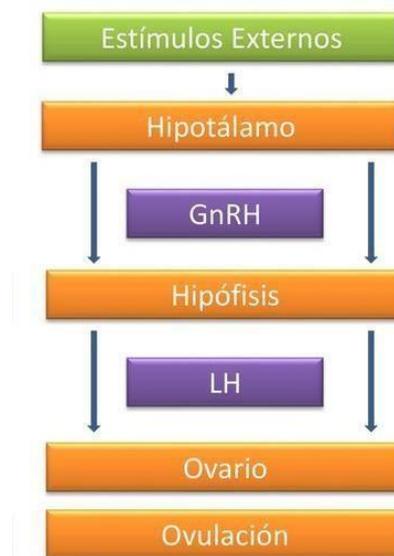


Figura 1. Esquema del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en la coneja.

De esta forma, al ser las conejas animales ovuladores inducidos por el coito con un ciclo reproductivo irregular e indefinido; pueden, en granja o en laboratorio, criar durante todo el año cuando la alimentación es nutritiva y abundante (González-Mariscal et al., 2007).

Por otra parte, las conejas también presentan la peculiaridad de que su útero se describe en muchas ocasiones con el término ‘útero dúplex’, puesto que está formado por dos cuernos uterinos distintos y separados, derecho e izquierdo (Harcourt-Brown, 2017). Una de las principales ventajas de este tipo de útero es la posibilidad de transferencia de embriones de distintos orígenes, como puede ser de hembras multíparas y nulíparas en cada cuerno uterino a una misma hembra receptora para diversos estudios de viabilidad o para el análisis de tasa de implantación.

1.2 Tratamiento de superovulación

La estimulación ovárica y la recuperación de oocitos son esenciales para algunas tecnologías reproductivas con el objetivo de aumentar el número de ovocitos recogidos (Cortell et al., 2014), incluyendo inyecciones intracitoplasmáticas de esperma, clonación o transferencia nuclear interespecífica. Para optimizar el uso de estas técnicas reproductivas, y obtener el máximo número tanto de ovocitos como de embriones, se suelen realizar tratamientos de superovulación, normalmente administrando tanto eCG como FSH para inducir ovulación en las conejas (Cortell et al., 2010; Viudes de Castro et al., 2009). Es decir, los tratamientos de superovulación requieren la administración de una gonadotropina exógena. Normalmente, para la superovulación en conejos, se pueden utilizar diferentes hormonas, como la gonadotropina coriónica equina (eCG) y la FSH.

La administración de eCG se usa para imitar el efecto que produce en la maduración de los ovocitos la hormona folículo estimulante endógena (FSH) (Behringer et al., 2018) y hormona luteinizante (LH), mejorando el desarrollo del folículo y aumentando de la fertilidad de las hembras (Arias-Álvarez et al., 2010). Además, la eCG tiene una vida media más larga que la FSH (varios días frente a unas pocas horas). Esto permite reducir el número de inyecciones y, por tanto, el estrés producido en el animal (Salveti et al., 2007; Arias-Álvarez et al., 2010). Sin embargo, el tratamiento con eCG presenta como principales inconvenientes la variabilidad de la respuesta individual, la formación de anticuerpos y la posible inducción anticipada de la ovulación como consecuencia de su actividad secundaria de tipo LH. Por su parte, los tratamientos basados en FSH son caros y tediosos debido a su corta vida media en sangre (Vicente et al., 1994).

El mayor problema de este tipo de tratamientos es la respuesta impredecible del ovario y el impacto que puede suponer en la tasa de fecundación y el desarrollo embrionario (Viudes de Castro et al., 2009). La variabilidad en la respuesta tiene varios orígenes como la genética, edad, reproducción, paridad o estado fisiológico de los animales. Sin embargo, las preparaciones hormonales utilizadas son muy importantes también. Así pues, la variabilidad en el rendimiento y calidad de los embriones tras varias inyecciones de FSH depende también del ratio FSH:LH de la preparación comercial (Salveti et al., 2007). Un exceso de LH en la preparación podría afectar negativamente al éxito del tratamiento. Es por esto por lo que se están llevando a cabo tratamientos de superovulación con FSH recombinantes, de tal manera que no exista LH exógena. En conejo, el uso de FSH recombinante permite inducir la superovulación a un ritmo comparable al de la FSH generada por la hipófisis, mejorando la calidad del embrión. Por el contrario, el uso de FSH recombinante humana (rhFSH) trae consigo efectos negativos en la maduración folicular (Viudes de Castro et al., 2009).

1.3 Factores que afectan a la calidad ovocitaria

Como requisito previo para obtener un embrión sano se debe partir primero de un ovocito saludable. Una calidad subóptima de los ovocitos es a menudo causa de la infertilidad (Krisher, 2013). Ciertos factores como son los tratamientos de superovulación, así como la edad de las conejas en cuanto a número de partos se refiere, podrían afectar a la calidad de los ovocitos. La determinación de la calidad de los ovocitos es crítica para la mayoría tecnologías de reproducción asistida humana y animal, puesto que, en ocasiones, la superovulación puede llevar a efectos perjudiciales en la calidad del ovocito (Cortell et al., 2014). Otras variables, como pueden ser la edad pueden afectar a la cantidad de ovocitos recuperados y a la tasa de éxito de las técnicas de reproducción asistida (Georgiou et al., 2018).

Uno de los grandes desafíos en el campo de la biología reproductiva y la medicina reproductiva es comprender la naturaleza de los procesos moleculares y celulares que controlan la calidad de los ovocitos (Gilchrist et al., 2008). La adquisición de ovocitos competentes es el gran reto para las técnicas de reproducción asistida. El origen de los ovocitos, así como el entorno en el que se produce su crecimiento y maduración es importante en la adquisición de su competencia (Moussa et al., 2015), siendo la competencia de los ovocitos un elemento crítico que dictamina la fertilidad de la hembra (Krisher, 2013). Un ovocito totalmente competente debería ser capaz de reanudar la meiosis, escindir-se después de la fecundación, desarrollar la etapa de blastocisto, inducir un embarazo y llevarlo a término con buena salud (Sirard et al., 2006).

1.3.1 Efecto de la superovulación

La superovulación se utiliza normalmente para producir la máxima cantidad de óvulos y embriones transferibles. Para llevar a cabo la superovulación, es necesaria la administración de gonadotropina exógena. Sin embargo, uno de los principales problemas de este proceso, es el impacto que esto puede generar en la respuesta del ovario, la tasa de fecundación, y el desarrollo embrionario, afectando por tanto al rendimiento y a la calidad de óvulos y embriones obtenidos tras el tratamiento (Viudes De Castro et al., 2009). Normalmente el tracto reproductivo proporciona el entorno óptimo para el desarrollo de ovocitos y del embrión. Sin embargo, la estimulación ovárica con hormonas exógenas altera el ambiente del ovocito (Krisher, 2013).

Entre los problemas derivados de los tratamientos de superovulación, se encuentran la generación de folículos anormales y quísticos, la disminución de la tasa de recuperación de embriones, así como alteraciones cromosómicas en los embriones recuperados (Mehaisen et al., 2006).

Investigaciones recientes han demostrado que la superovulación podría afectar negativamente a mecanismos epigenéticos, calidad y maduración de ovocitos, así como a los niveles de expresión de ciertos genes que posteriormente afectará a la tasa de implantación, al crecimiento fetal y supondrá un retraso en el desarrollo de embriones (Uysal et al., 2017). Se han realizado diversos estudios en modelos animales para conocer mejor cómo estos tratamientos podrían afectar a la calidad ovocitaria. De esta manera, se ha demostrado que más de un tratamiento de superovulación en el mismo animal puede reducir la respuesta al tratamiento y la calidad de los gametos. Se piensa que esta reducción en la respuesta puede

estar relacionada con un aumento de anticuerpos anti-FSH o antigonadotropina (Ashrafi et al., 2018; Viudes de Castro et al., 2009). Además, los estudios con animales han confirmado que la superovulación con FSH exógena puede producir un aumento de las anomalías cromosómicas (Roberts et al., 2005).

En ratones, la superovulación causa una disminución en el nivel de metilación global en cigotos en comparación con grupos control y afecta a la expresión de genes como H19 en blastocistos. Por tanto, estos estudios señalaron que la alteración en la calidad de ovocitos y el desarrollo de embriones que causaba la superovulación podría ser debida a fallos en la expresión de ADN metil transferasas (Uysal et al., 2017). De esta manera, a medida que aumenta la dosis de hormona, aumenta la cantidad de fallos en la metilación (Cree et al., 2015). Por su parte, otros estudios sobre el efecto de la superovulación en ratones manifestaron que los ovocitos obtenidos presentaban alteraciones morfológicas en mitocondrias y complejos lisosomales, lo cual conducirá a la aparición de aneuploidías en ovocitos. Las alteraciones mitocondriales están relacionadas con una mala calidad de los ovocitos (Yamada et al., 2018). Estas alteraciones suponen una menor síntesis de ATP, que puede afectar negativamente al desarrollo embrionario (Lee et al., 2017). Además, la superestimulación en ratones, produce un retraso en el desarrollo embrionario, disminución de la implantación y retraso en el crecimiento fetal (Krisher, 2013).

En ganado, la estimulación ovárica da como resultado una maduración del ovocito aberrante y una competencia reducida del mismo probablemente debido a una falta de comunicación entre el ovocito y las células del cúmulo (Kafi et al., 1997). En bovinos, por su parte, la superestimulación ha resultado en una alteración de la expresión génica, así como un crecimiento más lento. De la misma manera, en humanos, la estimulación también afecta a los resultados del embarazo al alterar el ambiente hormonal del útero (Krisher, 2013).

1.3.2 Efecto de la edad

La esperanza de vida promedio de los conejos es de aproximadamente de 8 a 12 años. Las conejas alcanzan la madurez sexual a los 5-6 meses de edad, decayendo su función reproductiva alrededor de los 6 años (Dutta et al., 2018). Aunque diversos factores pueden modificar ésta, por ejemplo el engrasamiento excesivo conlleva fallos reproductivos severos a edades tempranas o su prolificidad puede comenzar a reducirse en torno al séptimo parto en condiciones de explotación comercial.

En humanos, la edad materna avanzada da como resultado una disminución de la fertilidad, particularmente a partir de los 40 años. La infertilidad y el aborto en mujeres de edad avanzada son causados por ovocitos de mala calidad (Li et al., 2001), por lo que la calidad de los ovocitos es un factor clave en la fertilidad femenina. Se ha visto que, en mujeres con una vida reproductiva avanzada los niveles de FSH aumentan, pudiendo esto influir en el aumento de las tasas de aneuploidía observadas en ovocitos recuperados de mujeres mayores. De hecho, se ha observado que la morfología de los cromosomas es anormal en ovocitos de ratones y mujeres de edad más avanzada, por lo que, la exposición a altos niveles de FSH in vivo pueden tener un efecto adverso tanto en la función folicular como en la calidad de los ovocitos (Roberts et al., 2005). De esta manera, en mujeres, uno de los principales síntomas de mala calidad ovocitaria relacionada con la edad es la presencia de anomalías cromosómicas (aneuploidías) por una mala segregación cromosómica (Hendriks et al., 2015), de forma que, un 20-30% de los ovocitos de una mujer de edad avanzada presentan aneuploidías (Capalbo et al., 2017).

En general, en mamíferos la capacidad reproductiva disminuye con el aumento de la edad materna. Aunque con la edad aparecen algunos fallos citoplasmáticos, las aneuploidías que surgen en la meiosis I son uno de los fallos más distintivos del empeoramiento de la calidad de los ovocitos. Existen algunas hipótesis que explicarían las aneuploidías que aparecen con la edad, como son defectos en la recombinación meiótica, fallo en el establecimiento de los microtúbulos del cinetócoro y la pérdida prematura de la cohesión de las cromátidas hermanas con el centrómero (Lu et al., 2016).

Se piensa que una mala calidad de ovocitos está relacionada con la disfunción mitocondrial (Hendriks et al., 2015). Las mitocondrias son los orgánulos más abundantes en los ovocitos, que representan una gran fracción del volumen citoplásmico y están implicados en la síntesis de ATP, producción de especies reactivas del oxígeno y señalización del calcio para permitir la segregación cromosómica, fecundación y posterior desarrollo embrionario (Cree et al., 2015). Con el aumento de la edad, aparecen errores en la replicación mitocondrial de manera que la cantidad de ADN mitocondrial no es la adecuada, lo que conlleva a un aumento de especies reactivas del oxígeno ROS (Hendriks et al., 2015), causando daños en proteínas, lípidos y ADN en la célula, lo cual es un sello distintivo de células envejecidas, que tienen menor capacidad de neutralización de ROS (Perkins et al., 2016). El número de copias de ADN mitocondrial y la expresión de genes con funciones mitocondriales como protección oxidativa, señalización o desarrollo folicular son, por tanto, factores importantes a la hora de analizar la calidad ovocitaria y podría ser un mecanismo que explicase el envejecimiento de los ovocitos, puesto que éstos se ven afectados con el aumento de la edad (Cree et al., 2015).

1.3.3 Efecto de la maduración in vitro

La maduración in vitro de ovocitos es una alternativa utilizada en técnicas de reproducción asistida para preservar la fertilidad de la mujer (Keshavarzi et al., 2018) y para generar embriones in vitro, lo que reduce la necesidad de administrar gonadotropinas exógenas a los pacientes (Sudiman et al., 2014). Sin embargo, las tasas de éxito de este método son todavía bastante bajas tanto en humanos como en animales (Keshavarzi et al., 2018; Yamada et al. 2018).

La maduración in vitro de los ovocitos podría afectar a la calidad de éstos. En este sentido, los ovocitos de ratón madurados in vitro tienen la capacidad de reanudar la meiosis, pero la gran mayoría no logra alcanzar la maduración nuclear en comparación con los ovocitos madurados in vivo. Por su parte, los ovocitos bovinos madurados in vivo tienen un porcentaje mucho más alto de desarrollo de blastocistos en comparación con los ovocitos madurados in vitro (Krisner, 2013). Los ovocitos madurados in vitro presentan una expresión génica y un perfil de proteínas aberrante en comparación con los ovocitos madurados in vivo. Por ejemplo, la expresión de BMP15, esencial para el correcto desarrollo de los ovocitos, se ve disminuida durante la maduración in vitro (Sudiman, 2014).

Por otra parte, aproximadamente sólo un tercio de los ovocitos madurados in vitro alcanzan la etapa de blastocisto, y los embriones resultantes normalmente presentan un número de células subóptimo en comparación con los embriones producidos in vivo (Krisner, 2013).

1.3.4 Efecto de la nutrición y obesidad

La nutrición juega un papel importante en el ambiente del ovocito. Una alimentación inadecuada puede conducir a alteraciones en la función reproductiva al modificar el ambiente hormonal y bioquímico del folículo, provocando alteraciones en la secreción de GnRH, de LH y variaciones en las concentraciones de 17β estradiol y progesterona (Boland, 2001). Tanto la cantidad como la calidad de los alimentos consumidos puede afectar a múltiples parámetros de fertilidad tanto a corto como a largo plazo, incluida la finalización de la maduración de los ovocitos, el posterior desarrollo del blastocisto, la supervivencia del feto, el tamaño de la camada, así como el comportamiento de las crías, enfermedades cardiovasculares y función reproductiva (Krisher, 2013).

Una mala alimentación puede llevar consigo enfermedades como la obesidad, la cual afecta a más de 600 millones de adultos en todo el mundo. La obesidad tiene una influencia negativa tanto en la fertilidad masculina como femenina (Balasubramanian et al., 2012). Se ha demostrado que las mujeres con obesidad son tres veces más propensas a sufrir infertilidad en comparación con mujeres con un índice de masa corporal normal (Sohrabi et al., 2015). Por una parte, la obesidad tiene un efecto negativo en el potencial reproductivo debido a una alteración funcional del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. De esta forma, la obesidad da como resultado una mala calidad de los ovocitos, lo cual conduce a algunos riesgos como son la irregularidad menstrual, patología endometrial, trastornos ovulatorios, así como una supervivencia de los blastocistos reducida y diferenciación celular embrionaria anormal. Por otra parte, las mujeres con obesidad a menudo presentan mayores niveles de insulina en sangre, que está relacionado con la aparición de ciertas enfermedades como el síndrome de ovario poliquístico. La obesidad también afecta en la respuesta ovárica al tratamiento con gonadotropinas, de tal manera que el rendimiento de ovocitos es menor (Broughton et al., 2017).

En ratones con obesidad, se ha demostrado que los ovocitos son de tamaño más pequeño de lo normal y con menos probabilidades de alcanzar la madurez. Además, estos ovocitos anormales presentan altas tasas de aneuploidía y las funciones mitocondriales se encuentran alteradas (Broughton et al., 2017; Sohrabi et al., 2015). Además, la obesidad ha sido asociada con una menor cantidad de ovocitos fecundados, niveles más bajos de estradiol y menores tasas de embarazos y de nacidos vivos (Sohrabi et al., 2015).

1.4 Marcadores de calidad ovocitaria

1.4.1 Morfología

Los criterios morfológicos siguen siendo, pese al avance en biología reproductiva el método más ampliamente utilizado para analizar la calidad de los ovocitos, puesto que es una técnica no invasiva, de bajo coste y fácil de clasificar rápidamente (Ashry et al., 2015). De esta forma, aunque la evaluación morfológica de ovocitos puede ser algo subjetiva, sigue siendo el criterio estándar para la identificación de células con mayor potencial de desarrollo (Cota et al., 2012).

Muchos estudios se han centrado en analizar la relación entre la capacidad de desarrollo de los ovocitos con diferentes características morfológicas; como puede ser la morfología del complejo cúmulo-ovocito, el diámetro del ovocito o el tamaño del folículo del que son aspirados (De Bem et al., 2014). Los dimorfismos de los ovocitos pueden ocurrir debido a la edad, cambios

genéticos y factores relacionados con algún tratamiento como la estimulación ovárica, así como el ambiente hormonal en el que se encuentra el ovocito (Cota et al., 2012).

Sin embargo, no existe un consenso respecto a este método de selección, puesto que no siempre los ovocitos con una morfología en principio adecuada son los que mejor capacidad de desarrollo presentan. Estudios llevados a cabo en ratas, ratones, cerdos y humanos concluyeron que la relación entre el diámetro del ovocito y la competencia para la maduración y desarrollo embrionario es específica de cada especie y no debe generalizarse a otros modelos animales (Taheri et al., 2018). Por su parte, otros estudios indican que los complejos cúmulo-ovocito con algunos principios de atresia muestran mayor potencial de desarrollo que aquellos considerados morfológicamente sanos, por lo que la selección de ovocitos en base a su morfología es bastante inconsistente e incluso contradictoria (De Bem et al., 2014). De la misma manera, tampoco se ha llegado a un acuerdo en estudios basados en la relación entre la estructura de la zona pelúcida y la capacidad de maduración del ovocito en ratón, perro, cabra y humanos, puesto que algunos autores demuestran una relación directa entre ambos factores, pero otros autores no encuentran esa asociación (Lunn et al., 2013).

Eso sí, existen ciertos estudios que afirman una relación positiva entre el diámetro del folículo con la capacidad de desarrollo del blastocisto in vitro. Así, los ovocitos que provienen de folículos de menos de 3 mm son menos competentes para el desarrollo in vitro de embriones en comparación con aquellos que provienen de folículos de mayor tamaño (De Bem et al., 2014). De la misma manera también se ha demostrado una relación entre una morfología no fragmentada y una alta tasa de fecundación y calidad embrionaria (Taheri et al., 2018).

1.4.3 Determinación basal de hormonas en suero

Existen muchas mediciones hormonales que han sido aceptadas como marcadores de reserva ovárica. La determinación de la concentración de FSH, la inhibina B y la hormona antimulleriana (AMH) han sido aceptados como marcadores valiosos de la función ovárica (Zebitay et al., 2017), puesto que la concentración intrafolicular de estas hormonas durante el desarrollo folicular es esencial para una fecundación exitosa del ovocito resultante (Kedem-Dickman et al., 2012).

La hormona antimulleriana (AMH) es una proteína producida por las células de la granulosa y tiene una función importante en la regulación del reclutamiento y desarrollo folicular, así como del desarrollo de ovocitos (Zebitay et al., 2017). Normalmente su expresión va disminuyendo a medida que el folículo crece. Recientes estudios han demostrado que altas concentraciones de esta hormona en el líquido folicular se relacionan con mejores tasas de implantación y de embarazo (Kedem-Dickman et al., 2012).

Por su parte, una concentración adecuada de FSH es necesaria para promover el crecimiento de los ovocitos, de tal manera que concentraciones supra fisiológicas de esta hormona afectan negativamente a la maduración de éstos, tal y como se ha demostrado en ratones, donde la concentración correcta de FSH es crucial para promover el crecimiento de ovocitos (Lin et al., 2011).

Algunos estudios indican que la concentración de progesterona en plasma afecta a la calidad de los ovocitos (Penitente-Filho et al., 2015). La progesterona puede afectar a la calidad de ovocitos alterando el desarrollo de los folículos dominantes. La frecuencia de secreción pulsátil

de GnRH está regulada por concentraciones circulantes de progesterona durante el ciclo estral, que a su vez regulan la frecuencia de pulsos de LH. La frecuencia de pulsos de LH es la que determina si un folículo dominante ovula o no, por lo que cuando las concentraciones de progesterona son altas, la frecuencia de pulsos de LH es baja y el folículo dominante sufre atresia (Loneragan, 2011).

1.4.3 Expresión génica

Durante su desarrollo, los ovocitos acumulan grandes cantidades de ARNm y proteínas esenciales para alcanzar la competencia para la meiosis y embriogénesis. Muchos de estos ARNm y proteínas acumuladas durante el crecimiento de ovocitos están involucrados en la evolución meiótica, control del ciclo celular o la formación del blastocisto (Krisher, 2013). Los estudios transcriptómicos permiten analizar de manera cuantitativa y cualitativa la expresión génica de un tejido o células (como los ovocitos) bajo condiciones fisiológicas o patológicas.

Existen genes esenciales en la activación, maduración y desarrollo de ovocitos, así como en la transcripción del ARNm y transición ovocito-embrión. Algunos de los genes implicados en estos procesos son MSY2, que ayuda a la estabilidad y traducción del ARNm materno (Yu et al., 2018); MATER, necesario para poder llevar a cabo las primeras divisiones embrionarias (Urrego et al., 2015); los miembros de la familia de ITPR, involucrados en el transporte de calcio y que evitan su acumulación en las mitocondrias (Wiel et al., 2014), siendo el papel de las mitocondrias en la señalización del calcio esencial para poder llevar a cabo la segregación cromosómica, fecundación y posterior desarrollo embrionario (Cree et al., 2015). Por su parte, otros genes como eIF4E, son importantes en este tipo de estudios, puesto que se ha visto que una sobreexpresión del gen está relacionada con distintos tipos de cánceres como cáncer de ovario y de próstata. Además, participa en la traducción de ARNm de células germinales (Friday et al., 2015). PARN, por su parte, también se encarga de la regulación del ARNm, maduración de los ovocitos y de la embriogénesis (Utter et al., 2011). Los genes de la familia PAPOL también son interesantes en este tipo de estudios de calidad ovocitaria, debido a su papel esencial en la función mitocondrial (Konpf et al., 1976) esencial para una fecundación y desarrollo embrionario exitoso (Cree et al., 2015). Otros marcadores específicos de calidad ovocitaria son ZAR1, necesario para la maduración y crecimiento de los ovocitos (Sugito et al., 2013) e YY1, necesario para llevar a cabo el crecimiento folicular, ovulación, así como la maduración y activación de los ovocitos (Griffith et al., 2011).

Sin embargo, la lista de genes utilizados para analizar la calidad y competencia ovocitaria es muy extensa. Algunos de los genes que han sido utilizados para valorar la calidad ovocitaria son aquellos pertenecientes a la superfamilia de genes del factor de crecimiento transformante (TFG), que han demostrado ser importantes para regular la fertilidad; como son el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9) y la proteína BMP15, también conocida como GDF9B (Daoud et al., 2012; Ashry, et al., 2015). También es común analizar la expresión de genes de las células del cúmulo como gremlin 1 (GREM1), versican (VCAN) y ácido hialurónico sintasa 2 (HAS2) (Cree et al., 2015) que podrían utilizarse como biomarcadores de calidad de los ovocitos (Arias-Álvarez et al., 2016; Uyar et al., 2013).

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este Trabajo Final de Grado son los siguientes:

- Evaluar el efecto de la corifolitropina alfa (FSH-CTP; Elonva) y la edad de las conejas sobre la respuesta ovulatoria y la calidad ovocitaria.
- Evaluar la viabilidad de los embriones obtenidos de hembras superovuladas, nulíparas y múltiparas tras su sexto parto, mediante la determinación de su viabilidad invivo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño experimental

Las figuras 2 y 3 muestran un esquema de los diseños experimentales del presente trabajo.

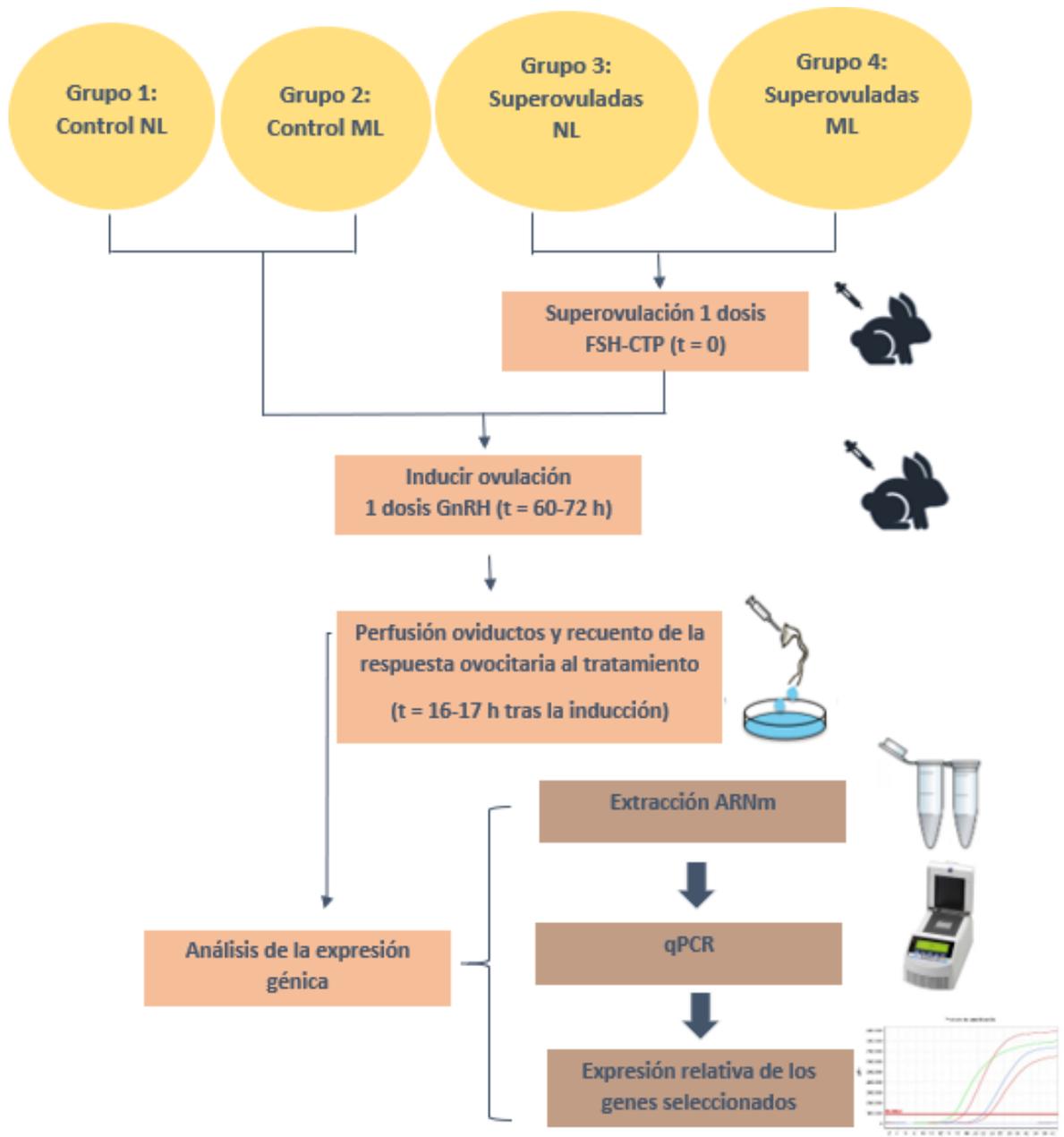


Figura 2. Diseño experimental del experimento 1. Respuesta ovulatoria y expresión génica de los ovocitos.

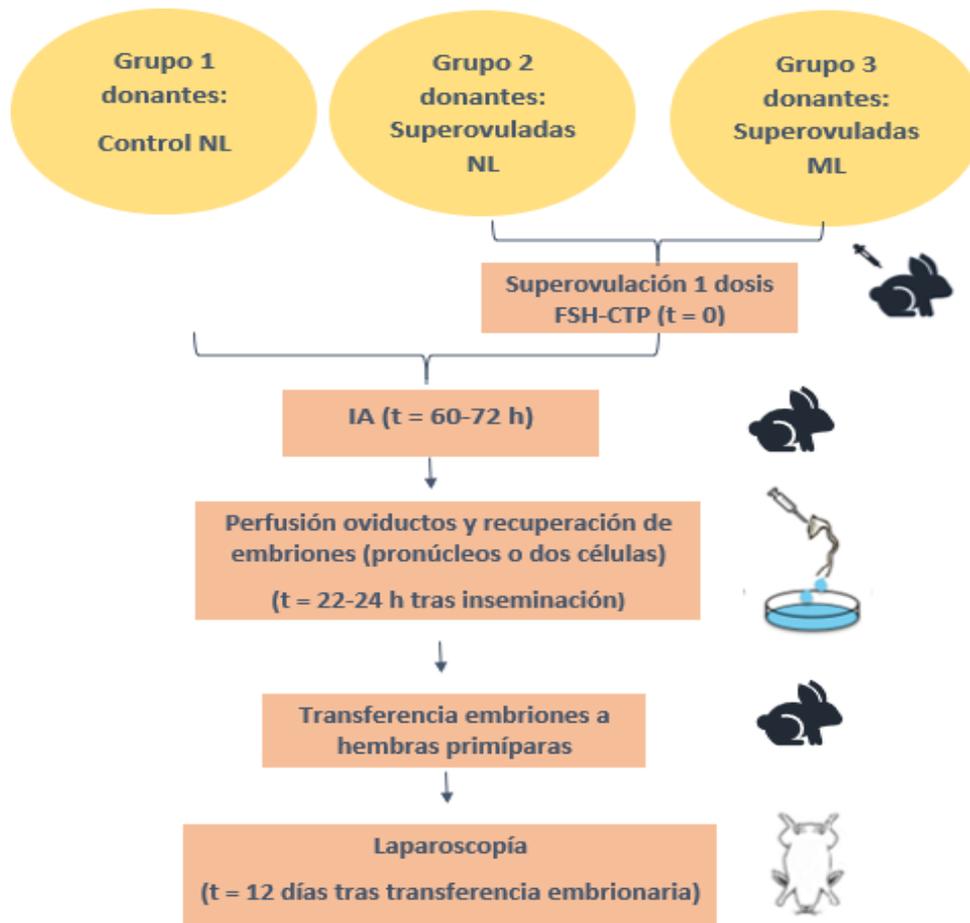


Figura 3. Diseño experimental del experimento 2. Viabilidad de embriones de origen superovulado in vivo.

3.2 Animales

Los animales empleados en este trabajo pertenecen a una línea de conejo neozelandés blanco seleccionada por tamaño de camada desde 1980. Todos los animales fueron proporcionados por las granjas cunículas del Grupo de Mejora Genética Animal del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universidad Politécnica de Valencia.

Para los tratamientos de superovulación, las hembras se diferenciaron en dos grupos según su estado reproductivo: hembras nulíparas con una edad comprendida entre los 4 y 5 meses y sin ningún parto previo; y hembras múltiparas con una edad superior a un año y con 6 partos previos al experimento. Por su parte, se utilizaron hembras primíparas como receptoras de embriones (un parto).

Todos los conejos fueron alojados en jaulas individuales en condiciones ambientales controladas, con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad diarias, una temperatura media diaria de 17,5 °C y máxima de 25,5 °C. Fueron alimentados con pienso comercial y disponían de acceso libre a agua filtrada.

3.3 Tratamiento de superovulación

Para el tratamiento de superovulación se empleó una hormona corifolitropina alfa comercial (FSH-CTP; Elonva) suplementada con hCG. Las conejas donantes recibieron una inyección subcutánea de la 3 µg ELONVA suplementada con 5 UI hCG a tiempo 0.

Pasadas 60-72 horas tras el tratamiento de superovulación, se indujo a ovulación a las hembras superovuladas mediante una inyección intramuscular de 1 µg de GnRH.

Según el tratamiento recibido en el primer experimento, las hembras donantes de óvulos fueron clasificadas en 4 grupos experimentales:

Grupo 1 (N = 9): hembras control nulíparas sin superovular

Grupo 2 (N = 12): hembras control múltiparas sin superovular

Grupo 3 (N = 11): hembras superovuladas nulíparas

Grupo 4 (N = 12): hembras superovuladas múltiparas

Por su parte, en el segundo experimento, las hembras donantes de embriones fueron divididas en dos grupos experimentales:

Grupo 1 (N = 6): hembras control nulíparas

Grupo 2 (N = 6): hembras superovuladas nulíparas

Grupo 3 (N = 6): hembras superovuladas múltiparas

3.4 Experimento 1: Respuesta ovulatoria y expresión génica de los ovocitos.

3.4.1 Recuperación de óvulos

Aproximadamente 16-17 horas después de inducir a ovulación con la hormona GnRH, tanto de las hembras control como de las hembras superovuladas, se recuperaron los tractos reproductores post-mortem.

Los ovocitos fueron recuperados mediante perfusión de cada oviducto con 5 mL de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), que fue suplementado con 0,2% (v/w) de BSA y antibióticos (penicilina G sódica 300.000 UI, penicilina G procaína 700.000 UI y sulfato de dihidrostreptomomicina 1250 mg/L, Penivet 1, Divasa Farmavic, Barcelona, España), y atemperado a 37°C.

Los ovocitos recuperados se depositaron en placas Petri estériles de 60 mm para llevar a cabo el recuento bajo lupa binocular y obtener la tasa de recuperación (TR). Además, también se obtuvo la tasa de ovulación (TO) mediante el recuento de folículos con cicatrices presentes en ambos ovarios.

Se agruparon en lotes de 40-60 ovocitos para cada muestra y 6 muestras por grupo experimental que fueron almacenados a -20°C para el posterior análisis de expresión de génica.

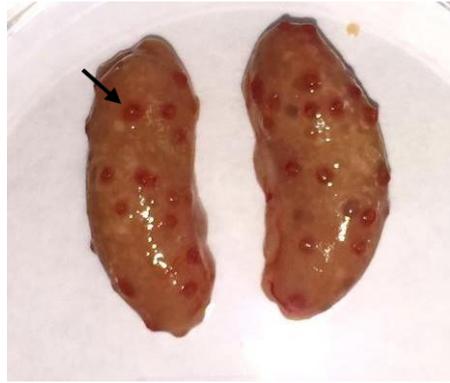


Figura 4. Ovarios de hembras superovuladas múltiparas con cicatrices de ovulación

3.4.2 Extracción de ARN mensajero

Para cada grupo experimental se realizaron 6 lotes independientes de 40-60 óvulos cada uno. Los lotes de ovocitos fueron homogenizados tras dos etapas de congelación en nitrógeno líquido. Tras ello, el aislamiento del ARN mensajero se realizó usando el kit Dyanabeads (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este sistema se basa en el uso de esferas superparamagnéticas unidas covalentemente a colas poliT que se unirán a las colas poliA del ARNm del extremo 3' de los ovocitos.



Figura 5. Dyanbeads unidas al ARNm de los ovocitos y al imán

Posteriormente, se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) para obtener a partir del ARNm extraído de los ovocitos, el ADN complementario (ADNc) y, por tanto, la cuantificación relativa de los genes objeto de este estudio. Para ello, se siguieron las instrucciones descritas en el protocolo SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies AS, Oslo, Norway). La reacción RT-PCR se llevó a cabo a 25°C durante 5 min y 50°C durante 60 min seguido de un último paso de inactivación a 70°C durante 15min.

3.4.3 Cuantificación relativa mediante PCR en tiempo real (qPCR)

Se analizó la expresión génica de 12 genes relacionados con la calidad del óvulo para determinar la calidad de los ovocitos producidos por los distintos grupos experimentales. La tabla 1 muestra una relación de los genes empleados, así como las secuencias de los primers empleados para el análisis de los mismos.

Tabla 1. Cebadores utilizados en la PCR a tiempo real, secuencia y tamaño del fragmento amplificado.

Gen	Forward primer	Reverse primer	Tamaño amplificado
H2AFZ	AGAGCCGGCTGCCAGTTCC	CAGTCGCGCCCACACGTCC	85 pb
GADPH	GCCGCTTCTTCTCGTGACAG	ATGGATCATTGATGGCGACAACAT	144 pb
MSY2	CCCACCACCTTCTTCTACC	CTGGTCTCCCTGTTGTTGGT	262 pb
MATER	GCCTGTCCCATGTGATTGTG	GAGGTCCAAGCTCTTCAGGT	60 pb
ITPR1	GGGACCTTAACAACCCACCT	GCTGCTTTCCAGAAGTCTT	100 pb
ITPR2	CATTTGCCATCGTGTCTGTC	GCACGTCAGCAACAAGAAG	212 pb
ITPR3	AGCTGGTGTGTGACCTCATC	AGCCACTGTGGACTTGGTCT	129 pb
eIF4E	CAGGAGGTTGCTAACCAGAG	AGAGATCAGCCGAAGGTTTG	128 pb
PARN1	ACCAGCAGATATGCGGAAAG	GCTGTGCTGGTAGCTGTCAA	111 pb
PAPOL-A	TGTGGGTGATTGGGTTAGTG	TGGCAGCAATTTTCATATCC	60 pb
PAPOL-G	TGACTGCCAGTGCATCAAC	GGGATTTACATGGGCAAGAG	123 pb
GDF9	GGGATTCTAAAGCCAACAG	GTGTTCCACGGCAGTAACG	115 pb
ZAR1	CAGAAGTCTTACAACCCCTACCG	GCAGGAACACCTCGTACGTT	72 pb
YY1	GGGCAAGCTATTGTTCTTGG	GGCATTGACCTCTCAGATCC	98 pb

Para estudiar la expresión de los genes seleccionados, se empleó un termociclador modelo 7500 de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) y el sistema de detección SYBR® Green.

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos utilizando un volumen total de 20 µL. En cada reacción se utilizaron 10 µL de la solución SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), que contiene todo lo necesario para llevar a cabo la reacción: la enzima AmpliTaq Gold®, el marcador SYBR® Green y los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs). También se añadieron 2 µL de la referencia pasiva ROXTM (6-carboxy-Xrhodamine) para normalizar las reacciones y evitar las fluctuaciones de fluorescencia de los pocillos por errores en el pipeteo o evaporación de las muestras, 1 µL de cada primer a 5 µM, 1 µL de agua y, por último, 5 µL de cada muestra de ADNc diluido 1:10. Las condiciones de PCR empleadas se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Programa de tiempos y temperaturas para la qPCR

Fase de la PCR	Tiempo	Temperatura
Activación de la polimerasa	2 min	50 °C
	10 min	95 °C
40 ciclos: Desnaturalización Unión primers	1 s	95 °C
	30 s	60 °C
Curva de disociación	15 s	95 °C
	1 min	60 °C
	15 s	95 °C

Como genes 'housekeeping' de referencia se emplearon el gen de la histona (H2AFZ) y el gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), cuya expresión debe ser constante e invariable entre diferentes condiciones experimentales. Como calibrador se utilizó un pool de todas las muestras en una dilución 1:20.

3.5 Experimento 2: Viabilidad de embriones de origen superovulado in vivo

3.5.1 Recuperación de embriones

Pasadas 60-72 horas tras la superovulación con la hormona Elonva suplementada con hCG, las conejas donantes de embriones tanto nulíparas (n=6) como múltiparas (n=6) fueron inseminadas artificialmente.

El semen se recuperó de machos de la misma línea A con edades comprendidas entre 8 y 12 meses el mismo día de la IA empleando vaginas artificiales según el método descrito por Vicente et al. (2011). La muestra seminal recogida fue diluida 1:5 en Tris-Cítrico- Glucosa [0.25 M Tris (hidroximetil) aminometano, 83 mM ácido cítrico, 47 mM Glucosa]. De cada eyaculado se tomó una alícuota de 5 µL para evaluar la calidad y concentración espermática con el microscopio óptico antes de su utilización. Se utilizó muestra de semen de tres machos para conseguir una mezcla heterospermática con una motilidad espermática superior al 70% y un porcentaje de espermatozoides anormales inferior al 25%, que son los criterios de exclusión para llevar a cabo la inseminación artificial (Marco et al., 2010).

Las hembras fueron inseminadas con 0.5 mL del pool de semen fresco. Tras la inseminación, se les indujo la ovulación con 1 µg de GnRH vía intramuscular.



Figura 6. Semen recuperado mediante el empleo de una vagina artificial

La recuperación de embriones tanto de las hembras superovuladas nulíparas como múltiparas se realizó post-mortem 24 horas después de la inseminación. Se recuperaron los tractos reproductores para posteriormente llevar a cabo la recuperación de embriones. Para ello, se perfundieron los oviductos con 10 mL de tampón fosfato alcalino (DPBS, Dulbecco's phosphate buffer serum) suplementado con 0.2% (v/w) de BSA (albúmina de suero bovino, Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.132 g/L de CaCl_2 + y antibiótico (penicilina G sódica 300.000 UI, penicilina G procaína 700.000 UI y sulfato de dihidrostreptomina 1250 mg/L, Penivet 1, Divasa Farmavic, Barcelona, Spain), atemperado a 37°C.

El medio de perfusión se recogió en placas Petri estériles de 60 mm para posteriormente, bajo lupa binocular llevar a cabo el recuento de embriones y obtener la tasa de recuperación (TR). Además, también se obtuvo la tasa de ovulación (TO) mediante el recuento de cuerpos lúteos presentes en ambos ovarios.

3.5.2 Viabilidad embrionaria in vivo. Transferencia embrionaria

El mismo día de la recuperación de los embriones, se llevaron a cabo las transferencias de éstos de las conejas donantes a las conejas receptoras primíparas. Un total de 97 embriones de hembras control nulíparas fueron transferidos a 8 hembras receptoras primíparas. Por su parte, 114 embriones de hembras superovuladas nulíparas se transfirieron a 9 hembras receptoras primíparas. Finalmente, en el tercer grupo experimental, 103 embriones de hembras superovuladas múltiparas fueron transferidos a 8 hembras receptoras primíparas.

El número de embriones transferidos por hembra receptora fue de 12 a 16.

Las hembras receptoras fueron inducidas a ovular con 1 µg de acetato de buserelina (Hoechst, Marion Roussel, Madrid, Spain) vía intramuscular, 24 horas antes de la transferencia.

La transferencia de embriones fue llevada a cabo mediante laparoscopia. Las hembras receptoras sincronizadas fueron anestesiadas con una inyección intramuscular de 16 mg de xylazina (Rompún, Bayer AG, Leverkusen, Alemania) seguida de otra inyección intravenosa de 16-20 mg de ketamina hidrociorada (Imalgène, Merial S.A., Lyon, France) para mantener sedadas a las conejas durante la laparoscopia. Además, se rasuró el abdomen de las conejas antes de empezar con la operación.

La hembra receptora de embriones se posicionó cabeza abajo sobre una mesa de operaciones en un ángulo de 45°. Primero, se le introdujo una aguja de Verres en la cavidad abdominal para distender el abdomen mediante la introducción de CO₂ y facilitar así el acceso del trócar y cánula del endoscopio. Una vez distendido, se retiró la aguja de Verres y se le instaló un trócar de 10 mm para poder introducir el laparoscopio (Wolf paediatric 0°). Bajo la observación laparoscópica se insertó a través de la región inguinal una aguja epidural cerca de los ovarios. Retirado el fiador de la aguja se introdujo el catéter que contenía los embriones a transferir en uno de los oviductos, éstos fueron depositados en la zona ampular del oviducto. El procedimiento se repitió en el otro lado de la hembra para transferir los embriones al otro oviducto.



Figura 7. Colocación de la coneja en posición de cúbito para laparoscopia.

3.5.3 Viabilidad embrionaria: implantación embrionaria

La tasa de implantación embrionaria se determinó mediante laparoscopia. Doce días después de la transferencia embrionaria, las hembras receptoras fueron anestesiadas como se ha descrito anteriormente para mantener sedadas a las conejas durante el procedimiento con el fin de obtener la tasa de implantación.

Además, una vez finalizado el periodo de gestación de las hembras receptoras se llevó a cabo el recuento de nacidos vivos, tanto para aquellos embriones transferidos que provenían de hembras superovuladas nulíparas como para aquellos de hembras superovuladas múltiparas transferidos a hembras primíparas y los embriones de origen nulípara control, para posteriormente calcular el porcentaje de viabilidad, obteniéndose este porcentaje como número de nacidos vivos / número de embriones transferidos.

3.6.4 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software SPSS 16.0 (SPSS Inc; Chicago, Illinois, USA, 2002) considerando como datos significativos aquellos con un P-valor < 0.05. Se realizó un test de normalidad sobre los datos de expresión génica, normalizando los datos de la expresión de los genes objeto de este estudio (MSY2, MATER, ITPR1, ITPR2, ITPR3, eIF4E, PARN, PAPOL-A, PAPOL-G, ZAR e YY1) mediante una transformación angular. Para evaluar el efecto de la superovulación y la edad de la coneja sobre la tasa de ovulación y la expresión génica de los genes seleccionados, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) empleando un modelo lineal general que incluía como factores fijo grupo experimental (control NL, control ML, superovuladas NL, superovuladas ML).

Se utilizó un test de la *chi-cuadrado* con la corrección de *Yate's* para evaluar si el grupo experimental (superovuladas NL y superovuladas ML) afectaba al porcentaje de implantación y al porcentaje de viabilidad in vivo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Experimento 1: Análisis de la respuesta al tratamiento de superovulación

Para evaluar la respuesta al tratamiento de superovulación, se estudió la tasa de ovulación en los cuatro grupos experimentales (Figura 8).

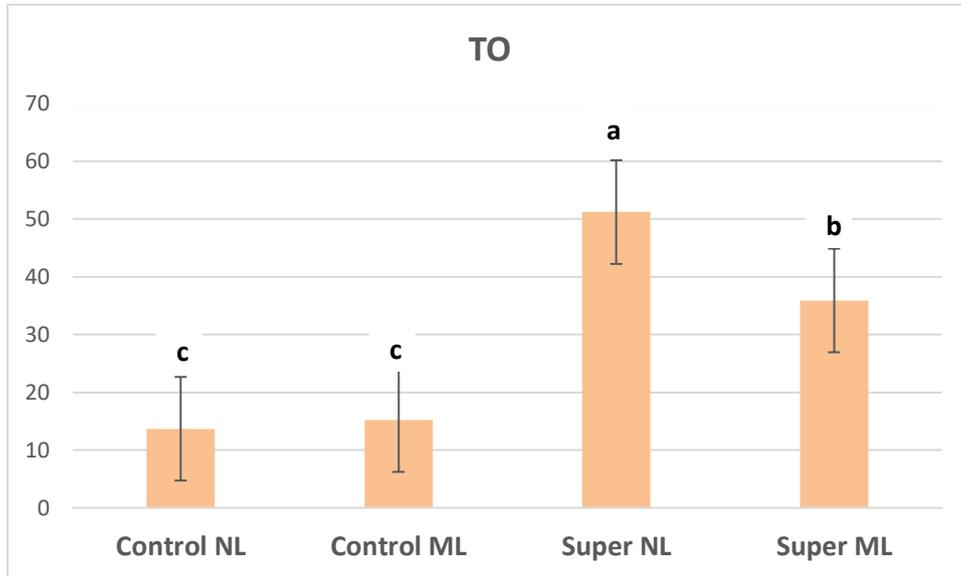


Figura 8. Tasa de ovulación para cada grupo experimental

Claramente se pueden observar diferencias significativas entre el grupo de hembras control y el grupo de hembras superovuladas, como era de esperar. Además, estas diferencias significativas también se encuentran entre los dos tipos de hembras superovuladas; nulíparas y múltiparas, por lo que se podría deducir que el tratamiento con gonadotropinas exógenas afecta de manera diferente a la tasa de ovulación generada en función del estado fisiológico de la hembra, siendo aquellas hembras nulíparas las que mejor tasa de ovulación presentan.

4.2 Experimento 1: Expresión génica de los ovocitos.

La expresión génica ha sido utilizada como herramienta para evaluar el efecto de la edad y de la superovulación sobre la calidad ovocitaria. De los 11 genes analizados (MSY2, MATER, ITPR1, ITPR2, ITPR3, eIF4E, PARN, PAPOL-A, PAPOL-G, ZAR e YY1), sólo en cuatro de ellos (MATER, PAPOL-A, PAPOL-G y ZAR) se encontraron diferencias significativas entre los óvulos de los distintos grupos experimentales. Estos genes fueron seleccionados por representar fases esenciales en la activación, maduración y desarrollo de ovocitos, transcripción del ARNm y transición ovocito-embrión.

MATER

Mater es un gen materno específico del ovocito requerido para el desarrollo temprano embrionario (Tong et al., 2000). Las primeras divisiones embrionarias dependen en gran medida de los transcritos y proteínas maternas como Mater sintetizadas durante la ovogénesis (Urrego et al., 2015). Ciertos estudios llevados a cabo con ratones knock-out para este gen han demostrado que estas hembras presentan un fenotipo normal, además de un desarrollo folicular, ovulación y fecundación normales, pero sus embriones no se desarrollan más allá de la etapa de dos células. Esto demuestra su papel esencial en el desarrollo preimplantacional del embrión (Pennetier et al., 2006).

Por tanto, las diferencias significativas observadas en la expresión génica relativa de este gen entre los cuatro grupos analizados parecen indicar que los tratamientos de superovulación, así como la edad de la hembra, podrían afectar a la expresión del gen, y por tanto, afectar negativamente a la calidad ovocitaria, puesto que el grupo de hembras control nulíparas, siendo este el grupo de referencia en cuanto a calidad ovocitaria se refiere, es el de mayor expresión génica, frente al resto de grupos en los que la expresión es más baja (Figura 9).

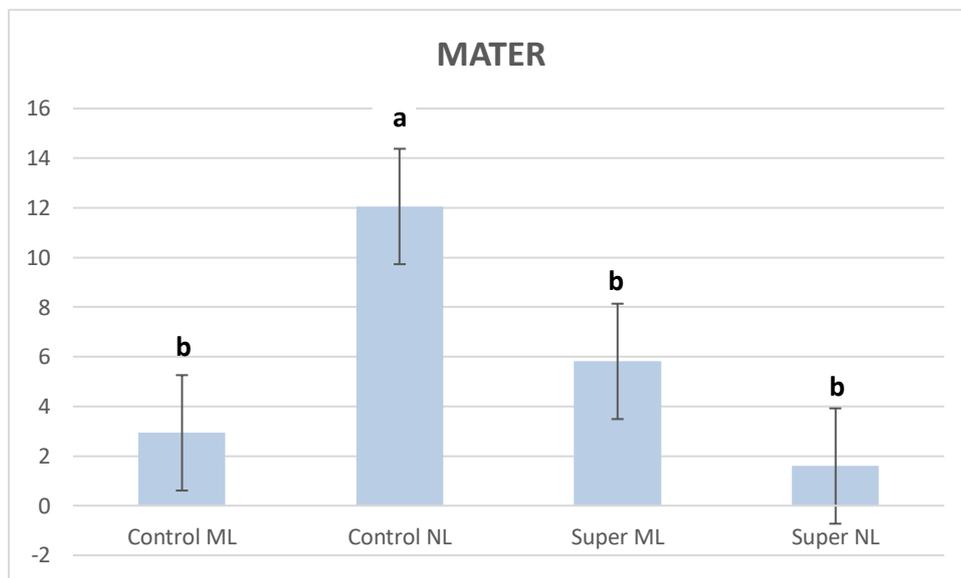


Figura 9. Expresión génica del gen MATER para cada grupo experimental

PAPOL-A

El gen PAPOL-A juega un papel importante en la activación y en la adquisición de la competencia del ovocito, así como en el desarrollo embrionario temprano (Dutta et al., 2016). En un estudio llevado a cabo por Chu et al. (2012) se vio una mayor abundancia de ARNm de este gen en ovocitos provenientes de hembras superovuladas, mientras que en hembras no superovuladas la cantidad era mucho menor. Así, la superovulación parece alterar la abundancia de ARNm de genes importantes en la regulación de la transcripción y traducción de proteínas del ovocito, que podrían comprometer el desarrollo de embriones tempranos.

En el presente experimento, se han observado mayores niveles de expresión del gen en el grupo de hembras superovuladas nulíparas, sin embargo, las diferencias de expresión entre el grupo de hembras superovuladas nulíparas y control múltíparas, no llegan a ser estadísticamente significativas (Figura 10). Se podría pensar que la estimulación ovárica no tiene

un impacto en la fecundación, sino más bien en el desarrollo embrionario posterior. De esta forma, se podría decir que este gen está potencialmente asociado a la competencia del desarrollo asociada con el origen del ovocito y que las diferencias encontradas en los niveles de expresión en los ovocitos pueden ser un efecto de la estimulación ovárica y pueden representar la respuesta del ovocito a la perturbación del ambiente folicular.

Además, la enzima poli(A) polimerasa genera una deadenilación progresiva durante la maduración de ovocitos, lo que supone una disminución del ARNm almacenado en esta etapa, necesario en las fases iniciales de desarrollo embrionario. En este estudio se ha detectado mayor nivel de expresión del gen en ovocitos superovulados, de tal manera que la superovulación parece alterar la abundancia de ARNm de genes importantes en la regulación de la transcripción y traducción de proteínas del ovocito, lo que podría comprometer el desarrollo de embriones tempranos. Por tanto, se podría pensar que al haber más expresión del gen, hay una mayor deadenilación durante la maduración del ovocito, lo que conlleva a un menor almacenamiento de ARNm durante el desarrollo del ovocito que debe ser empleado en las etapas iniciales del desarrollo embrionario, o ARNm más cortos que conllevarían a una menor competencia de desarrollo de los óvulos.

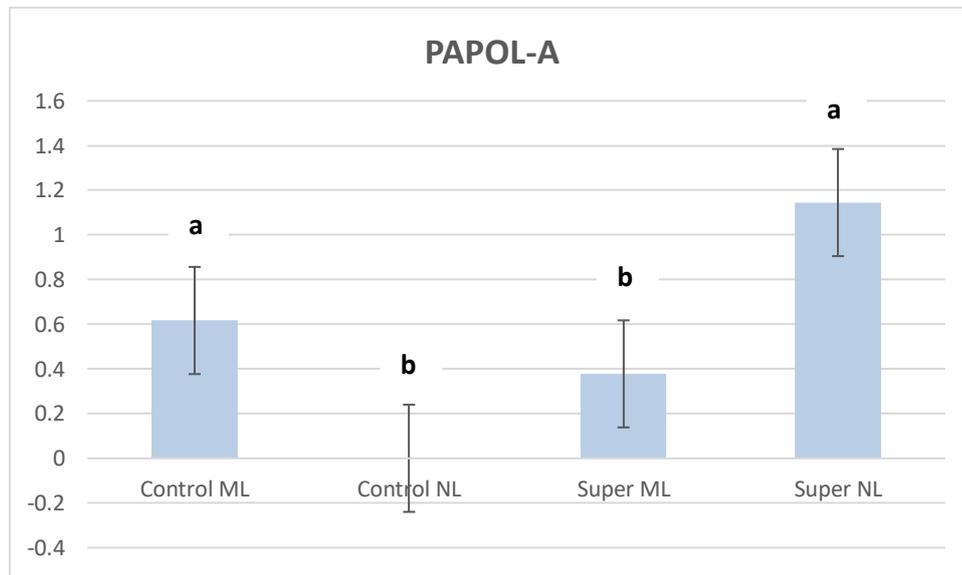


Figura 10. Expresión génica del gen PAPOL-A para cada grupo experimental

PAPOL-G

Una de las pocas ADN polimerasas conocidas en mamíferos hasta ahora es la ADN polimerasa gamma (Bolden et al., 1977). La enzima poli(A) polimerasa gamma, al igual que la anteriormente mencionada poli(A) polimerasa alfa, se piensa que está involucrada en la síntesis y replicación de DNA mitocondrial (Konpf et al., 1976) y mutaciones en esa enzima están asociadas con multitud de enfermedades mitocondriales (Stumpf et al., 2018) que, por lo general, causan la muerte en la infancia temprana, además de estar relacionadas con la infertilidad masculina (Sohl et al., 2013). Además, las mitocondrias producen la mayoría de ATP en las células eucariotas como resultado de la fosforilación oxidativa (Stumpf et al., 2011), por lo que un mal funcionamiento de la enzima conduce a una reducción del ADN mitocondrial y del metabolismo celular (Lee et al., 2010). Además, como ya se ha comentado anteriormente, las mitocondrias no sólo están implicadas en la síntesis de ATP, sino que también participan en la señalización del calcio para permitir la segregación cromosómica, fecundación y posterior desarrollo embrionario (Cree et al., 2015).

En el presente estudio, se han detectado mayores niveles de expresión génica en el grupo control nulípara (grupo referente de calidad ovocitaria) frente al resto de los grupos de estudio (Figura 11). Se podría pensar que el tratamiento de superovulación, así como la edad de la hembra podrían dañar la función mitocondrial necesaria para aportar al óvulo la energía necesaria para llevar a cabo las transformaciones que siguen la fecundación, así como alterar la señalización del calcio, lo que podría repercutir en el potencial de implantación del embrión, así como en la viabilidad de la gestación.

Además, tal y como se ha comentado anteriormente, estas diferencias de expresión encontradas tanto para PAPOL-A, como para PAPOL-G hacen pensar que la superovulación puede provocar alteraciones mitocondriales, que conducirán a una menor síntesis de ATP y una alteración en la ruta de señalización del calcio, lo que afectará negativamente a la calidad ovocitaria y al desarrollo embrionario.

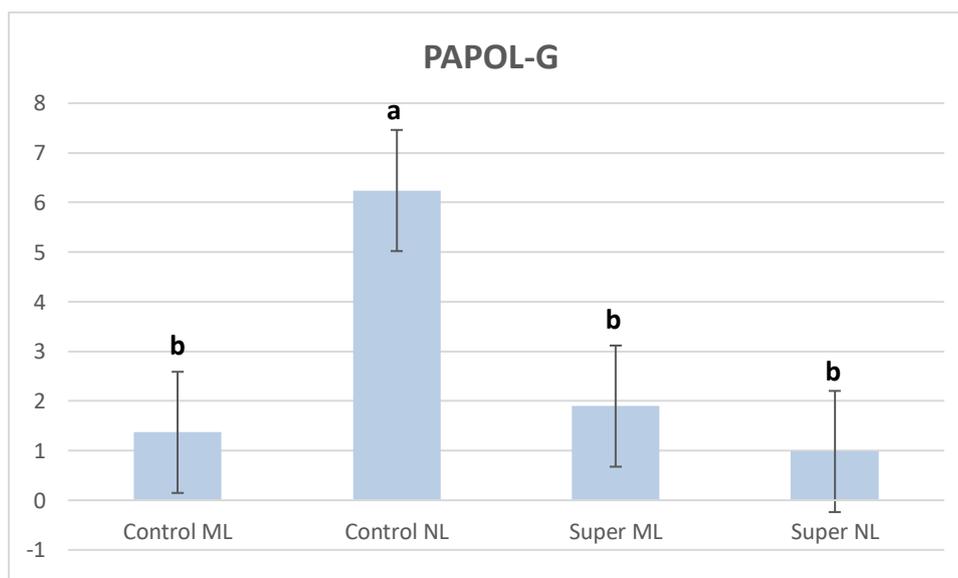


Figura 11. Expresión génica del gen PAPOL-G para cada grupo experimental

ZAR1

Las proteínas de la familia ZAR están implicadas en el desarrollo temprano del embrión y la transición ovocito - embrión (Yamamoto et al., 2013). Este gen se expresa en embriones hasta la etapa de dos células y después desaparece, lo que sugiere un papel crítico del gen en la transición ovocito-embrión (Wu et al., 2003). Es considerado un marcador específico de ovocitos y su expresión es necesaria tanto para la maduración y crecimiento de ovocitos, como para el desarrollo embrionario temprano (Sugito et al., 2013). Además, reprime la traducción de ovocitos inmaduros (Yamamoto et al., 2013).

Los resultados obtenidos en el presente experimento se ajustan a lo inicialmente esperado, puesto que se han detectado mayores niveles de expresión en el grupo control nulíparas, de referencia de calidad ovocitaria frente al resto de grupos experimentales (Figura 12). Se podría pensar, por tanto, que los tratamientos de superovulación podrían alterar la calidad ovocitaria. Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas entre los dos grupos de hembras superovuladas, nulíparas y múltiparas.

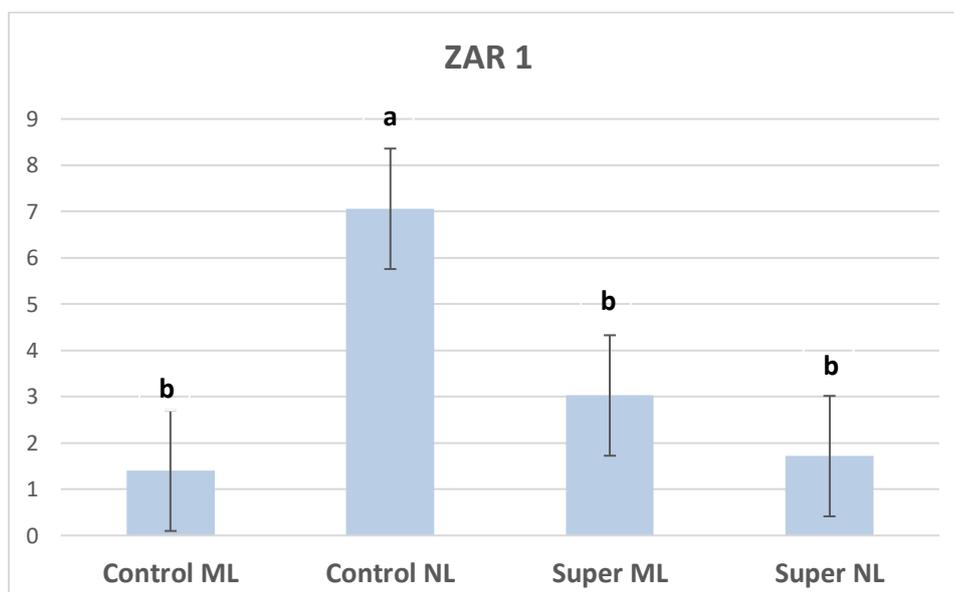


Figura 12. Expresión génica del gen ZAR1 para cada grupo experimental

El análisis estadístico de los datos normalizados indicó que tanto en el gen MATER, PAPOL-G, como ZAR1 se han visto diferencias significativas entre el grupo de hembras control nulíparas frente al resto de grupos experimentales. Por otra parte, el grupo de hembras control múltiparas que no han recibido tratamiento presentan expresión similar a las hembras superovuladas múltiparas, por lo que se podría pensar que la edad de las hembras, cuando estas son sometidas a tratamientos de superovulación, no altera significativamente la calidad de los ovocitos en cuanto a la expresión génica de los genes seleccionados en este estudio.

Los genes seleccionados son fundamentales en la maduración y adquisición de la competencia de los ovocitos, por lo que alteraciones en su expresión podrían dar lugar a fallos en el posterior desarrollo embrionario e implantación. Es por esto, por lo que tras los resultados

obtenidos en este primer ensayo es de esperar que la estimulación ovárica con hormonas exógenas podría estar alterando algunos de los procesos que tiene lugar en el ovocito durante su desarrollo, lo que podría suponer una pérdida de calidad ovocitaria y podría conllevar fallos de fecundación y alteraciones del desarrollo embrionario.

4.3 Experimento 3: Análisis de viabilidad de embriones

Como ya se ha comentado anteriormente, una calidad óptima de los ovocitos es necesaria para conseguir embriones con mayor capacidad de implantar en el útero materno, así como conseguir llevar a cabo el desarrollo embrionario y obtener embriones viables. Para corroborar los resultados obtenidos en el primer experimento, se llevó a cabo un segundo ensayo en el que se quiso evaluar el efecto de la superovulación y la edad de la coneja sobre la tasa de implantación y el porcentaje de viabilidad de estos embriones in vivo, siendo este porcentaje de viabilidad calculado como número de gazapos nacidos / número de embriones transferidos.

En este segundo ensayo, un total de 97 embriones de hembras control nulíparas fueron transferidos a 8 hembras receptoras primíparas. De estos, se obtuvo un 80% de tasa de implantación y un 74% de viabilidad, analizando el número de nacidos vivos. Por su parte, en el segundo grupo experimental, donde se transfirieron 114 embriones de hembras superovuladas nulíparas a 9 hembras receptoras primíparas, se obtuvo un 75% de tasa de implantación, así como un 71% de viabilidad. Finalmente, en el tercer grupo experimental, donde 103 embriones de hembras superovuladas múltiparas fueron transferidos a 8 hembras receptoras primíparas, se obtuvo un 64% de tasa de implantación y un 53% de viabilidad. Estos datos se muestran en las figuras 13 y 14.

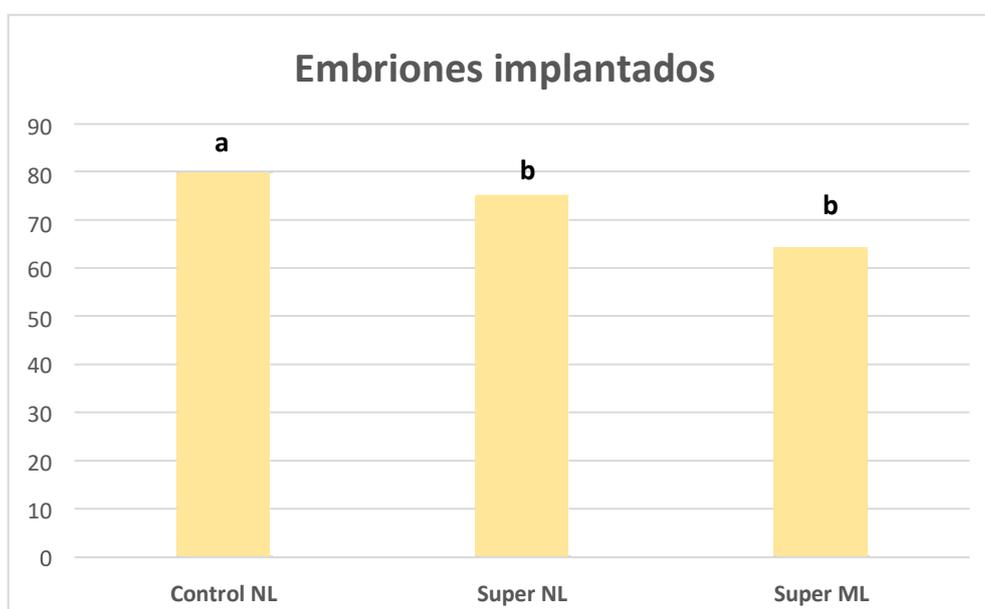


Figura 13. Tasa de implantación para cada grupo experimental

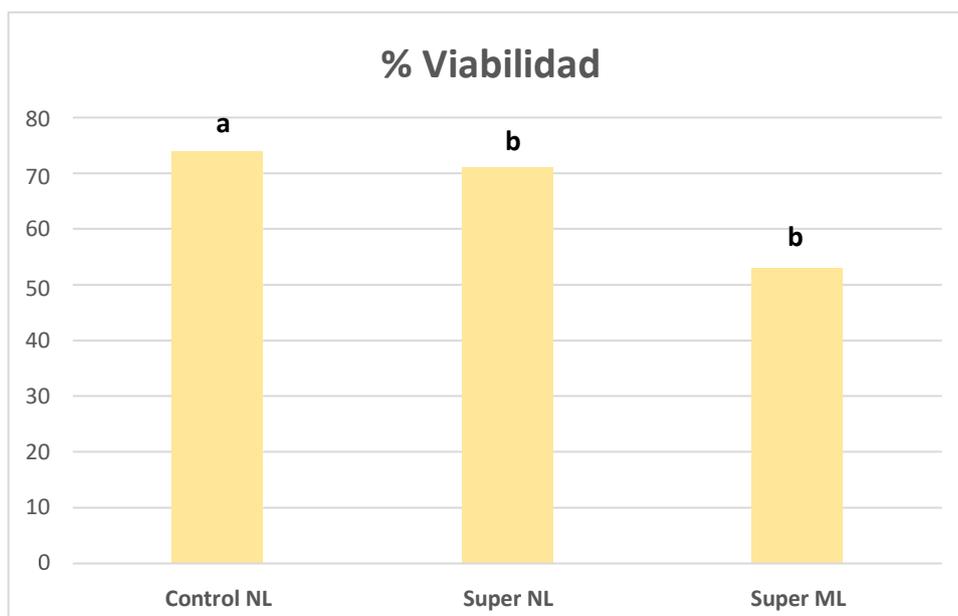


Figura 14. Porcentaje de viabilidad para cada grupo experimental

Los resultados obtenidos en este segundo experimento son similares a los obtenidos en el primer ensayo, encontrando diferencias significativas entre el grupo de hembras control y el grupo al que se le ha aplicado un tratamiento de superovulación tanto para la tasa de implantación, como para el porcentaje de viabilidad. De esta manera, se podría pensar que la superovulación con hormonas exógenas puede alterar el ambiente del ovocito, lo que podría afectar negativamente a la calidad de este. Así, se observa como las alteraciones en los parámetros de calidad medidos mediante la expresión génica de los genes seleccionados se ven reflejados en alteraciones en los embriones. Así, los grupos de ovocitos provenientes de tratamientos de superovulación, independientemente de la edad de la hembra, presentan alteraciones en los genes relacionados con la maduración ovocitaria y la adquisición de competencia del ovocito, y estas alteraciones parecen estar afectando al desarrollo embrionario. Por todo ello, los tratamientos de superovulación parecen estar alterando al ovocito y comprometiendo la viabilidad de los embriones, afectando a la fertilidad de las hembras sometidas a estos tratamientos.

5. CONCLUSIONES

De la discusión de los resultados obtenidos en el presente estudio, se pueden deducir las siguientes conclusiones:

- ✓ El tratamiento de superovulación genera una respuesta superovulatoria, siendo ésta mayor en hembras superovuladas nulíparas frente a hembras superovuladas multíparas y controles. Además, esta estimulación ovárica parece afectar a la calidad ovocitaria, ya que se observan diferencias significativas en la expresión génica de un grupo de genes seleccionados relacionados con la calidad ovocitaria (MATER, PAPOL-A, PAPOL-G Y ZAR1), entre ovocitos de hembras control y hembras superovuladas. Sin embargo, la edad en hembras superovuladas no parece ser un factor determinante en la calidad ovocitaria.
- ✓ Los embriones de hembras no superovuladas nulíparas presentan mayores tasas de implantación y viabilidad que los embriones de hembras superovuladas. Sin embargo, la edad de las hembras superovuladas no parece alterar los porcentajes de implantación y viabilidad obtenidos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Arias-Álvarez, M., García-García, R.M., Torres-Rovira, L., González-Bulnes, A., Rebollar, P.G., Lorenzo, P.L. (2010). Influence of hormonal and nonhormonal estrus synchronization methods on follicular and oocyte quality in primiparous lactating does at early postpartum period. *Theriogenology*, 73(1), 26-35.
- Arias-Álvarez, M., García-García, R.M., López-Tello, J., Rebollar, P.G., Gutiérrez-Adán, A., Lorenzo, P.L. (2016). In vivo and in vitro maturation of rabbit oocytes differently affects the gene expression profile, mitochondrial distribution, apoptosis and early embryo development. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(9), 1667-1679.
- Ashrafi, M., Amirchaghmaghi, E., Arabipoor, A., Vesali, S., Salman-Yazdi, R. (2018). The effects of superovulation with gonadotropins on autoantibody levels in patients undergoing assisted reproductive cycles. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 1-7.
- Ashry, M., Lee, K., Mondal, M., Datta, T.K., Folger, J.K., Rajput, S.K., Zhang, K., Hemedia, N.A., Smith, G.W. (2015). *Mol. Reprod. Dev*, 82(3), 251-64.
- Bakker J. y Baum, M.J. (2000). Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. *Frontiers in neuroendocrinology*, 21(3), 220–262.
- Balasubramanian, P., Jagannathan, L., Subramanian, M., Gilbreath, E. T., MohanKumar, P. S., MohanKumar, S. M. J. (2012). High fat diet affects reproductive functions in female diet- induced obese and dietary resistant rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 24, 748–755.
- Behringer, R., Gertsenstein, M., Nagy, K.V., Nagy, A. (2018). Administration of Gonadotropins for Superovulation in Mice. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018(1).
- Boland, M. P., Lonergan, P., & O’Callaghan, D. (2001). Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology and oocyte and embryo development. *Theriogenology*, 55, 1323–1340.
- Bolden, A., Noy, G.P., Weissbach, A. (1977). DNA polymerase of mitochondria is a gamma-polymerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 252, 3351-3356.
- Broughton, D., Moley, K. (2017). Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact. *American Society for Reproductive Medicine*, 107.
- Capalbo, A., Hoffmann, E.R., Cimadomo, D., Ubaldi, F.M., Rienzi, L. (2017). Human female meiosis revised: new insights into the mechanisms of chromosome segregation and aneuploidies from advanced genomics and time-lapse imaging. *Hum Reprod Update*, 23(6), 706-722.
- Chu, T., Dufort, I., Sirard, M.A. (2012). Effect of ovarian stimulation on oocyte gene expression in cattle. *Theriogenology*, 77(9), 1928-1938.
- Cree L.M., Hammond, E.R., Shelling, A.N., Berg, M.C., Peek, J.C., Green, M.P. (2015). Maternal age and ovarian stimulation independently affect oocyte mtDNA copy number and cumulus cell gene expression in bovine clones. *Human Reproduction*, 30(6), 1410-1420.
- Cortell, C., Vicente, J.S., Mocé, E., Marco-Jiménez, F., Viudes De Castro, M.P. (2010). Efficiency of Repeated In Vivo Oocyte and Embryo Recovery After rhFSH Treatment in Rabbits. *Reprod Dom Anim*, 45, 155–159.

Cortell, C., Salvetti, P., Joly, T., Viudes-de-Castro, M.P. (2014). Effect of different superovulation stimulation protocols on adenosine triphosphate concentration in rabbit oocytes. *Zygote*, 23(4), 507-513.

Cota, A., Oliveira J., Petersen, C., Mauri, A., Massaro, F., Silva, L., Nicoletti, A., Cavagna, M., Baruffi, R., Franco, J. (2012). GnRH agonist versus GnRH antagonist in assisted reproduction cycles: oocyte morphology. *Reprod Biol Endocrinol*, 10(33).

Daoud, N.M., Mahrous, K.F., Ezzo, O.H. (2012). Feed restriction as a biostimulant of the production of oocyte, their quality and GDF-9 gene expression in rabbit oocytes, 136(1-2), 121-127.

De Bem, T., Adona P.R., Bressan F.F., Mesquita L.G., Chiaratti M.R., Meirelles F.V., Leal C. (2014). The influence of morphology, follicle size and Bcl-2 and Bax transcripts on the developmental competence of bovine oocytes. *Reprod Domest Anim*, 49(4), 576-583.

Dutta, S., Sengupta, P. (2018). Rabbits and men: relating their ages. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 29.

Dutta, D.J., Raj, H., Dev, A.H. (2016). Polyadenylated tail length variation pattern in ultra-rapid vitrified bovine oocytes, 9(10), 1070-1074.

Fischer, B., Chavatte-Palmer, P., Vilebahn, C., Navarrete-Santos, A., Duranthon, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*, 144(1), 1-10.

Friday, A.J., Henderson, M.A., Morrison, J.K., Hoffman, J.L., Keiper, B.D. (2015). Spatial and temporal translational control of germ cell mRNAs mediated by the eIF4E isoform IFE-1. *J Cell Sci*, 128(24), 4487-4498.

Georgiou, E.X., Melo, P., Brown, J. and Granne, I. (2018). Follicular flushing during oocyte retrieval in assisted reproductive techniques. *Cochrane Database Syst Rev*, 4.

Geyer, A., Daub, L., Otzdorff, C., Reese, S., Braun, J., Walter, B. (2016). Reversible estrous cycle suppression in prepubertal female rabbits treated with slow-release deslorelin implants. *Theriogenology*, 85(2), 282-7.

Gilchrist, R. B.; Lane, M.; Thompson, J. G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*, 14(2), 159-177.

González-Mariscal, G., McNitt, J. I., Lukefahr, S.D. (2007). Maternal care of rabbits in the lab and on the farm: Endocrine regulation of behavior and productivity. *Hormones and Behavior*, 52(1), 86-91.

Griffith, G.J., Trask, M.C., Hiller, J., Walentuk, M., Pawlak, J.B., Tremblay, K.D., Mager, J. (2011) Yin-yang1 is required in the mammalian oocyte for follicle expansion. *Biol Reprod*, 84(4), 654-653.

Harcourt-Brown, F.M. (2017). Disorders of the reproductive tract of rabbits. *Vet Clin Exot Anim*, 20, 555-587.

Hendriks, W.K., Colleoni, S., Galli, C., Paris, D.B., Colenbrander, B., Roelen, B.A., Stout, T.A. (2015). Maternal age and in vitro culture affect mitochondrial number and function in equine oocytes and embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 27, 957-968.

- Hur, Y.S., Ryu, E.K., Park, S.J., Yoon, J., Yoon, S.H., Yang, G.D., Hur, C.Y., Lee, W.D., Lim, J.H. (2015). Development of a security system for assisted reproductive technology (ART). *J Assist Reprod Genet*, 32(1), 155-168.
- Kafi, M., McGowan, M.R. (1997). Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim Reprod Sci*, 48(2-4), 137-57.
- Kamaruzaman, N.A.; Kardia, E.; Kamaldin, N.; Latahir, A.Z.; Yahaya, B.H. (2013). "The rabbit as a model for studying lung disease and stem cell therapy". *Biomed Research International*. 69, 18-30.
- Kedem-Dickman, A., Maman, E., Yung, Y., Yerushalmi, G., Hemi, R., Hanochi, M., Dor, J., Hourvitz, A. (2012). Anti-Müllerian hormone is highly expressed and secreted from cumulus granulosa cells of stimulated preovulatory immature and atretic oocytes. *Reprod Biomed Online*, 24(5), 540-546.
- Keshavarzi, S., Salehi, M., Farifteh-Nobijari, F., Hosseini, T., Hosseini, S., Ghazifard, A., Ghaffari Novin, M., Fallah-Omrani, V., Nourozian, M., Hosseini, A. (2018). Melatonin modifies histone Acetylation during in vitro maturation of mouse oocytes. *Cell J.*, 20(2), 244-249.
- Kim, S., Jo, J., Kim, D. (2017) The effectiveness, safety, and economic evaluation of Korean medicine for unexplained infertile women: A multi-center, prospective, observational study protocol. *Medicine*, 96(51).
- Knopf, K.W., Yamada, M., Weissbach, A. (1976). HeLa Cell DNA Polymerase 7: Further Purification and Properties of the Enzyme. *Biochemistry*, 15(20), 4540-4548.
- Krisher, R. (2013). In Vivo and In Vitro Environmental Effects on Mammalian Oocyte Quality. *Annu. Rev. Anim. Biosci*, 1, 393-417.
- Lee, M., Ahn, J.I., Lee, A.R., Ko, D.W., Yang, W.S., Lee, G., Ahn, J.Y., Lim, J.M. (2017). Adverse Effect of Superovulation Treatment on Maturation, Function and Ultrastructural Integrity of Murine Oocytes. *Mol Cells*, 40(8), 558-566.
- Lee, Y.S., Johnson, K., Molineux, I., Yin, Y. (2010). A Single Mutation in Human Mitochondrial DNA Polymerase Pol gammaA Affects Both Polymerization and Proofreading Activities of Only the Holoenzyme. *J Biol Chem*, 285(36), 28105-208116.
- Li, G.P., Lian, L., Wang, M.K., Lian, Y., Chen, D.Y. (2001). Maturation of the reconstructed oocytes by germinal vesicle transfer in rabbits and mice. *Theriogenology*, 56, 855-866.
- Lin, Y.H., Hwang, J.L., Seow, K.M., Huang, L.W., Hsieh, B.C., Chen, H.J., Tzeng, C.R., Bai, C.H. (2011). Effect of incubation with different concentrations and durations of FSH for in-vitro maturation of murine oocytes. *Reprod Biomed Online*, 23(1), 111-117.
- Lonergan, P. (2011). Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology*, 76(9), 1594-60.
- Lu, Y., He, X., Zheng, P. (2016). Decrease in expression of maternal effect gene *Mater* is associated with maternal ageing in mice. *Molecular Human Reproduction*, 22(4), 252-260.

- Lunn, M.O., Wright, S.J. (2013). Distinct subtypes of zona pellucida morphology reflect canine oocyte viability and cumulus-oocyte complex quality, *Theriogenology*, 80(5), 498-506.
- Marco, F., Vicente, J.S., Lavara, R., Balasch, S., Viudes-De-Castro, M.P. (2010). Poor prediction value of sperm head morphometry for fertility and litter size in rabbit. *Repro Domest Anim*, 45(5), 118-123.
- Mehaisen G.M., Viudes-de-Castro, M.P., Vicente, J.S., Lavara, R. (2006). In vitro and in vivo viability of vitrified and non-vitrified embryos derived from eCG and FSH treatment in rabbit does. *Theriogenology*, 65(7), 1279-1291.
- Moussa, M., Shu, J., Zhang, X. H., & Zeng, F. (2015). Maternal control of oocyte quality in cattle "a review". *Animal Reproduction Science*, 155, 11–27.
- Penitente-Filho, J., Jimenez C., Zolini, A., Carrascal E, Azevedo, J., Silveira, C., Oliveira, F., Torres C. (2015). Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes. *Anim Sci J*, 86(2), 148-152.
- Pennetier, S., Perreau, C., Uzbekova, S., Thélie, A., Delaleu, B., Mermillod, P., Dalbiès-Tran, R. (2006). MATER protein expression and intracellular localization throughout folliculogenesis and preimplantation embryo development in the bovine. *BMC Dev Biol*, 6(26).
- Perkins, A.T., Das, T.M., Panzera, L.C., Bickel, S.E. (2016). Oxidative stress in oocytes during midprophase induces premature loss of cohesion and chromosome segregation errors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(44).
- Roberts, R., Latropoulou, A., Ciantar, D., Stark, J., Becker, D.L., Franks, S., Hardy, K. (2005). Follicle-Stimulating Hormone Affects Metaphase I Chromosome Alignment and Increases Aneuploidy in Mouse Oocytes Matured in Vitro. *Biology of Reproduction*, 72(1), 107-118.
- Rodríguez, H. L. (1999). Aspectos reproductivos de los conejos. Universidad de Puerto Rico.
- Rodríguez, T.M. (2004). Inducción de la ovulación. *Boletín de cunicultura*, 134, 51-54.
- Salveti, P., Theau-Clément, M., Beckers, J.F., Hurtaud, J., Guérin, P., Neto, V., Falières, J., Joly, T. (2007). Effect of the luteinizing hormone on embryo production in superovulated rabbit does. *Theriogenology*, 67(6), 1185-1193.
- Sauer, M.V. (2015). Reproduction at an advanced maternal age and maternal health. *Fertil Steril*, 103(5), 1136-1143.
- Sirard, M.A., Richard, F., Blondin, P., Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65(1), 126-136.
- Sohl, C.D., Kasiviswanathan, R., Copeland, W.C., Anderson, K.S. (2013). Mutations in human DNA polymerase γ confer unique mechanisms of catalytic deficiency that mirror the disease severity in mitochondrial disorder patients. *Hum Mol Genet*, 22(6), 1074-1085.
- Sohrabi, M., Mohammadi Roushandeh, A., Alizadeh, Z., PhD, Vahidinia, A., Vahabian, M., Hosseini, M. (2015). Effect of a high fat diet on ovary morphology, in vitro development, in vitro fertilisation rate and oocyte quality in mice. *Singapore Med J*, 56(10), 573-579.

Stübinger, S., Dard, M. (2013). "The Rabbit as Experimental Model for Research in Implant Dentistry and Related Tissue Regeneration." *Journal of Investigative Surgery*, 26, 266-282.

Stumpf, J., Copeland, W. (2011). Mitochondrial DNA replication and disease: insights from DNA polymerase γ mutations. *Cell Mol Life Sci*, 68(2), 219-233.

Stumpf, J., Saneto, R., Copeland, W. (2018). Clinical and Molecular Features of POLG-Related Mitochondrial Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(4).

Sudiman, J., Ritter, L., Feil, D., Wang, X., Chan, K., Mottershead, D., Robertson, D., Thompson, J., Gilchrist, R. (2014). *J Assist Reprod Genet*, 31(3), 295-306.

Sugito, K., Kawashima, H., Yoshizawa, S., Uekusa, S., Hoshi, R., Furuya, T., Kaneda, H., Hosoda, T., Konuma, N., Masuko, T., Ohashi, K., Ikeda, T., Koshinaga, T., Tomita, R., Shinojima, Y., Fujiwara, K., Watanabe, T., Held, W.A., Nagase, H. (2013). Non-promoter DNA hypermethylation of Zygote Arrest 1 (ZAR1) in neuroblastomas. *J Pediatr Surg*. 48(4),782-788.

Taheri, F., Alemzadeh Mehrizi, A., Khalili, M.A., Halvaei, I. (2018). The influence of ovarian hyperstimulation drugs on morphometry and morphology of human oocytes in ICSI program, *Taiwan J Obstet Gynecol*, 57(2), 205-210.

Tong, Z.B., Gold, L., Pfeifer, K.E., Dorward, H., Lee, E., Bondy, C.A., Dean, J., Nelson, L.M. (2000). Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice, 26(3), 267-268.

Urrego, R., Herrera-Puerta, E., Chavarria, N.A., Camargo, O., Wrenzycki, C., Rodriguez-Osorio, N. (2015). Follicular progesterone concentrations and messenger RNA expression of MATER and OCT-4 in immature bovine oocytes as predictors of developmental competence, 83 (7), 1179-1187.

Utter, C.J., Garcia, S.A., Milone, J., Bellofatto, V. (2011). PolyA-specific ribonuclease (PARN-1) function in stage-specific mRNA turnover in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*, 10(9), 1230-1240.

Uyar, A., Torrealday, S., Seli, E. (2013). Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertility and Sterility*, 99(4), 979-997.

Uysal, F., Ozturk, S., Akkoyunlu, G. (2017). Superovulation alters DNA methyltransferase protein expression in mouse oocytes and early embryos. *J Assist Reprod Genet*, 35(3),503-513.

Vicente, J.S., Lavara, R., Marco, F., Viudes-De-Castro, M.P. (2011). Detrimental effect on availability of buserelin acetate administered in seminal doses in rabbits. *Theriogenology*, 76(6), 1120-1125.

Vicente, J.S., Ximénez, F.G. (1994). Control hormonal de la reproducción. Conservación de gametos y embriones.

Viudes De Castro, M.P., Cortell, C. Mocé, E., F. Marco-Jiménez, F., Joly, T. Vicente, J.S. (2009). Effect of recombinant gonadotropins on embryo quality in superovulated rabbit does and immune response after repeated treatments. *Theriogenology*, 72(5), 655-662.

Wiel, C., Lallet-Daher, H., Gitenay, D., Gras, B., Le Calvé, B., Augert, A., Ferrand, M., Prevarskaya, N., Simonnet, H., Vindrieux, D., Bernard, D. (2014). Endoplasmic reticulum calcium release through ITPR2 channels leads to mitochondrial calcium accumulation and senescence. *Nat Commun*, 5, 3792.

Wu, X., Viveiros, M.M., Eppig, J.J., Bai, Y., Fitzpatrick, S.L., Matzuk, M.M. (2003). Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nat Genet*, 33(2), 187-91.

Yamada, K., Hiradate, Y., Goto, M., Nishiyama, C., Hara, K., Yoshida, H. (2018). Potassium bromate disrupts mitochondrial distribution within murine oocytes during in vitro maturation. *Reprod Med Biol*, 17, 143–148.

Yamamoto, T.M., Cook, J.M., Kotter, C.V., Khat, T., Silva, K.D., Ferreyros, M., Holt, J.W., Knight, J.D., Charlesworth, A. (2013). Zar1 represses translation in *Xenopus* oocytes and binds to the TCS in maternal mRNAs with different characteristics than Zar2. , 1829(10), 1034-1046.

Yu, J., Deng, M., Medvedev, S., Yang, J., Hecht, N. B., & Schultz, R. M. (2018). Transgenic RNAi-mediated reduction of MSY2 in mouse oocytes results in reduced fertility. *Developmental Biology*, 268, 195–206.

Zebitay A.G., Cetin, O., Verit, F.F., Keskin, S., Sakar M.N., Karahuseyinoglu, S., Ilhan, G., Sahmay, S. (2017). The role of ovarian reserve markers in prediction of clinical pregnancy. *J Obstet Gynaecol*, 37(4), 492-497.