



TESIS DOCTORAL

**Caracterización del fluido folicular y oviductal equino:
aplicación a las técnicas de fecundación *in vitro***

Characterization of equine follicular and oviductal fluid: application
to *in vitro* fertilization techniques

Pablo Fernández Hernández

PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA Y ANIMAL POR LA UNIVERSIDAD DE
EXTREMADURA

Conformidad de los directores:

Fdo: **Dra. Beatriz Macías García**

Fdo: **Dr. Lauro González Fernández**

Esta tesis cuenta con la autorización de la directora y del codirector de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

AÑO 2023

Resumen	2
Abstract.....	5
Lista de abreviaturas.....	7
Introducción.....	8
1. Gametos.....	8
1.1. Ovocito	9
1.2. Espermatozoide.....	11
1.2.1. Capacitación espermática.....	12
• Cambios en la membrana plasmática.....	12
• Bicarbonato y calcio	13
• pH	14
• Especies reactivas de oxígeno	15
1.2.2. Motilidad hiperactivada o hipermotilidad	16
1.2.3. Reacción acrosómica	17
2. Obtención de gametos.....	18
2.1. Ovocitos <i>in vivo</i>	19
2.2. Ovocitos <i>Post mortem</i>	21
2.3. Semen.....	22
3. Maduración de ovocitos <i>in vitro</i>	23
4. Fecundación <i>in vitro</i>	26
5. Cultivo <i>in vitro</i>	33
6. Ambiente Folicular.....	34
7. Ambiente Oviductal	40
8. Hallazgos recientes	46
Justificación.....	48
Objetivos	49
Material, Métodos y Resultados	50
Discusión	83
Conclusiones	99
Conclusions	100
Agradecimientos	101
Bibliografía	102

Resumen

El desarrollo de las técnicas de fecundación *in vitro* nos ha permitido producir embriones en el laboratorio en diferentes especies domésticas. Un paso importante en el avance de la producción de embriones *in vitro* ha sido el diseño de protocolos de maduración *in vitro* de ovocitos. El incremento del número de ovocitos madurados disponibles para ser fecundados *in vitro* ha propiciado que las técnicas de producción de embriones sean rentables y que sean usadas de forma rutinaria en numerosas especies domésticas incluida la equina.

Sin embargo, para conseguir resultados exitosos en el laboratorio es necesario conocer el ambiente en el que la maduración del ovocito y la fecundación suceden de manera fisiológica. Los avances en el desarrollo de protocolos y medios de cultivo, tanto de maduración ovocitaria, como de fecundación *in vitro* conseguido en las especies domésticas, ha sido sin duda gracias a los estudios de la composición del fluido folicular y oviductal.

En el caballo, estos estudios son escasos, limitando la mejora de la eficiencia de las técnicas de reproducción *in vitro*. En base a lo anteriormente expuesto, en la presente Tesis Doctoral nos propusimos estudiar la composición del fluido folicular y oviductal. Los objetivos que nos planteamos fueron: 1 - Analizar la composición metabólica del fluido folicular pre-ovulatorio equino y compararla con la de los medios comerciales usados para la maduración *in vitro* de ovocitos equinos. 2 - Analizar y comparar la composición proteica del fluido oviductal pre- y post-ovulatorio equino. 3- Estudiar el efecto de diferentes concentraciones de metabolitos encontrados en el fluido oviductal post-ovulatorio sobre parámetros relacionados con la capacitación en espermatozoides equinos descongelados, y 4- Comprobar el efecto del fluido oviductal post-ovulatorio en la inducción de la fosforilación en residuos de tirosina en espermatozoides descongelados y en la fecundación *in vitro* convencional.

En el primer trabajo de esta Tesis Doctoral demostramos diferencias en cuanto a la cantidad y tipos de metabolitos encontrados entre los dos principales medios comerciales de maduración in vitro usados: *Tissue Culture Medium 199* y *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham* y el fluido folicular equino. Veintidós metabolitos fueron identificados en el fluido folicular pre-ovulatorio, y se comprobó que nueve metabolitos no están presentes en los medios comerciales de maduración estudiados: acetilcarnitina, carnitina, citrato, creatina, creatina fosfato, fumarato, glucosa-1-fosfato, histamina y lactato.

En el segundo trabajo caracterizamos y comparamos la proteómica del fluido oviductal pre-ovulatorio y post-ovulatorio procedente de yeguas *post mortem*. Este análisis demostró que existen diferencias significativas en el proteoma periovulatorio, encontrándose 15 proteínas menos abundantes y 156 más abundantes en el fluido oviductal post-ovulatorio comparado con el pre-ovulatorio, perteneciendo el 54,3% de éstas últimas a la categoría de exosomas extracelulares.

En el tercer trabajo valoramos el efecto de diferentes concentraciones de metabolitos encontrados en el fluido oviductal: mioinositol (5–25 mM), lactato (6–60 mM), glicina (0,1–5 mM), β -alanina (1–6 mM) e histamina (0,05–0,4 mM), sobre parámetros relacionados con la capacitación en los espermatozoides equinos descongelados. Estos metabolitos fueron añadidos, a las concentraciones encontradas en el fluido oviductal post-ovulatorio, a un medio capacitante, y se evaluó su efecto sobre la motilidad, el potencial de membrana mitocondrial, la viabilidad, la reacción acrosómica, la producción de especies reactivas de oxígeno y la fosforilación en residuos de tirosina. Los resultados obtenidos demostraron que estos metabolitos, a las concentraciones usadas, no ejercen ningún efecto en los parámetros evaluados en los espermatozoides equinos descongelados.

Por último, demostramos que la adición de fluido oviductal a una concentración de 0,125% (v/v) a un medio capacitante induce fosforilación en residuos de tirosina en los espermatozoides equinos descongelados, pero no se asocia a una fecundación exitosa.

Abstract

The development of *in vitro* fertilization techniques has allowed the production of embryos in the laboratory in different domestic species. A core step in the progress of *in vitro* embryo production has been the development of oocyte maturation protocols *in vitro*. The increase in the number of matured oocytes available for *in vitro* fertilization has made embryo production techniques profitable and are nowadays used routinely in many domestic species, including the horse.

However, to optimize the results obtained in the laboratory, it is necessary to increase our understanding regarding the environment in which oocyte maturation and fertilization occur physiologically. Optimization of current protocols and media composition for oocyte maturation and *in vitro* fertilization rely on the *in vivo* studies of the composition of the follicular and oviductal fluid in domestic species.

In the horse, these studies are scarce, limiting the efficiency of *in vitro* reproduction techniques. Based on the above, in this Doctoral Thesis we aimed to deepen current understanding on the composition of equine follicular and oviductal fluid. The aims proposed were: 1 - To analyze the metabolic composition of equine pre-ovulatory follicular fluid and compare it with the commercial media used for *in vitro* maturation of equine oocytes. 2 – To analyze and compare the protein composition of the equine pre- and post-ovulatory oviductal fluid. 3 - To study the effect of selected metabolite found in post-ovulatory oviductal fluid on parameters related to capacitation in frozen-thawed equine spermatozoa, and 4- To test the effects of post-ovulatory oviductal fluid on protein tyrosine phosphorylation induction in frozen-thawed sperm and to determine its usefulness in conventional *in vitro* fertilization assays.

In the first work of this Doctoral Thesis, we demonstrated differences in the amount and types of metabolites found between the two main commercial *in vitro* maturation media: Tissue

Culture Medium 199 and Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F – 12 Ham and equine follicular fluid. Twenty-two metabolites were identified in the follicular fluid; among these, nine metabolites namely acetylcarnitine, carnitine, citrate, creatine, creatine phosphate, fumarate, glucose-1-phosphate, histamine and lactate were not present in commercial maturation media.

In the second work we characterized and compared the proteomics of pre-ovulatory and post-ovulatory oviductal fluid from *post mortem* mares. This analysis showed that there were significant differences in the periovulatory proteome of equine oviductal fluid, finding 15 downregulated and 156 upregulated proteins in the post-ovulatory oviductal fluid compared to its pre-ovulatory counterpart. Interestingly, 54.3% of the proteins found in the pre-ovulatory OF belonged to the category of extracellular exosomes.

In the third paper we tested the effect of different concentrations of metabolites found in post-ovulatory oviductal fluid on capacitation-related events in thawed equine spermatozoa: myoinositol (5–25 mM), lactate (6–60 mM), glycine (0.1–5 mM), β -alanine (1–6 mM) and histamine (0.05–0.4 mM), based on the concentrations found in the post-ovulatory oviductal fluid. These metabolites were added to a capacitating medium, and their effect on motility, mitochondrial membrane potential, viability, acrosome reaction, reactive species of oxygen production and protein tyrosine phosphorylation were evaluated. The results demonstrated that these metabolites, at the concentrations used, did not exert any effect on the parameters analyzed.

Finally, we demonstrated that the addition of oviductal fluid to a capacitating medium at a concentration of 0.125% (v/v) induces protein tyrosine phosphorylation in thawed equine spermatozoa, but is not associated with successful fertilization.

Lista de abreviaturas

Ácido ribonucleico mensajero (ARN-m)	Lactato deshidrogenasa B, del inglés: <i>lactate dehydrogenase B (LADHB)</i>
Adenilato ciclasa soluble (ACs)	Hormona luteinizante, del inglés: <i>luteinising hormone (LH)</i>
Adenosín monofosfato cíclico (AMPc)	Maduración <i>in vitro</i> (MIV)
Aminoacilasa 1, del inglés: <i>aminoacylase 1 (ACY1)</i>	Metafase I (MI)
Albúmina sérica bovina, del inglés: <i>bovine serum albumin (BSA)</i>	Metafase II (MII)
Clusterina, del inglés: <i>clusterin (CLU)</i>	Miosina de cadena pesada 9, del inglés: <i>myosin heavy chain 9 (MYH9)</i>
Complejo cúmulo-ovocito (CCO)	Nucleótido difosfato quinasa B, del inglés: <i>nucleoside diphosphate kinase B (NME2)</i>
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F – 12 Ham (DMEM/F-12)</i>	Aspiración transvaginal ecoguiada, del inglés: <i>Ovum Pick Up (OPU)</i>
Gonadotropina coriónica equina, del inglés: <i>equine corionic gonadotropin (eCG)</i>	Proteína cinasa A, del inglés: <i>protein kinase A (PKA)</i>
Proteína de unión a ácidos grasos 3, del inglés: <i>fatty acid binding protein 3 (FABP3)</i>	Resonancia magnética nuclear de protones, del inglés: <i>proton nuclear magnetic resonance (H-NMR)</i>
Fecundación <i>in vitro</i> (FIV)	Fosforilación en residuos de tirosina, del inglés: <i>protein tyrosine phosphorylation (PY)</i>
Fluido folicular (FF)	Reacción acrosómica (RA)
Fluido oviductal (FO)	Especies reactivas de oxígeno (EROs)
Hormona folículo estimulante, del inglés: <i>follicle stimulating hormone (FSH)</i>	Secretoglobina, del inglés: <i>secretoglobin (SCGB1A1)</i>
Degradación de la vesícula germinal, del inglés: <i>germinal vesicle breakdown (GVBD)</i>	Suero fetal bovino (SFB)
Glutamina-fructosa 6 fosfato aminotransferasa, del inglés: <i>glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase 1, (GFPT1)</i>	<i>Tissue Culture Medium 199 (TCM 199)</i>
Glucagón-S-transferasa Mu 3, del inglés: <i>Glutathione S-transferase Mu 3 (GSTM3)</i>	Transgelina 2, del inglés: <i>transgelin 2, (TAGLN2)</i>
Inyección intracitoplasmática de espermatozoides, del inglés: <i>intracytoplasmic sperm injection (ICSI)</i>	Versican (VCAN)
	Vesícula germinal (VG)
	Zona pelúcida (ZP)

Introducción

El desarrollo de las técnicas de fecundación *in vitro* (FIV) nos ha permitido la producción de embriones *in vitro* en diferentes especies domésticas, incluida la equina. El principal enfoque para mejorar las técnicas de FIV en mamíferos ha estado orientado hacia el conocimiento del entorno en el que se produce la fecundación *in vivo*, para posteriormente intentar imitar este ambiente en el laboratorio (Niederberger et al., 2018).

Previo a la ovulación el ovocito madura en el interior del folículo, inmerso en el fluido folicular (FF), para posteriormente, en el momento de la ovulación, ser liberado al oviducto (Gerard et al., 2002). En el oviducto, el fluido oviductal (FO) induce los últimos cambios en el espermatozoide y en el ovocito previos a la fecundación, dando lugar a la posterior formación de un embrión (Ménézo et al., 2015).

En la especie equina, el conocimiento del ambiente fisiológico en el que se desarrolla la maduración del ovocito y la fecundación es limitado, al igual que la eficacia de las técnicas de FIV comparado con otras especies domésticas como la porcina, la bovina o la murina (Leemans et al., 2016). Por ello, es de vital importancia estudiar y describir estos ambientes y los fluidos involucrados, para poder optimizar los medios de cultivo y establecer las condiciones necesarias para conseguir protocolos eficaces de fecundación en esta especie.

1. Gametos

Para la fecundación y el posterior desarrollo de un embrión es necesario que los gametos femenino y masculino, ovocito y espermatozoide, interactúen fusionándose entre sí. Para que esto suceda de forma exitosa, ambos deben haber sufrido una serie de cambios.

1.1. Ovocito

El ovocito es la célula de mayor tamaño en los mamíferos y su desarrollo requiere un consumo de energía superior al resto de células (Warzych & Lipinska, 2020). El gameto femenino juega un papel crucial en el proceso de la fecundación y en la posterior competencia embrionaria, aportando a partir de las células de la granulosa que lo rodean los sustratos necesarios para la producción de energía. El primer requisito para que un ovocito pueda ser fecundado por el espermatozoide es que haya madurado (Sen, 2013).

Los ovocitos dentro del ovario se encuentran arrestados en profase I de la meiosis y deben completar el proceso hasta llegar al estadio de metafase II (MII) durante su selección en la onda folicular previa a la ovulación. Durante la maduración del ovocito, éste debe sufrir una serie de cambios, tanto a nivel nuclear (**Figura 1**) como a nivel citoplasmático, que deben completarse de manera coordinada para asegurar las condiciones óptimas previas a la fecundación (Rienzi et al., 2012). Este complejo proceso implica tanto la reanudación del ciclo meiótico, como modificaciones de los orgánulos citoplasmáticos y cambios a nivel molecular (Grøndahl, 2008).

La meiosis tiene como finalidad la creación de gametos haploides para permitir así la recombinación genética y la posterior generación de un organismo diploide y genéticamente único. En los ovocitos de los mamíferos, la primera meiosis comienza durante su vida fetal quedando arrestados desde el momento de su nacimiento en estado de profase I, y reciben el nombre de vesícula germinal (VG) permaneciendo así hasta su selección en la onda folicular. Al reanudarse la primera meiosis, se produce la separación organizada del material genético, denominándose dicho estado como degradación de la vesícula germinal (del inglés: *germinal vesicle breakdown, GVBD*) seguido de la condensación de la cromatina y alineación de los cromosomas homólogos en el huso mitótico en la metafase I (MI). A continuación, durante la anafase y telofase se produce la separación de los cromosomas homólogos, quedando

completamente separados en MII, momento que es reconocido por la extrusión del primer corpúsculo polar. Tras la finalización de la primera meiosis, el ovocito queda nuevamente arrestado, esta vez en MII, esperando a reanudar la segunda meiosis con la penetración del espermatozoide. Tras la penetración y la reanudación del proceso, se produce la extrusión del segundo corpúsculo polar completándose así la maduración y fecundación del ovocito (Grøndahl, 2008; Sen, 2013).

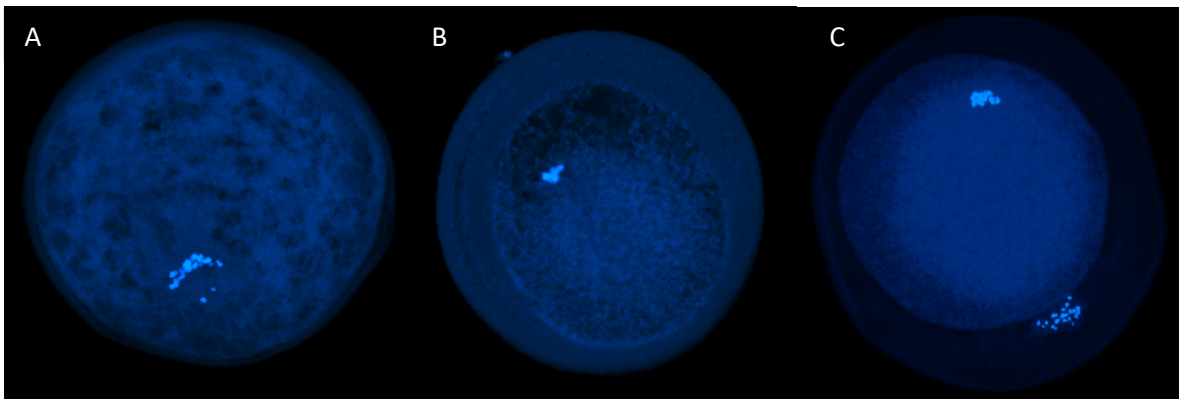


Figura 1. (A) Ovocito equino en estado de vesícula germinal en el que se puede observar la cromatina condensada con una configuración fibrilar. (B) Ovocito equino en estado de MII en el que se puede observar la placa de metafase. (C) Ovocito equino en estado de MIII en que se puede observar la placa de metafase y el corpúsculo polar extruido.

Además de la maduración nuclear es muy importante la maduración citoplasmática, ya que la maduración nuclear por sí sola no es suficiente para que el ovocito de lugar a un embrión viable (Rienzi et al., 2012). La maduración citoplasmática consiste en la producción de factores específicos, reorganización de orgánulos citoplasmáticos, así como cambios en el ácido ribonucleico mensajero (ARN-m) entre otros factores (Grøndahl, 2008). Uno de los eventos más relevante es la migración de los gránulos corticales hacia la periferia del ovocito, considerándose este fenómeno como un indicador de maduración citoplasmática (Pereira et al., 2012). Aparte de estos eventos, han sido observados cambios a nivel morfológico y de redistribución de la localización de orgánulos en el citoplasma como la mitocondria, el aparato de Golgi, los

ribosomas y los microfilamentos de actina. Además, durante el proceso de maduración del ovocito suceden modificaciones complejas a nivel molecular, como un incremento de la transcripción y un almacenamiento y procesado de los ARN-m que serán utilizados posteriormente para sintetizar proteínas (Ferreira et al., 2009).

Para que se produzca la recombinación genética de ambos gametos es necesario que el ovocito haya alcanzado el estado de MII. Sin embargo, no se ha establecido la importancia funcional exacta de los diferentes cambios citoplasmáticos necesarios para que se produzca la fecundación. A pesar de ello no cabe duda que, aunque son procesos distintos, ambos tipos de maduración son eventos interrelacionados que ocurren simultáneamente en momentos específicos y una concordancia entre ambos es necesaria para conseguir una adecuada fecundación y asegurar la competencia embrionaria (Ferreira et al., 2009).

1.2. Espermatozoide

Tras la cópula, un gran número de espermatozoides son depositados en el tracto reproductivo femenino, sin embargo, de forma habitual sólo un espermatozoide penetrará el ovocito y lo fecundará. Para asegurar el éxito de este proceso, el espermatozoide sufre una serie de cambios fisiológicos sucesivos que lo prepararán para que la fecundación suceda de forma exitosa (Gadella et al., 2001). En el caballo se ha sugerido que tras la eyaculación se producen los siguientes eventos: 1) establecimiento de un reservorio de espermatozoides no capacitados en la unión útero tubárica, 2) capacitación de los espermatozoides previa al momento de la ovulación, 3) liberación del reservorio de los espermatozoides capacitados adquiriendo la motilidad hiperactivada y 4) encuentro de los espermatozoides capacitados e hiperactivos con el complejo cúmulo-ovocito (CCO) uniéndose a él, produciéndose la reacción acrosómica (RA) y la posterior fecundación (Leemans et al., 2014). Estos cambios se pueden agrupar dentro de tres procesos, los cuales serán explicados a continuación: capacitación, motilidad hiperactivada y RA.

1.2.1. Capacitación espermática

Este proceso fue postulado en 1951 por Austin y Chang (Austin, 1952; Chang, 1951) definiéndose como el proceso por el cual los espermatozoides, tras el paso por el tracto reproductivo femenino, adquieren la habilidad de penetrar el ovocito. Sin embargo, en la actualidad muchos autores tratan la capacitación como el proceso de preparación previo a la hiperactivación y la RA (Gervasi & Visconti, 2016). La capacitación del espermatozoide es un prerequisite imprescindible para la fecundación en todos los mamíferos y a continuación hablaremos de los factores y eventos claves en su regulación.

- Cambios en la membrana plasmática

La membrana plasmática es una estructura sometida a cambios dinámicos que juega un papel importante durante la preparación previa a la fecundación (Gadella et al., 2001). Dentro de estos cambios, la redistribución de los fosfolípidos de la superficie de la cabeza del espermatozoide, así como la externalización de la fosfatidilserina como resultado de la pérdida del colesterol de la membrana son pasos esenciales en este proceso (Gadella & van Gestel, 2004). La pérdida de colesterol de la membrana incrementa la fluidez de ésta, facilitando la fusión con la membrana del ovocito (Leemans et al., 2019). En los medios de capacitación ha sido utilizada típicamente la albúmina sérica bovina (*BSA*) como aceptor del colesterol de la membrana plasmática (McPartlin et al., 2008). La albúmina ha sido descrita como la proteína más abundantes tanto en el FO (Saint-Dizier et al., 2019) como en el FF (Fu et al., 2016) de los mamíferos y de ahí su extenso uso como fuente de proteínas en los medios de cultivo *in vitro*.

De forma específica, en los espermatozoides de caballo sucede una gran y extensa remodelación de la membrana plasmática en respuesta al bicarbonato, sin embargo la redistribución y la eliminación del colesterol de la membrana plasmática, que tiene lugar en otras especies en medios capacitantes (bicarbonato, calcio y albúmina) no parece suceder en el

caballo, sugiriendo una regulación diferente en el espermatozoide equino (Macías-García et al., 2015; Maitan, Bromfield, Hoogendijk, et al., 2021).

- **Bicarbonato y calcio**

El calcio y el bicarbonato son iones que juegan un papel muy importante en la regulación de la función espermática (Maitan et al., 2021). En el epidídimo la concentración de bicarbonato es muy baja, mientras que en el oviducto de la yegua, lugar donde se lleva a cabo la fecundación, la concentración es notablemente más alta (Harrison, 1996). Este aumento en los niveles intracelulares de bicarbonato activa la enzima adenilato ciclasa soluble (ACs) dando lugar a un incremento de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) que activa a la proteína cinasa A (PKA), lo que conlleva un aumento de la fluidez de la membrana y la reorganización de los fosfolípidos de la membrana plasmática del espermatozoide (Gadella & Harrison, 2002; Visconti et al., 1995). La activación de esta vía (AMPC-PKA) es la principal responsable del incremento de la fosforilación en residuos de tirosina de proteínas de la cola del espermatozoide (del inglés: *protein tyrosine phosphorylation, PY*), siendo uno de los marcadores moleculares más distintivos de la capacitación (Visconti et al., 1995; Visconti & Kopf, 1998).

En relación al calcio, también es un ion con importantes funciones en la capacitación del espermatozoide equino (Leemans et al., 2019). El calcio intracelular, al igual que el bicarbonato, puede activar a la ACs (Jaiswal & Conti, 2003), activando la vía AMPC-PKA. En el espermatozoide equino, la regulación de la acción del calcio es bastante compleja y en ella están involucradas otros factores como el pH del medio extracelular. En concreto, en el espermatozoide equino el calcio puede ejercer un efecto de inhibición en la PY en determinadas condiciones, siendo el pH del medio extracelular uno de los factores más importantes, ya que en presencia de un pH alto (> 7,9), el calcio no ejerce este efecto inhibitorio que esta mediado por la calmodulina. Sin embargo, al inhibir la calmodulina, el calcio logra inducir un incremento de PY a través de un vía

independiente y separada de la vía AMPc-PKA (González-Fernández et al., 2012; Gonzalez-Fernandez et al., 2013).

- pH

El incremento del pH intracelular que se produce durante la capacitación ha sido ampliamente demostrado como un requisito necesario para que este proceso se lleve a cabo con éxito en otras especies domésticas, teniendo una mayor importancia si cabe en la especie equina (Macías-García et al., 2015; Parrish et al., 1989; Vredenburg-Wilberg & Parrish, 1995). La alcalinización del pH intracelular se ha observado en espermatozoides equinos en condiciones capacitantes, incrementando el pH extracelular (Loux et al., 2013). Esta alcalinización se consigue también con el aumento intracelular del bicarbonato, que penetra gracias a la acción de co-transportadores de sodio o de cloro, activando así la ACs (Demarco et al., 2003; Wertheimer et al., 2008).

Fisiológicamente, el incremento del pH extracelular sucede *in vivo* ya que el pH en el útero tras la inseminación incrementa de ~7,5 hasta ~7,9 (González-Fernández et al., 2012). Además, se han encontrado valores superiores de pH 8 en el moco cervical (Leemans et al., 2014) y se ha sugerido que las células epiteliales secretoras del oviducto alcalinizan el FO en el momento próximo a la ovulación y al entrar en contacto los espermatozoides con las paredes del oviducto. Esta unión de los espermatozoides a las células epiteliales del oviducto es fundamental en la capacitación, causando un aumento significativo de la PY, mientras que los espermatozoides que no se unen no presentan cambios en su patrón de fosforilación (Leemans et al., 2014). Esto vuelve a poner de manifiesto la necesidad de conocer más en profundidad el ambiente fisiológico donde tiene lugar la fecundación en la especie equina.

- **Especies reactivas de oxígeno**

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) es un término que hace referencia a un conjunto de moléculas parcialmente reducidas con una elevada capacidad oxidante, las cuales se producen como resultado del metabolismo energético, incluyendo el anión superóxido, el óxido nítrico, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, entre otros (Yang et al., 2019).

Históricamente, las EROs se han identificado como perjudiciales para los espermatozoides, sin embargo, no sólo se ha demostrado que unos niveles mínimos de éstas se producen de manera fisiológica, sino que se ha sugerido que los espermatozoides de caballos más fértiles producen niveles superiores de EROs (Gibb et al., 2014).

A pesar de esto, el estrés oxidativo es una causa importante de daño espermático, ya que niveles excesivos de EROs tienen un efecto nocivo para la integridad del ADN (ácido desoxirribonucleico) y las funciones del espermatozoide (Mislei et al., 2020). En base a esta evidente controversia, se ha sugerido que el mantenimiento de un delicado balance en la producción de las EROs es extremadamente importante para la integridad del espermatozoide y durante los cambios que éste debe sufrir previo a la fecundación (Aitken & Drevet, 2020). Se ha sugerido que las EROs en el espermatozoide equino no solo se generan de forma fisiológica, sino que juegan un papel importante en la señalización y el control de eventos como la capacitación (Baumber et al., 2003).

La generación de EROs y la capacitación están íntimamente relacionadas, debido a que la capacitación es un proceso altamente demandante de consumo de energía por lo que se podría considerar un proceso oxidativo (Lamirande et al., 1993). La vía de activación inducida por el bicarbonato (AMPC-PKA) induce un aumento de la producción de EROs y un incremento de PY, pero a su vez, se ha demostrado que la adición de EROs puede incrementar la inducción de la PY en varias especies, incluida el caballo (Baumber et al., 2003). Como explicación a esto,

se ha sugerido que las EROs activan la ACs induciendo el incremento de *PY* a través de la vía de AMPc-PKA (Naz & Rajesh, 2004). Sin embargo, el incremento de *PY* inducido por un incremento del pH extracelular no aumenta la producción de EROs (Macías-García et al., 2015). Una vez más, existen diferencias en el caballo con otras especies en la regulación de la capacitación, en este caso por parte de las EROs (Leemans et al., 2019).

1.2.2. Motilidad hiperactivada o hipermotilidad

Este tipo de movimiento característico fue descrito por primer vez en el hámster como un movimiento vigoroso que los espermatozoides mostraban de forma previa al momento de la fecundación, con el objetivo de permitir a éstos atravesar las células del cúmulo y la Zona Pelúcida (ZP) del ovocito (Yanagimachi, 1970). Posteriormente se demostró que sin la adquisición de la hipermotilidad, los espermatozoides eran incapaces de atravesar la ZP (Stauss et al., 1995). La motilidad hiperactivada se caracteriza por un rápido movimiento de la cola con un batido flagelar asimétrico, lo que resulta en un aumento de la amplitud del movimiento lateral de la cabeza produciendo un patrón de motilidad circular (Hinrichs & Loux, 2012). El calcio tiene un importante papel en este evento en la especie equina (Hinrichs & Loux, 2012), ya que el principal requerimiento para que se produzca este patrón específico de motilidad es la entrada de calcio extracelular dentro del citosol, gracias a los canales específicos de calcio como el CatSper (Ren & Xia, 2010). Al igual que sucede en otras especies, estos canales se abren en respuesta a la alcalinización intracelular, permitiendo así la entrada de calcio al interior del espermatozoide (Hinrichs & Loux, 2012). En otras especies de mamíferos, se ha descrito la implicación de las vías AMPc-PKA y de la calmodulina en la hiperactivación espermática. Sin embargo, como ya se ha explicado anteriormente, estas vías modulan el incremento de *PY* en la cola del espermatozoide equino, pero la inducción de este evento se produce de forma independiente a la adquisición de la motilidad hiperactivada en esta especie (Leemans et al., 2019). Hasta el momento, solo se ha demostrado que la entrada de calcio cambia el

deslizamiento de los microtúbulos pero no hay certezas sobre el mecanismo molecular responsable de este tipo de motilidad específica (Lindemann & Lesich, 2010). En relación a las EROs, la producción de éstas juegan un importante papel en el control de la motilidad y de la hiperactivación (Baumber et al., 2003; de Andrade et al., 2018). En el espermatozoide equino se ha asociado una mayor producción de EROs con espermatozoides altamente móviles y con capacidad fecundante (Meyers et al., 2019), así como un efecto perjudicial sobre la motilidad en presencia de altos niveles de EROs (Baumber et al., 2000). Por todo esto, se ha sugerido que existen diferencias en los mecanismos de control de la motilidad hiperactivada en los espermatozoides equinos (Hinrichs & Loux, 2012; Leemans et al., 2019).

Tras la unión de los espermatozoides al reservorio en el oviducto, sólo los potencialmente capaces de fecundar al ovocito, capacitados y vivos, se liberan de este reservorio de forma gradual. Se ha sugerido que la adquisición de la motilidad hiperactivada permite esta liberación, sirviendo de mecanismo de selección espermática antes de encontrarse con el ovocito (Suarez, 2008). Otro mecanismo que contribuye a la selección espermática son los cambios en la viscosidad del FO. En los estadios previos a la ovulación el FO se vuelve extremadamente viscoso y la motilidad hiperactivada permite al espermatozoide liberarse de este medio y avanzar. Sin embargo, tras la ovulación, el medio pierde viscosidad, facilitando el movimiento flagelar y el avance a través del oviducto hacia el ovocito a aquellos espermatozoides que han sido previamente seleccionados (Coy et al., 2012).

1.2.3. Reacción acrosómica

La RA es un proceso exocítico que se produce gracias a la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa del espermatozoide en múltiples puntos. Este proceso sucede tras el encuentro de un espermatozoide capacitado e hiperactivado con el ovocito maduro, al unirse a la ZP o a la matriz intercelular del CCO en la misma porción del oviducto donde tiene lugar la fecundación (Maitan, Bromfield, Stout, et al., 2021). Tras esta

unión tiene lugar la liberación del contenido del acrosoma, el cual contiene enzimas hidrolíticas que le otorgan al espermatozoide la capacidad de penetrar las células del cúmulo y la ZP, accediendo así al el espacio perivitelino (Maitan, Bromfield, Stout, et al., 2021; Roggero et al., 2007). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que, en otras especies como el ratón, el espermatozoide pierde el acrosoma antes de llegar al ovocito (La Spina et al., 2016). En cualquier caso, finalmente se produce la fusión entre la membrana plasmática del ovocito y la membrana acrosomal interna del espermatozoide, permitiendo la recombinación del material genético de ambos gametos (Leemans et al., 2019).

La RA es un evento fisiológico y necesario para la fecundación, sin embargo, se ha conseguido inducir la RA de forma espontánea, sin unión entre el espermatozoide y la ZP, la cual tiene un efecto perjudicial para el espermatozoide equino (Gadella et al., 2001). Al igual que la capacitación, la RA está regulada por las EROs y de forma específica se ha demostrado que el óxido nítrico tiene un importante papel en la regulación de la inducción de la RA en el espermatozoide equino (de Andrade et al., 2018). La RA es dependiente del calcio extracelular, ya que para que suceda se necesita la entrada de calcio en el interior del espermatozoide (Harper et al., 2006) . Además del calcio, en el caballo, la progesterona presente el FF es otro factor que podría ser responsable de la inducción de este proceso fisiológico (Lange-Consiglio et al., 2016). En base a estos conocimientos *in vivo*, se han realizado experimentos *in vitro* con ionóforo de calcio, progesterona y FF en combinación con bicarbonato y pH alcalino, sin embargo, no se ha conseguido inducir una RA fisiológica utilizando estos factores (Leemans et al., 2016). Son necesarios más estudios para conocer e intentar inducir una RA fisiológica en el espermatozoide equino que resulte en una fecundación exitosa.

2. Obtención de gametos

Para llevar a cabo las técnicas de FIV es imprescindible extraer los gametos de ambos sexos, ya sea *in vivo* o *post mortem*, pudiéndose conservar u obtener en diferentes estados

madurativos, lo que influye notablemente en los procesos a realizar *in vitro*, así como en los resultados obtenidos.

2.1. Ovocitos *in vivo*

Actualmente se pueden obtener los ovocitos a partir de una yegua viva en dos estados: maduros e inmaduros. Los ovocitos maduros, pueden ser recuperados mediante la aspiración por el flanco o bien mediante aspiración de un folículo pre-ovulatorio mediante la técnica aspiración transvaginal ecoguiada u *Ovum Pick Up (OPU)* (descrita a continuación) (**Figura 2**). Debido a que el folículo aspirado está muy próximo al momento de la ovulación, los ovocitos obtenidos ya han reanudado la primera meiosis y aunque se desconozca el estado exacto en el que se encuentran, hablaremos de ovocitos madurados *in vivo*, porque se ha demostrado que estos ovocitos están preparados para ser fecundados y desarrollar un embrión (Hinrichs, 2018). La tasa de recuperación de ovocitos aspirados de estos folículos pre-ovulatorios es alta, próxima al 80% (Carnevale et al., 2005), en comparación con los ovocitos inmaduros recuperados de todos los folículos encontrados en el ovario que está en torno al 50% (Claes & Stout, 2022). Esto es debido a que las células del cúmulo están expandidas y menos adheridas a la pared del folículo pre-ovulatorio lo que facilita la recuperación de estos ovocitos en comparación con los ovocitos en estado inmaduro del resto de los folículos. Además, estos ovocitos maduros presentan una mayor competencia meiótica y habilidad de desarrollarse como un embrión viable, con respecto a los madurados *in vitro* (Foss et al., 2013; Jacobson et al., 2010). Sin embargo, la obtención de un ovocito madurado *in vivo* presenta como desventaja la necesidad de realizar exámenes ecográficos seriados y tratamientos hormonales con un control exhaustivo previo a la aspiración. Además, la falta de eficacia de los tratamientos de superovulación en yeguas hace que por lo general solo pueda aspirarse un ovocito en cada sesión. Estos ovocitos tiene además la desventaja de ser más susceptibles a cambios ambientales (pH, temperatura, osmolaridad...) teniendo que usarse para la FIV inmediatamente tras su obtención (Hinrichs, 2018).

Por otro lado, para la obtención de ovocitos inmaduros, la técnica más usada de forma comercial en la actualidad es la *OPU* (E. Squires, 2020). Esta técnica fue descrita hace 30 años (Brück et al., 1992), pero debido a la íntima unión que existe entre el ovocito equino y la pared del folículo, los resultados en la especie equina al inicio fueron decepcionantes comparados con otras especies como la bovina. No fue hasta principio de los años 2000 cuando la técnica se adaptó a las características fisiológicas y anatómicas de la yegua, usando agujas de doble lumen, con gran calibre (12 – 15 G) para poder realizar lavados sucesivos del folículo así como raspados de la pared folicular y un vigoroso masaje del ovario vía rectal (Galli et al., 2001, 2007) consiguiendo tasas de recuperación similares a las que se manejan en la actualidad ~ 50% (Claes & Stout, 2022). Con dicha técnica se obtienen ovocitos inmaduros mediante aspiración transvaginal ecoguiada de los folículos presentes en ambos ovarios de la yegua, pudiéndose repetir periódicamente sin complicaciones reseñables, obteniendo un gran número de ovocitos de forma segura cada dos semanas (Velez et al., 2012).

Como ya se explicó anteriormente, los ovocitos inmaduros se encuentran arrestados en profase I. Se ha demostrado que el envío de estos ovocitos durante las siguientes 24 – 48 horas a temperatura ambiente (~ 25 °C) en un medio específico para este procedimiento, medio de *holding*, no afecta a la tasa de producción de blastocistos, lo que permite su envío a casi todos los laboratorios del mundo. El mantenimiento a temperatura ambiente es un factor muy importante que permite el arresto meiótico, ya que durante el envío a 38 °C los ovocitos pueden alcanzar el estadio de MII incluso en el medio de *holding* (Hinrichs, 2020). La desventaja de este método es que estos ovocitos deben ser sometidos al proceso de maduración *in vitro* (MIV), lo

que hasta día de hoy supone una reducción de la competencia meiótica y de desarrollo comparado con lo ovocitos madurados *in vivo* (Hinrichs, 2018).



Figura 2. Procedimientos *in vivo* para la recuperación de ovocitos en yegua. (A) Aspiración por el flanco. (B) OPU.

2.2. Ovocitos *Post mortem*

Los ovocitos *post mortem* son obtenidos de los ovarios de una yegua que ha muerto o ha sido sacrificada previamente, aunque la misma técnica se podría usar en una yegua sometida a ovariectomía electiva. Este tipo de obtención es muy usada en yeguas de matadero con fines experimentales, aunque puede ser usada con fines comerciales, ya que es la última oportunidad de obtener descendencia de una yegua en concreto (Hinrichs, 2013). Los resultados de esta técnica son muy variables, ya que el efecto del estado sistémico de la yegua previo o durante la muerte, así como el efecto de los fármacos utilizados sobre la competencia meiótica de los ovocitos son difíciles de valorar (Hinrichs, 2018).

Para obtener buenas tasas de recuperación de ovarios *post mortem* es necesario abrir completamente cada folículo visible o palpable para, con una cureta de hueso, raspar la pared del folículo obteniendo así el ovocito junto con las células de la granulosa a las que está fuertemente adherido (**Figura 3**) (Hinrichs, 2013). También puede hacerse mediante un método similar a la *OPU*, usando una bomba y una aguja para reducir el tiempo invertido; lamentablemente, aunque se ahorra tiempo, conlleva una reducción significativa de la tasa de recuperación de ovocitos, por lo que su uso principalmente queda relegado al ámbito experimental (Smits et al., 2009).

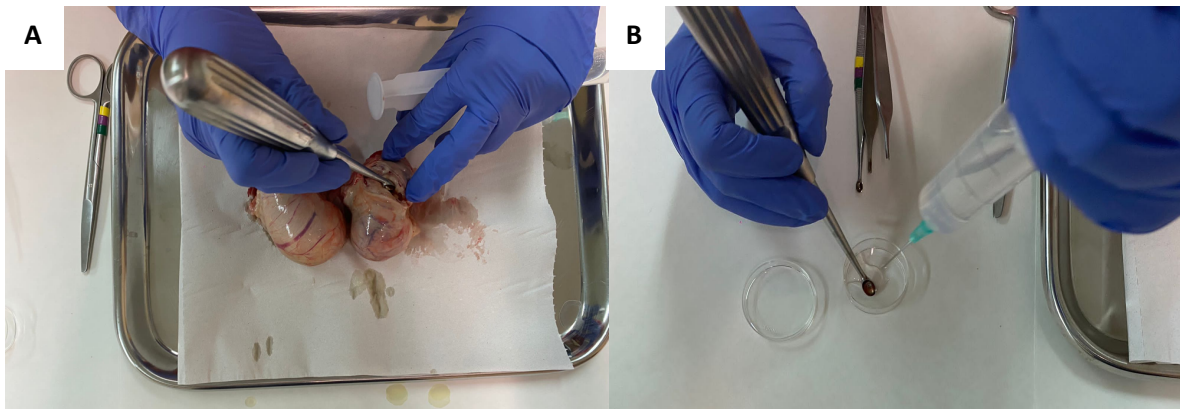


Figura 3. Raspado de ovocitos *post mortem*. (A) Raspado de la pared de los folículos con cureta de hueso. (B) Lavado de la cureta con aguja para la recuperación de ovocitos en placa de Petri.

2.3. Semen

La recolección del semen equino es un proceso habitual en la clínica equina desde la década de los 30, lo cual permitió comenzar a evaluar, optimizar y almacenar los eyaculados (Love, 1992). La técnica más extendida de extracción de semen *in vivo* en la actualidad es el uso de la vagina artificial (Alvarenga et al., 2016). En caso de sementales muertos o que han sido sometidos a castraciones, la única alternativa de obtener espermatozoides viables es la extracción de espermatozoides de las reservas epididimarias para su posterior almacenamiento refrigerado o más habitualmente, congelado (Bruemmer, 2011).

La criopreservación o congelación es actualmente la técnica más usada para el almacenamiento a largo plazo de los gametos masculinos. La principal ventaja de esta técnica es que permite enviar eyaculados a cualquier parte del mundo, así como mantener indefinidamente la genética de ejemplares de alto valor, incluso tras su muerte. La gran limitación de esta técnica es la alta mortalidad espermática tras la descongelación y los daños estructurales y moleculares que sufren los espermatozoides, lo que reduce notablemente la capacidad fecundante de estos espermatozoides (Peña et al., 2011). Otro inconveniente adicional es la enorme variabilidad existente entre caballos en la calidad del semen al descongelar, existiendo un porcentaje muy bajo de sementales con una buena tolerancia a la congelación, siendo aún poco conocidas las causas de dichas diferencias (Loomis & Graham, 2008).

Estos problemas pueden ser resueltos mediante el uso de las técnicas de reproducción asistida, como la FIV mediante la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (del inglés, *ICSI*). Algunos estudios demuestran que, a pesar de los efectos deletéreos que sufre el espermatozoide congelado y de la variabilidad entre sementales, no existen diferencias en la eficacia de la *ICSI* entre usar semen fresco o congelado obtenido de sementales con fertilidad variable (Gonzalez-Castro & Carnevale, 2018). Además, las técnicas de FIV presentan como una de sus mayores ventajas que no se necesita una gran cantidad de espermatozoides comparado con otras técnicas de reproducción asistida (Ferré et al., 2020). Es por ello por lo que, en la actualidad, tanto en el equino como en otras especies existe un uso casi exclusivo de semen congelado en los procedimientos clínicos de FIV mediante *ICSI*.

3. Maduración de ovocitos *in vitro*

El primer estudio que describió una MIV exitosa en équidos data de los años 80 (Fulka & Okolski, 1981). En este estudio se comenzó a adicionar suero fetal bovino (SFB) a un medio de cultivo celular como fuente de proteínas (*Tissue Culture Medium 199*, *TCM 199*) de manera

similar al usado en la actualidad. Los primeros embriones obtenidos de ovocitos inmaduros se obtuvieron casi 10 años más tarde, usando también SFB (J. J. Zhang et al., 1989). Sorprendentemente, a pesar de los buenos resultados conseguidos en estos trabajos, posteriormente no ha habido mejoras relevantes en el proceso de maduración. El mayor obstáculo en el desarrollo de la MIV fue la falta de accesibilidad a mataderos para obtener un número de ovocitos suficientes para realizar experimentos (López Tremoleda, 2003). Además, la falta de éxito en la FIV convencional fomentó el uso de ovocitos madurados *in vivo* con el objetivo de optimizar los resultados (Galli et al., 2007). Sin embargo, la falta de resultados, las desventajas en la aspiración de folículos pre-ovulatorios y la problemática que supone la superovulación en yegua (Hinrichs, 2018), junto con la mejora en los resultados de las técnicas de OPU/ICSI, dejaron en un segundo plano tanto el uso de los ovocitos maduros *in vivo* como los intentos por optimizar los protocolos de MIV.

Como ya se ha comentado anteriormente, los protocolos utilizados con diferentes medios y aditivos para conseguir buenas tasas de maduración nuclear, > 60%, fueron establecidos de manera repetible desde hace más de dos décadas (Dell'Aquila et al., 1997). Desde entonces, la mayoría de los estudios publicados han intentado imitar las condiciones de maduración *in vivo* para optimizar los medios utilizados en la MIV. Con este fin se ha utilizado FF o algunos de sus componentes, obteniendo resultados muy diversos y poco concluyentes. Numerosos estudios han usado FF pre-ovulatorio a diferentes concentraciones (9 – 100%; v/v) con el objetivo de imitar las condiciones *in vivo*, pero los resultados no han mostrado ventajas frente a los medios comerciales con mayores tasas de éxito de maduración nuclear (Dell'Aquila et al., 1997; Douet et al., 2017; Hinrichs et al., 2002). Sin embargo, a pesar de estos estudios, no cabe duda que la comunicación intercelular y el microambiente dentro del folículo es lo que permite a los ovocitos adquirir su competencia para producir embriones (Reader et al., 2017).

En la actualidad los mejores resultados de MIV se obtienen con los medios comerciales *TCM 199* y el *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F – 12 Ham (DMEM/F-12)*. Los trabajos que comparan ambos medios obtienen resultados divergentes según el laboratorio, probablemente debido a los aditivos añadidos a los medios y a las condiciones específicas de pH y osmolaridad (Hinrichs, 2018). La fuente de proteínas de elección en la actualidad para suplementar estos medios sigue siendo el SFB, debido a su efecto potenciador en la competencia meiótica comparado con otras fuentes de proteínas biológicas como la SFB, el FF o proteínas sintéticas de diferente origen (González-Fernández et al., 2015; Morris, 2018). Además, una gran variedad de hormonas con importantes funciones en el desarrollo folicular se añaden a los medios de maduración, incluidas el estradiol, la hormona folículo estimulante (del inglés: *follicle stimulating hormone, FSH*), la hormona luteinizante (del inglés: *luteinising hormone, LH*) y la gonadotropina coriónica equina (del inglés: *equine corionic gonadotropin, eCG*), entre otras (Morris, 2018; Shabpareh et al., 1993; Willis et al., 1991).

El FF contiene las sustancias esenciales involucradas en el proceso de maduración, sin embargo, la adición de dicho fluido a los medios de maduración equinos no ha supuesto ninguna ventaja en la MIV. Es por ello que, algunos estudios más recientes han ido encaminados a estudiar la composición del FF: metabolitos (Belin et al., 2000; Gérard et al., 2015), hormonas (Belin et al., 2000; Satué et al., 2019) y proteínas (Dutra et al., 2019; Fahiminiya et al., 2011), con el objetivo de obtener información para la formulación de medios más eficientes y específicos para la MIV. También, se pretende comprender cómo suceden a nivel molecular los procesos implicados en la MIV, para determinar cuáles son las principales deficiencias y poder desarrollar medios de cultivo que mimeticen los ambientes fisiológicos (Walter et al., 2019). En la actualidad, numerosas publicaciones demuestran la necesidad de adaptar los medios de MIV para satisfacer las necesidades metabólicas de los ovocitos (Lewis, Hinrichs, Leese, McG. Argo, et al., 2020).

En équidos, los esfuerzos por mejorar los sistemas de producción de embriones *in vitro* siempre han seguido los pasos de otras especies como la bovina o la porcina. Tanto los medios sintéticos de MIV como los intentos de imitar las condiciones *in vivo* con la adición de FF, hormonas u otros componentes fueron descritos previamente en la especie porcina (Naito et al., 1989) y más tarde en la bovina (Romero-Arredondo & Seidel, 1994). Es por esto por lo que, para avanzar en el camino de la optimización de la MIV, deben usarse como base los estudios más recientes de estas especies. Las últimas propuestas de optimización van más allá de añadir los fluidos *in vivo* tal como los extraemos del animal, sino que proponen trabajar con los componentes bioactivos específicos presentes en el FF, que son los elementos claves para la comunicación y la regulación del proceso de maduración: vesículas extracelulares, proteínas o metabolitos (Asaadi et al., 2021; Pioltine et al., 2020; Reed et al., 2022).

4. Fecundación *in vitro*

La fecundación engloba una serie de eventos que resultan en la fusión de los gametos de ambos sexos (Wright & Bondioli, 1981) (**Figura 4**).

Existen dos tipos de FIV: la FIV convencional, que consiste en incubar juntos los ovocitos maduros y los espermatozoides pre-capacitados en un medio de fecundación (Hinrichs, 2013) y por otro lado, la *ICSI*, en la que un sólo espermatozoide se inyecta en el citoplasma del ovocito (Choi & Hinrichs, 2011). En los siguientes apartados ambas serán explicadas de forma detallada.

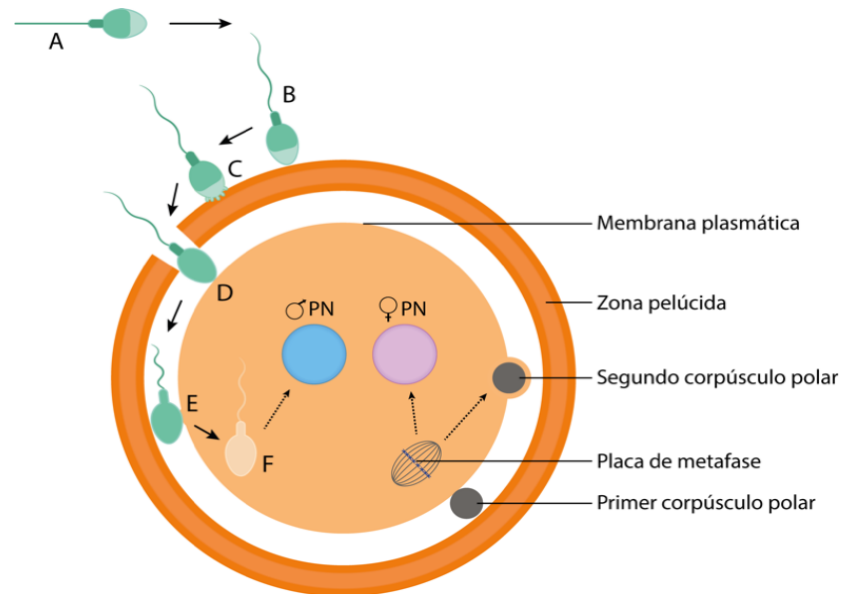


Figura 4. Representación esquemática de los eventos que tiene lugar durante la fecundación. (A) Espermatozoide hiperactivado llegando al ovocito. (B) Unión del espermatozoide a la zona pelúcida. (C) Inicio de la RA y liberación de enzimas. (D) Penetración del espermatozoide en el espacio perivitelino. (E) Fusión de las membranas de ambos gametos. (F) Recombinación genética del espermatozoide con el ovocito en estado de MII y extrusión del segundo corpúsculo polar.

3.1. Fecundación *in vitro* convencional

La FIV convencional es una técnica de reproducción asistida usada rutinariamente en especies domésticas y en humanos. Este método implica la penetración de un espermatozoide capacitado dentro de un ovocito maduro (Leemans et al., 2016). En especies domésticas como la porcina o la bovina, la FIV convencional es la técnica de elección para la producción *in vitro* de embriones, ya que, frente a la *ICSI*, supone un procedimiento relativamente sencillo, económico y eficaz (Blondin, P., 2015).

Sin embargo, a diferencia de otras especies, en el caballo esta técnica presenta grandes limitaciones, ya que hasta la reciente publicación del trabajo de Felix y colaboradores en 2022 (Felix et al., 2022), sólo dos potros habían nacido mediante este procedimiento y ambos a partir de ovocitos madurados *in vivo* (Galli, C. et al., 2013; Palmer et al., 1991). A pesar de los

numerosos intentos, hasta la publicación del citado artículo no se había conseguido un protocolo exitoso y repetible de FIV convencional, y los trabajos publicados mostraban una tasa de fecundación de los ovocitos muy variable desde 0 al 33% usando diferentes tratamientos (Leemans et al., 2016).

Una interesante cuestión es saber cuál de los dos gametos es el responsable de que la FIV convencional no funcione en la especie equina. Históricamente, el fracaso de la FIV convencional ha sido atribuido a la incapacidad del espermatozoide para atravesar la zona pelúcida del ovocito, como consecuencia de una inadecuada capacitación *in vitro* (Leemans et al., 2016). Esta teoría está basada en el hecho de que, por un lado los ovocitos madurados *in vitro* y transferidos al oviducto de la yegua dan como resultado tasas de preñeces similares a las conseguidas mediante inseminación artificial (Hinrichs et al., 2002). Por otro lado, no se obtienen resultados repetibles realizando FIV convencional utilizando ovocitos madurados *in vivo* (Maitan, Bromfield, Stout, et al., 2021). Estos datos sugieren que la maduración del ovocito no es la responsable de la falta de éxito de la técnica.

Es por ello que un gran número de trabajos se han centrado en el estudio del espermatozoide utilizando diferentes aditivos para intentar conseguir una capacitación previa a la incubación con el ovocito como posible solución a la falta de resultados repetibles de la FIV convencional (Leemans et al., 2016). El tratamiento más repetible ha sido la incubación de los espermatozoides con ionóforo de calcio previo a la co-incubación de los gametos (Alm et al., 2001; Hinrichs, 2013; Hinrichs et al., 2002; Sampaio et al., 2021) aunque se han probado otros tratamientos como la heparina (Alm et al., 2001), cafeína (Graham, 1996), progesterona (Moros-Nicolás et al., 2019), FF (Lange-Consiglio et al., 2016) y una combinación de epinefrina, hipotaurina y penicilamina (Felix et al., 2022), este último, con resultados muy prometedores. Otros estudios han añadido progesterona (Tremoleda et al., 2003) a los medios de fecundación, con ambos gametos presentes, con el objetivo de valorar la interacción entre éstos. Estos

estudios no han mostrado buenos resultados de fecundación y además no son repetibles (Leemans et al., 2016). El tratamiento que mejor resultado había mostrado ha sido el tratamiento con procaína, dando lugar a una tasa de división del 60% (McPartlin et al., 2009). Sin embargo, posteriormente se ha demostrado que la procaína induce un aparente desarrollo embrionario hasta la etapa de 8 – 16 células en ausencia de espermatozoides y que éstas divisiones son inducidas mediante citoquinesis (Leemans, Gadella, Stout, Heras, et al., 2015).

Por otro lado, se ha obtenido formación de pronúcleos y división celular en FIV convencional heteróloga utilizando semen equino y ovocitos bovinos, demostrando que la capacitación del espermatozoide de caballo se puede alcanzar en condiciones *in vitro* sugiriendo que una inadecuada maduración del ovocito equino también podría ser el factor limitante en la FIV. En este sentido se ha observado que la perforación o eliminación parcial de la zona pelúcida permite al espermatozoide fecundar al ovocito, sugiriendo que los cambios que debe sufrir dicha zona podrían ser una de las grandes barreras que impiden la fecundación convencional en la especie equina (Maitan, Bromfield, Stout, et al., 2021; Sessions-Bresnahan et al., 2014). Con esta disparidad de resultados algunos autores argumentan que es difícil pensar que uno de los dos gametos sea el único responsable del fracaso de la FIV convencional equina, siendo más lógico sugerir que actualmente existe una falta de conocimiento que nos impide mimetizar el ambiente fisiológico *in vitro* donde sucede la fecundación, que nos permita conseguir buenos resultados (Maitan, Bromfield, Stout, et al., 2021).

Esta opinión está fundamentada en lo que sucede en otras especies de mamíferos, como el bovino o el porcino, en las que el estudio de los componentes y el ambiente donde se produce la fecundación *in vivo*, el oviducto, ha permitido poder imitar las condiciones *in vitro* y conseguir posteriormente unos resultados de FIV convencional exitosos y replicables (Mahé et al., 2021; Ménéz et al., 2015). Durante las últimas décadas los estudios realizados han incrementado el conocimiento sobre la composición del FO y su ambiente, sobre las células oviductales o con los

componentes oviductales que desempeñan funciones específicas en la interacción de los gametos, fecundación y desarrollo embrionario temprano. Ha sido este conocimiento previo el que ha permitido la mejora de los resultados en otras especies hasta las tasas que conocemos en la actualidad (Batista et al., 2021; Ferré et al., 2020).

En el caso de los équidos, solo algunos estudios han abordado más a fondo la composición del FO (González-Fernández et al., 2020; Smits et al., 2017). Es por esto por lo que se han realizado pocos ensayos de FIV con componentes oviductales específicos de yegua. Gimeno y colaboradores (2021) aislaron células epiteliales oviductales del istmo y del ampulla de yeguas de matadero para, primero incubarlas con espermatozoides y posteriormente seleccionar los espermatozoides unidos a éstas células y co-incubarlos con ovocitos equinos (Gimeno et al., 2021). Previamente, Leemans y colaboradores (2015) ya habían descrito el aislamiento de células epiteliales del istmo y del ampulla así como el lavado de los oviductos para conseguir FO, aunque sin conocer su concentración real (Leemans, Gadella, Stout, Nelis, et al., 2015). Y recientemente Lange-Consiglio y colaboradores (2022) han conseguido unas tasas de fecundación del 44% añadiendo vesículas extracelulares provenientes del cuerno uterino y del oviducto ipsilateral a un folículo pre-ovulatorio (Lange-Consiglio et al., 2022). El objetivo de estos estudios fue imitar las condiciones *in vivo* de la fecundación: por un lado, conseguir reproducir *in vitro* el reservorio espermático que se genera en el istmo y la posterior liberación de los espermatozoides de dicho lugar y, por otro lado, añadir los componentes necesarios para promover la FIV.

3.2. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

Este método de fecundación surgió como alternativa a la ineficiencia de la FIV convencional, permitiendo obtener la primera preñez a partir de un ovocito equino madurado y fecundado *in vitro* a finales de los años 90 (E. L. Squires et al., 1996).

La *ICSI* es actualmente el único método clínico y repetible de FIV en caballo (Rader et al., 2016). En la primera década de los años 2000 (Galli et al., 2007) los resultados de *ICSI* comenzaron a ser replicables de manera exitosa y los programas de *OPU-ICSI* demostraron ser procedimientos clínicos comparables con otras técnicas de reproducción asistida clínicamente testadas como el lavado de embriones o la transferencia oviductal de ovocitos. A día de hoy, es el tratamiento de elección para problemas de infertilidad tanto del semental como de la yegua (E. L. Squires, 2019). Este procedimiento puede realizarse mediante inyección convencional usando una aguja con bisel o con aguja roma usando taladro piezoeléctrico mediante microvibraciones (**Figura 5**). No se han observado diferencias en las tasas de blastocistos entre estas técnicas, pero la calidad de los embriones es superior en los blastocistos producidos mediante inyección con taladro piezoeléctrico (Hinrichs, 2018).

La gran ventaja que presenta la *ICSI* frente a la FIV convencional, a parte de su éxito, es la posibilidad de utilizar eyaculados de diferente calidad incluyendo aquellos que poseen una baja concentración espermática o baja motilidad. Por otro lado, para realizar la *ICSI* se necesita poca cantidad de espermatozoides por lo que se optimiza el uso de las pajuelas de aquellos sementales que presentan un elevado coste o un reducido número de dosis (Galli et al., 2007). Además, está surgiendo una demanda creciente en la aplicación de los programas de *OPU-ICSI* en animales de alto valor genético y rendimiento deportivo sin problemas reproductivos, debido a la alta flexibilidad que ofrece en comparación con otras técnicas de reproducción asistida convencionales (Cuervo-Arango et al., 2019).

A pesar de sus numerosas ventajas, esta técnica presenta algunos inconvenientes comparados con la FIV convencional. Su aplicación supone unos elevados costes de instalaciones y equipamientos, así como una alta especialización del operador (E. Squires, 2020). Por otro lado, solamente un número muy limitado de laboratorios en todo el mundo consiguen obtener buenos resultados mediante esta técnica, ~ 20% de embriones por ovocito inyectado (Hinrichs,

2018). Estos resultados tan difíciles de conseguir son hoy en día subóptimos (Brom-de-Luna et al., 2021) si se compara con los resultados conseguidos en otras especies domésticas como la bovina (40%) (Ferré et al., 2020) o la porcina (50 – 60%) (Romar et al., 2016) mediante FIV convencional.

En la actualidad, existe un aumento exponencial de la demanda de los programas de producción *in vitro* de embriones de caballo, sin embargo actualmente se necesita una media de 10 ovocitos para obtener un embrión vitrificable, lo que disminuye las posibilidades de hacer frente a esta nueva demanda (Lazzari et al., 2020). Dado que los ovocitos equinos tienen una tasa aceptable de maduración nuclear (> 60%), seguida de una alta división tras la ICSI (> 65%) (Stout, 2020) es necesario llevar a cabo más investigaciones sobre el ambiente fisiológico para conocer las necesidades de ambos gametos durante el proceso y mejorar así los resultados finales de dicha técnica (Morris, 2018).

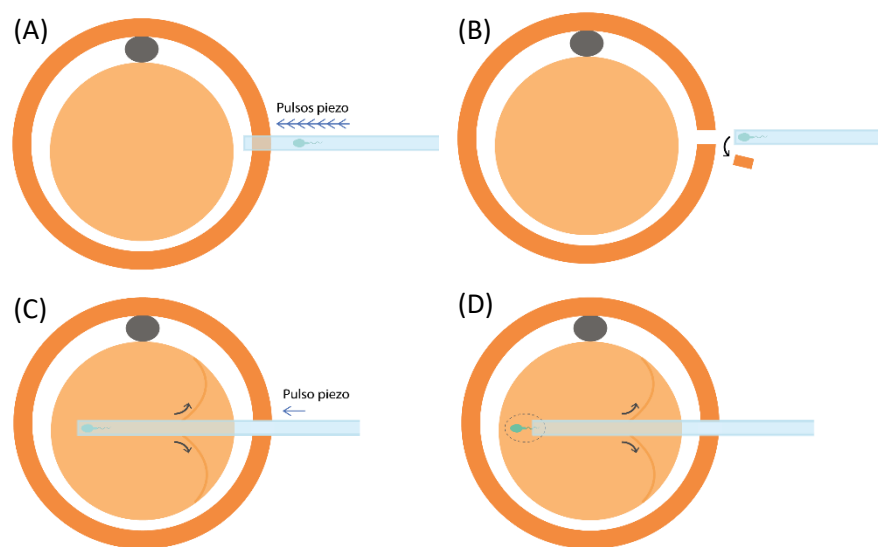


Figura 5. Esquema de ICSI mediante taladro piezoeléctrico. (A) Aplicación de pulsos piezoeléctricos para romper la membrana espermática previa a la inyección. (B) Aplicación de pulsos piezoeléctricos para la perforación de la zona pelúcida permitiendo la entrada al espacio perivitelino. (C) Aplicación de pulsos piezoeléctricos para la ruptura de la membrana plasmática accediendo así al citoplasma. (D) Liberación del espermatozoide.

5. Cultivo *in vitro*

Los medios de cultivo de embriones equinos históricamente se han basado en los medios usados en otras especies, formulados en base a la composición del FO de éstas (Brom-de-Luna et al., 2021). El conocimiento sobre el desarrollo temprano del embrión y la interacción con el ambiente materno dentro del oviducto es muy limitado, sin embargo, se han realizado aproximaciones *in vitro* para replicar algunas de las condiciones oviductales en las que se desarrolla el embrión en sus primeros días. Existen varios estudios sobre el recambio periódico de medio, intentando imitar el ambiente dinámico al que está sometido el ovocito *in vivo*, así como sobre la adición de componentes específicos o fluidos reproductivos procedentes del útero, folículo u oviducto (Choi et al., 2016; Rodríguez et al., 2019; Smits et al., 2012). A pesar de estos intentos, las tasas de producción de blastocistos se han mantenido más bajas en comparación con ovocitos fecundados por ICSI y posteriormente cultivados en el oviducto *in vivo* de yegua u oveja (Galli et al., 2007); incluso, el cultivo *in vitro* de embriones producidos *in vivo* de 6 - 8 días no es factible (Morris, 2018).

Actualmente, el cultivo *in vitro* sigue siendo el gran reto dentro del proceso de producción de embriones, ya que, aunque se han probado diferentes medios de cultivo (*DMEM/F-12*; *Chatot*, *Ziomek*, *Bavister* o *Global Science*, entre otros) aplicando diferentes protocolos y obteniendo resultados más o menos exitosos según el laboratorio (Morris, 2018), no existe uno que sea notablemente superior. Es por esto que, el cultivo de los presuntos cigotos hasta su fase de blastocisto, es el paso más difícil y sensible de todo el proceso *in vitro* (Stout, 2020), por lo que de nuevo es fundamental, necesario y urgente conocer más en profundidad el ambiente fisiológico temprano en el que el embrión se desarrolla.

6. Ambiente Folicular

6.1. Anatomía y fisiología

En el folículo de los mamíferos se puede encontrar el ovocito, las células de la teca y las de la granulosa, existiendo dos tipos de éstas últimas según su localización: de la pared o murales, que tapizan todo el folículo y células del cúmulo, que rodean al ovocito y lo unen a la pared del folículo formando el CCO. A su vez, todo este componente celular se encuentra embebido en el FF (Machtinger et al., 2015).

El folículo se va desarrollando de forma dinámica y constante desde su origen en la etapa fetal, donde se produce la diferenciación sexual hasta el momento previo a la ovulación del folículo dominante. Durante este periodo fetal las células germinales primordiales migran a la cresta gonadal primitiva donde se multiplican y posteriormente entran en la primera división meiótica, para alcanzar el estadio en el que estarán arrestadas hasta el comienzo de la maduración en su edad adulta, profase I (Curran et al., 1997). Tras esta migración, el gameto femenino se recubre de una capa de células de la granulosa, generando así el folículo primordial (Gastal et al., 2020). Posteriormente se desarrollan los folículos preantrales que son de mayor tamaño y con un mayor número de células de la granulosa rodeando al ovocito. Una vez que el folículo adquiere la capacidad de responder al estímulo de las gonadotropinas se forma el folículo antral, cuya principal característica es la presencia de una cavidad conocida como antro, que se encuentra repleta de FF. En este crecimiento folicular se produce la proliferación y diferenciación de las células de la teca y de la granulosa, aumentando la capacidad de los folículos de secretar los componentes clave en la maduración del ovocito y en la preparación para el momento de la ovulación (Ginther, 1988). Un gran número de estos folículos antrales en cada ciclo acabarán degenerando, salvo uno o en excepciones dos, terminando de diferenciarse en un folículo dominante que ovulará un ovocito en MII al final del estro (Beg & Bergfelt, 2011).

El ovocito equino está íntimamente unido a la pared del folículo por varias capas de células de la granulosa fuertemente conectadas entre sí, sin presencia de fenestraciones entre ellas (**Figura 6**) (Hinrichs, 2010). En comparación con los ovocitos bovinos, el CCO en equinos es

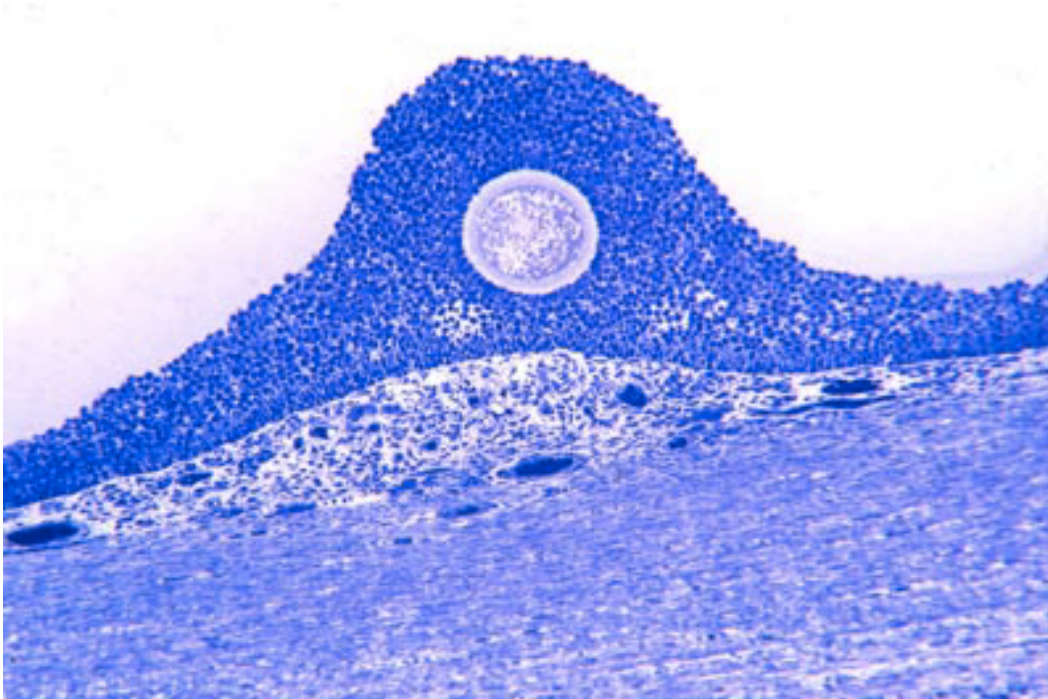


Figura 6. Ovocito equino adherido a la pared del folículo. Se puede observar las capas de células de la granulosa del cúmulo sin fenestraciones que lo rodean, las cuales, junto con las células de la granulosa de la pared forman un ancho montículo para su íntima unión a la pared del folículo (Hinrichs, 2010).

de menor tamaño y se localiza mucho más cerca de la lámina basal uniéndose a ésta con una base más ancha. En la especie bovina el CCO es de mayor espesor ya que presenta un mayor número de capas celulares unidas entre sí, con un mayor número de fenestraciones, lo que permite que puedan ser liberados con mayor facilidad (Hawley et al., 1995).

Dentro del folículo tiene lugar una comunicación bidireccional entre las células de la granulosa y el ovocito que es imprescindible para asegurar el adecuado metabolismo y crecimiento del mismo. Esto sucede o bien directamente a través de la red de espacios localizados entre las uniones de las células o a través de factores de señalización endocrinos,

paracrinus o autocrinus presentes en el FF (Machtinger et al., 2015). Esta señalización es de vital importancia para el desarrollo folicular siendo la clave que determina tanto el proceso de maduración del ovocito como su posterior competencia (Eppig et al., 2002; Hamel et al., 2008).

El FF es el microambiente ideal para el desarrollo de los ovocitos (**Figura 7**). Este FF está compuesto por un ultrafiltrado del plasma sanguíneo, el cual atraviesa la barrera hemato-folicular a través de los capilares de la teca del folículo, además de secreciones que provienen de las células de la granulosa y de la teca (Revelli et al., 2009).

En la especie equina, a diferencia de otras especies como la canina, los ovocitos alcanzan el estado de maduración nuclear (MII) en el interior del folículo, de forma previa al momento de la ovulación (Hinrichs, 2010). Por ello, el conocimiento del ambiente y los componentes del FF en las etapas previas y más cercanas a la ovulación puede aportar información específica de cada especie. Este conocimiento permitiría reproducir dichas condiciones y conseguir un ovocito madurado *in vitro* con las capacidades de maduración y desarrollo más similares al madurado *in vivo*.

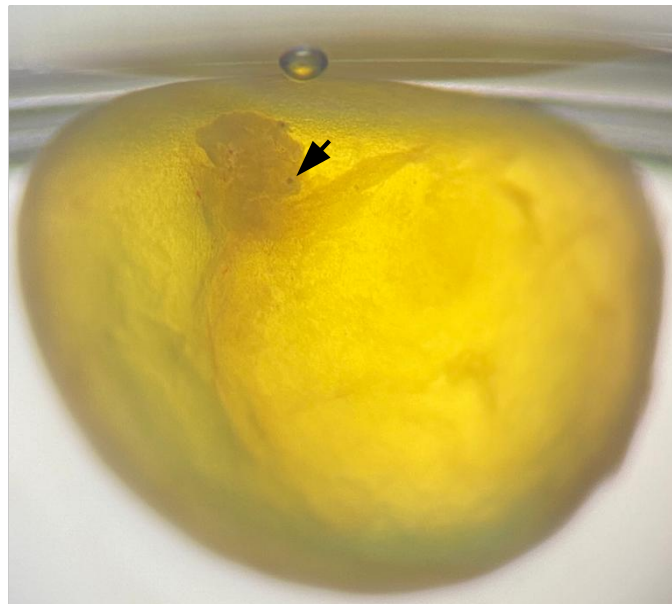


Figura 7. Detalle de una foto tomada durante la realización del raspado con cureta de hueso de ovarios de matadero. Se aprecia el CCO (flecha negra) en el interior de un folículo con su pared intacta.

6.2. Composición del fluido folicular

El FF proporciona el ambiente *in vivo* que necesita el ovocito hasta el momento de su maduración y es un buen marcador del estado funcional del folículo (Aller et al., 2013). Está compuesto por una mezcla de sustancias esenciales tales como hormonas, iones, proteínas y metabolitos, entre otros (Revelli et al., 2009). Estos componentes son fundamentales para la maduración y la posterior fecundación del ovocito, especialmente los de los folículos pre-ovulatorios y deberían ser la base de la formulación de medios de MIV (Gerard et al., 2002).

En las principales especies de mamíferos han sido realizados numerosos estudios sobre la composición del FF y de cómo sus principales componentes van variando a medida que aumenta el tamaño de los folículos, adaptándose dicho medio a las necesidades metabólicas de los ovocitos que maduran en su interior (Bridges et al., 2002; Leroy et al., 2004; Orsi et al., 2005). Además, el conocimiento de su composición supone una importante fuente de biomarcadores de crecimiento folicular y de calidad ovocitaria (Revelli et al., 2009). Desafortunadamente, debido a la complejidad y a los continuos cambios a los que el ambiente folicular está sometido, este conocimiento a día de hoy no es suficiente para comprender la regulación de dichos procesos (Paes et al., 2019).

En relación a las proteínas, algunos estudios han descrito la proteómica del FF y los cambios dinámicos que suceden durante el desarrollo folicular en la mujer (Poulsen et al., 2019), y en animales como la búfala (Fu et al., 2016), la cerda (Paes et al., 2019), la vaca (Ferrazza et al., 2017) y la yegua (Petrucci et al., 2014). Además, se han encontrado proteínas específicas con una función clave en la regulación de la maduración de los ovocitos participando algunas de ellas en el control de la respuesta inflamatoria local en el momento de la ovulación (Paes et al., 2019; Zakerkish et al., 2020). Entre ellas están las citoquinas, que juegan un papel crucial en la regulación del ambiente que mantiene cada fase de la maduración folicular (Piccinni et al., 2021). Estos estudios aportan un conocimiento de la composición proteica del FF que podría ser

una herramienta para la evaluación de la calidad ovocitaria en vacas con problemas de fertilidad (Zachut et al., 2016).

Por otro lado, se han estudiado en profundidad la composición hormonal del FF en diferentes estadios en las distintas especies, siendo la progesterona y el estradiol las hormonas que se describen con mayor relevancia (Ireland & Roche, 1983). Estas hormonas son producidas por las células somáticas del folículo y tienen un papel fundamental en el mantenimiento del ovocito, desarrollo del folículo y preparación del endometrio (Costermans et al., 2019). Existen varios estudios que demuestran que la concentración de estas hormonas es mayor en el FF que en el plasma sanguíneo (Aller et al., 2013). Además, el crecimiento de los folículos pre-ovulatorios se caracteriza por producir una gran cantidad de estradiol y progesterona, encontrándose concentraciones muy bajas de ambas hormonas en folículos atrésicos, pudiendo ser esta falta de capacidad esteroideogénica la que explica dicha degeneración folicular (Belin et al., 2000; Satué et al., 2019).

Los cambios metabólicos en el FF son imprescindibles para una adecuada maduración y competencia embrionaria (Gérard et al., 2015), siendo la capacidad metabólica el mayor determinante de la calidad ovocitaria (Richani et al., 2021).

La composición metabólica del FF ha sido descrita en humanos, bovinos, suidos y equinos, existiendo diferencias tanto entre especies como entre folículos de diferentes tamaños en la misma especie (Gérard et al., 2015; Pocate-Cheriet et al., 2020). De forma específica, las variaciones de algunos metabolitos importantes como la glucosa, el lactato y el piruvato durante el crecimiento folicular cambian significativamente según los requerimientos metabólicos del ovocito (Gerard et al., 2002; Gérard et al., 2015). La glucosa es el metabolito esencial implicado en la maduración citoplasmática y nuclear (Richani et al., 2021). La glucólisis anaerobia ha sido descrita como una de las rutas más importantes en el ovario de mamíferos (Warzych & Lipinska, 2020), pero en el ovocito de caballo la glucólisis aerobia es la principal vía de obtención de

energía y la que mayores alteraciones sufre durante el proceso de maduración en condiciones *in vitro* (Walter et al., 2019). Este metabolito también tiene un importante papel como biomarcador, ya que en vacas con problemas de fertilidad se ha encontrado unas concentraciones de glucosa foliculares menores que en vacas sanas (Warzych & Lipinska, 2020). En algunas especies como la bovina (Orsi et al., 2005), la felina (Spindler et al., 2000) y la caprina (Nandi et al., 2008) el piruvato también tiene una función importante como sustrato energético, siendo su metabolismo oxidativo una de las vías esenciales para la producción de energía en estas especies. En el caballo las concentraciones de glucosa en el FF son ligeramente superiores a las del resto de mamíferos y altas concentraciones de este metabolito durante la MIV tiene un efecto positivo en la competencia ovocitaria (Walter et al., 2019).

En relación al lactato, algunos estudios explican su presencia como un metabolito resultado de la glucólisis anaerobia (Warzych & Lipinska, 2020) aunque en base a sus altas concentraciones en el FF de humanos, también se ha postulado que podría ser usado como fuente de energía para la maduración (Piñero-Sagredo et al., 2010). A pesar de estar poco estudiada, no se debe olvidar la composición lipídica del FF ya que se ha demostrado la importancia del metabolismo de los lípidos para una adecuada progresión meiótica y competencia embrionaria (Richani et al., 2021).

En base a los hallazgos publicados, es evidente que, tanto en las rutas metabólicas como en los sustratos energéticos usados para la obtención de energía, existen variaciones entre especies. Además, varios estudios han demostrado que la concentración de nutrientes en los medios de MIV no es fisiológica y en algunos animales domésticos como la vaca, la oveja y la búfala, ya ha sido comparada en detalle con la de folículos pre-ovulatorios. Estos estudios sugieren que las diferencias entre la composición del FF y los actuales medios de MIV pueden ser la causa de la deficiente competencia de los ovocitos madurados *in vitro* (Nandi et al., 2008; Orsi et al., 2005).

De forma específica en los équidos, el metabolismo de los CCOs ha sido descrito como único comparado con otras especies, por lo que podría ser muy relevante conocer con más detalle la composición metabólica folicular, así como las vías y sus respectivos sustratos, que el ovocito utiliza para conseguir una maduración y competencia embrionaria óptimas (Lewis, Hinrichs, Leese, McG. Argo, et al., 2020). En la actualidad, algunos estudios han descrito los cambios metabólicos en la composición del FF durante el ciclo ovárico en yegua (Gérard et al., 2015) y a diferencia de otras especies, ésta no han sido comparada con la composición de los medios comerciales de MIV.

7. Ambiente Oviductal

7.1. Anatomía y fisiología

El oviducto ha sido considerado de forma errónea durante mucho tiempo como un mero conducto para el encuentro de los gametos y el transporte del embrión hacia el útero. Este órgano es un tubo sinuoso que comunica el ovario con el útero, sin embargo se ha demostrado que en él se producen sucesos con una importancia vital dentro de la función reproductiva, tales como la capacitación, la selección espermática y el desarrollo embrionario temprano (Avilés et al., 2010; Pérez-Cerezales et al., 2018).

El oviducto puede dividirse en tres regiones con diferencias anatómicas y funcionales (**Figura 8**). La parte con forma de embudo más cercana al ovario recibe el nombre de infundíbulo. Esta estructura en forma de abanico envuelve la fosa ovulatoria para facilitar la entrada del ovocito. A continuación, encontramos el ámpula, se trata de la parte intermedia y más expandida, en la cual se produce la fecundación y las primeras divisiones celulares del embrión. Por último, se puede diferenciar una zona de transición que da lugar a la estructura final y más próxima a útero, denominada istmo. El istmo es la porción muscular y más estrecha, que permite el paso de los espermatozoides hacia el ámpula para poder alcanzar así el ovocito y poder

fecundarlo; además, es la zona por la que el embrión temprano desciende hacia el útero a través de la unión útero-tubárica (Brinsko & Blanchard, 2011).

El oviducto es un pequeño órgano intra-abdominal accesible únicamente mediante cirugía o en animales *post mortem*, siendo el motivo por el que hasta los años 70, gracias a

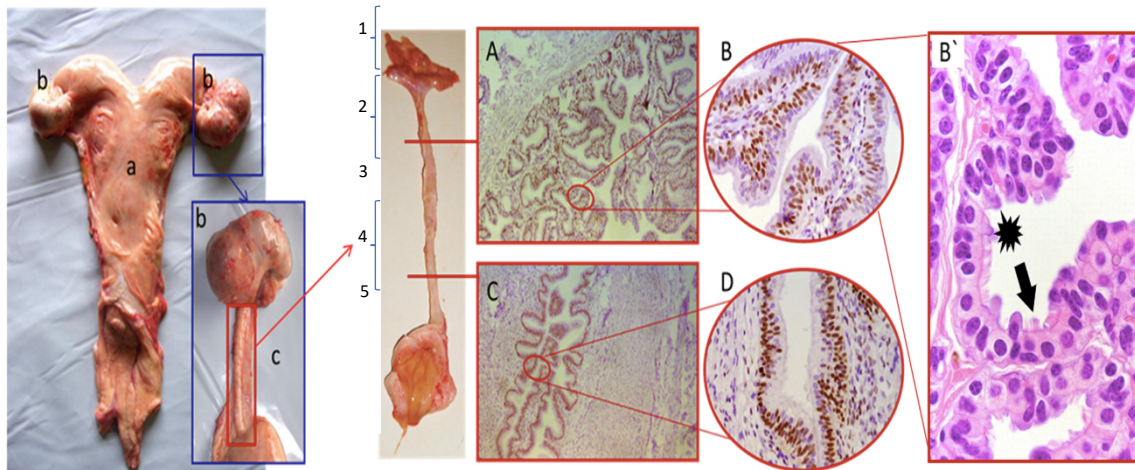


Figura 8. Detalle anatómico macroscópico e histológico del aparato reproductor de la yegua: (a) útero, (b) ovarios y (c) oviducto. Las diferentes regiones del oviducto: (1) infundíbulo, (2) ampulla, (3) transición ampulla-istmo, (4) istmo y (5) unión útero-tubárica. (A, B) Imágenes de cortes histológicos donde se muestra la ultraestructura del ampulla y (C, D) del istmo. (B') Corte histológico transversal de la ultraestructura en detalle del ampulla donde la flecha muestra una célula ciliada y la estrella una célula secretora (Maitan et al., 2021).

numerosas investigaciones sobre la fisiología y las secreciones oviductales, no se empezó a sugerir que en él se llevaban a cabo funciones importantes (Saint-Dizier et al., 2019). Su interior está recubierto por una capa de células epiteliales ciliadas que, junto con sus propias secreciones y con el plasma filtrado de la sangre componen el FO (González-Fernández et al., 2020). Este microambiente va cambiando de forma dinámica, bajo el control hormonal, según el momento del ciclo (Lamy, Gatién, et al., 2018), el lugar de la ovulación (Bauersachs et al., 2003), las diferentes regiones del oviducto (Maillo et al., 2016) o la presencia de gametos y embriones (Hunter, 2012).

El FO brinda protección, nutrición y transporte a los gametos y al embrión y permite la interacción entre éstos y las células epiteliales oviductales (Bastos et al., 2022). Al llegar los espermatozoides al oviducto, se produce una importante interacción entre los gametos masculinos y las paredes del istmo, uniéndose fuertemente a las células epiteliales y formando así un reservorio espermático en dicha zona (Coy et al., 2012). Como explicación a dicho evento, ha sido propuesto que la posterior liberación de los espermatozoides permite la selección de algunos de ellos para llegar hasta el ovocito. Dicho fenómeno no es del todo conocido, pero si ha sido relacionado con el desarrollo de eventos de capacitación e hiperactivación del espermatozoide antes de llegar al ovocito para poder fecundarlo (Mahé et al., 2021). Éstas y otras funciones de vital importancia en los eventos tempranos de la fecundación están regulados por glicoproteínas específicas del FO (Zhao et al., 2022).

Debido a la importancia de los fluidos reproductivos, en algunas especies el conocimiento de la composición del FO ha posibilitado imitar las condiciones fisiológicas, permitiendo así el éxito de la fecundación y el desarrollo embrionario *in vitro* (Avilés et al., 2010).

7.2. Composición del fluido oviductal

Como se ha comentado anteriormente, el FO genera un microambiente único y dinámico dependiente de múltiples factores, que varía en función de las necesidades metabólicas de los gametos y del embrión a medida que éstos transitan por el interior del oviducto (Bastos et al., 2022).

El FO está formado por los componentes que se transportan pasiva o activamente a través de la barrera epitelial desde el torrente sanguíneo, los secretados directamente por las células epiteliales del oviducto y parte del reflujo del FF que entra en el ámpula junto con el oviducto en el momento de la ovulación (Saint-Dizier et al., 2019). Esto genera un fluido muy diferente al plasma sanguíneo y fluido uterino, que se encuentra en renovación continua con

una compleja composición a base de metabolitos, hormonas, iones, lípidos y proteínas, entre otros compuestos (Pérez-Cerezales et al., 2018).

Las concentraciones oviductales de algunos iones como el calcio, bicarbonato, sodio, potasio, magnesio y cloro entre otros, han sido descritas y comparadas con las del suero sanguíneo o del fluido uterino en diversas especies (Ménézo et al., 2015). En el mencionado trabajo, ya se ha descrito la importancia de iones como el calcio y el bicarbonato en la fecundación. En relación a otros iones, algunos hallazgos relevantes han sido descritos, como por ejemplo que los niveles oviductales de potasio son superiores que en otros fluidos biológicos pero, sin una relevancia demostrada en el proceso de fecundación (Ménézo et al., 2015). Sin embargo, otros estudios sí hacen referencia a la importancia de iones como el cloro, que es el máximo responsable de la producción de las secreciones del tracto reproductivo, o el sodio que es esencial para la expansión del blastocisto ya que depende de bombas reguladas por sodio (S. A. Hugentobler et al., 2010). Con respecto al calcio, se ha observado en un estudio en bovino que los niveles de calcio oviductal son más altos en el día de la ovulación, pudiendo estar relacionado con la inducción de la capacitación e hiperactivación (S. A. Hugentobler, Morris, et al., 2007). Por otro lado, no debemos olvidar el papel regulador del pH extracelular en la capacitación espermática (González-Fernández et al., 2012) y la delicada sensibilidad que presentan tanto los ovocitos como los embriones a los cambios de pH (S. Hugentobler et al., 2004; Swearman et al., 2018). Hasta el día de hoy la información sobre la composición iónica del FO y las funciones de cada electrolito es limitada, sin embargo, juegan un papel muy importante en la capacitación, hipermotilidad, RA, calidad ovocitaria y la competencia y desarrollo embrionario (Saint-Dizier et al., 2019).

Recientemente, la importancia de los lípidos como fuente de energía en ovocitos, espermatozoides y embriones está tomando cada vez más relevancia frente a las rutas metabólicas convencionales que usan sustratos como la glucosa y el piruvato (Richani et al.,

2021). Además, los lípidos se acumulan tanto en el ovocito como en el embrión, por lo que debido a esto y a la gran diversidad de lípidos descrita en el FO, se han sugerido que éstos pueden participar en la proliferación como en la diferenciación celular (Saint-Dizier et al., 2019).

En relación a las hormonas, las principales hormonas esteroideas producidas por el ovario, progesterona y estrógenos, han sido encontradas en el FO en una concentración superior a la del suero en diversas especies incluida la equina (Ballester et al., 2014; Lamy et al., 2016; Nelis et al., 2016). En el humano estas hormonas han sido relacionadas con la modulación de la función espermática, en concreto la progesterona aumenta los niveles de calcio intracelular. Por el contrario, la producción de progesterona inhibe la secreción de fluido en el oviducto (Barton et al., 2020). Por otra parte, los estrógenos oviductales incrementan la producción del FO endógeno incrementando así la producción de proteínas oviductales específicas, como la oviductina, con funciones clave en la fecundación (Zhao et al., 2022). También ha sido demostrada la presencia de prostaglandina en el FO de cerda, vaca y de yegua (Saint-Dizier et al., 2019), y cómo junto con las hormonas esteroideas modulan el transporte de los gametos y del embrión a través del oviducto (Ezzati et al., 2014). Por el contrario, no hay tanta información disponible con respecto a la presencia de hormonas gonadotropas, *LH* y *FSH*, en las secreciones oviductales de los mamíferos. A pesar de que se ha encontrado la expresión de sus receptores en el epitelio oviductal de la mujer, de la rata y la cerda, la posible función de estas hormonas en el oviducto es aún desconocida (Saint-Dizier et al., 2019).

En los últimos años se ha publicado la primera descripción de la composición metabólica completa del FO en mamíferos comparando diferentes estados del estro, siendo la primera en la especie bovina (Lamy, Gatien, et al., 2018) y un par de años más tarde en la especie equina (González-Fernández et al., 2020). Estos dos estudios coinciden en la identificación de algunos metabolitos como lactato, piruvato, histamina, glicina, creatina, mioinositol y alanina. Además, describen de forma común que el lactato es uno de los metabolitos más abundantes en el FO,

que la concentración de glucosa es menor que en otros fluidos biológicos y en los principales medios de FIV. También observaron que existen diferencias entre las concentraciones de algunos metabolitos como la glicina según el momento del ciclo y el lugar de la ovulación. En otros metabolitos, cuya función en la fecundación no era tan conocida, como la glicina, el mioinositol o la histamina, se han descrito funciones importantes en la capacitación espermática, RA, fecundación y/o desarrollo embrionario temprano en especies como el hámster (Llanos et al., 2001), la bovina (Boni et al., 2017; Lim et al., 2007) o la humana (Governini et al., 2020; Gupta A, et al., 2004). A pesar del conocimiento de la composición y de la concentración del metaboloma de las secreciones oviductales, así como de la posible función de estos metabolitos en importantes aspectos reproductivos, en caballo se han realizado pocos estudios *in vitro* para comprobar si estos metabolitos usados en concentraciones fisiológicas podrían mejorar u optimizar los procesos de fecundación en esta especie.

De forma más novedosa se han comenzado a realizar estudios sobre la composición proteica del FO en especies de mamíferos como la ovina (Soleilhavoup et al., 2016), la bovina (Papp et al., 2019), la humana (Wang et al., 2016) y la equina (Smits et al., 2017). En estos trabajos se identifican un elevado número de proteínas, siendo algunas específicas del oviducto por lo que podrían desempeñar importantes funciones en la regulación de los eventos más importantes para la fecundación y el desarrollo embrionario temprano. En su clasificación funcional muchas de ellas están involucradas en procesos metabólicos y celulares (Lamy et al., 2016; Papp et al., 2019) y han sido encontradas formando parte de vesículas extracelulares, lo que permite que estas macromoléculas puedan ser incorporadas dentro de los ovocitos, del espermatozoide y de los embriones (Harris et al., 2020). Algunas de las más abundantes y específicas en el oviducto son la oviductina, la osteopontina y la glicodelina, entre otras (Coy & Yanagimachi, 2015; Killian, 2004; Lamy, Nogues, et al., 2018; McCauley et al., 2003).

La mejor manera de confirmar el papel regulador en la función reproductiva de los componentes oviductales es la realización de ensayos *in vitro* (Killian, 2004). Algunas proteínas han sido estudiadas de forma más específica con el objetivo de dilucidar si mediante su adición, bien sea de forma individual o combinadas con otros componentes del FO, podrían contribuir a la mejora de los resultados de las técnicas de reproducción asistida (Coy & Yanagimachi, 2015). En este sentido, se ha observado que la oviductina, una glicoproteína específica del oviducto, puede unirse a ambos gametos y ejercer un efecto positivo en importantes eventos como la capacitación, viabilidad y motilidad espermática, interacción del espermatozoide con el ovocito, penetración y fecundación, así como en la calidad y desarrollo embrionario (Zhao et al., 2022). Otras proteínas como la osteopontina han demostrado mejorar las tasas de fecundación y división en bovino al adicionarlas al medio de FIV, pero dicho efecto no ha podido ser replicado en la especie equina (Mugnier et al., 2009).

8. Hallazgos recientes

Durante la escritura y última etapa de esta Tesis Doctoral fueron publicados dos artículos sobre la FIV en el caballo (Felix et al., 2022; Lange-Consiglio et al., 2022), cuyos hallazgos y relevancia merecen un apartado para ser comentados.

En el trabajo de Lange-Consiglio y colaboradores (2022) consiguieron unas tasas de fecundación del 44% gracias a la adición de vesículas extracelulares provenientes del cuerno uterino y del oviducto ipsilateral a un folículo pre-ovulatorio, poniendo de manifiesto una vez más, la importancia de la imitación del ambiente fisiológico (Lange-Consiglio et al., 2022).

Por otro lado, en el trabajo de Felix y colaboradores (2022), se describe el primer protocolo de FIV convencional en el caballo con una tasa de fecundación del 90%, así como una tasa de producción de blastocistos del 74% e incluso el nacimiento de potros vivos. En este protocolo se consigue una capacitación espermática eficiente mediante la incubación

prolongada (22 horas) con epinefrina, hipotaurina y penicilamina. Después de esta incubación observan un patrón en *PY* situado en la pieza intermedia y en regiones ecuatoriales y apicales, sugiriendo que este patrón y no el descrito hasta la fecha (*PY* a lo largo de la cola del espermatozoide), es un marcador de una capacitación espermática eficiente. Este tratamiento mantiene la motilidad y evita la muerte de los espermatozoides, permitiendo así la posterior RA y la fecundación. Además, en este trabajo también se sugiere que la exposición de los espermatozoides capacitados a los CCOs induce la RA (Felix et al., 2022). Por otro lado, Lange-Consiglio y colaboradores (2022), describen la inducción de una capacitación y RA espermática utilizando vesículas extracelulares en ausencia de CCOs (Lange-Consiglio et al., 2022).

La gran limitación de los protocolos descritos en ambos trabajos es que se debe utilizar semen fresco, lo que disminuye su posible aplicación de forma rutinaria en los laboratorios de FIV. A pesar de ello, estos hallazgos servirán de herramienta para la comprensión de la capacitación espermática, de la capacidad de desarrollo de los ovocitos y de la fecundación en esta especie.

Justificación

La base del éxito en los procedimientos de FIV en todas las especies es el conocimiento de las condiciones donde se producen la fecundación *in vivo*. Por un lado, la importancia del estudio de la composición del ambiente folicular radica en que es el lugar donde el ovocito equino alcanza la madurez. Actualmente, no existen suficientes estudios que permitan dilucidar si la composición de los medios de MIV es la óptima para conseguir una congruencia entre la maduración nuclear y citoplasmática que permita una fecundación exitosa. Por otro lado, es importante conocer la composición del ambiente oviductal ya que es donde el ovocito y el espermatozoide se fusionan y donde sufren importantes modificaciones antes de que se produzca la fecundación.

En el caballo esta información es muy limitada, principalmente debido a la compleja anatomía del oviducto equino y a la baja cantidad de FO que producen las yeguas. Por estos motivos, profundizar en la caracterización de estos fluidos reproductivos y comprobar sus efectos en ambos gametos nos permitirá definir las condiciones necesarias para conseguir protocolos de FIV exitosos.

Objetivos

1. Analizar la composición metabólica del fluido folicular pre-ovulatorio equino y compararla con la de los medios comerciales usados para la maduración *in vitro* de ovocitos equinos.
2. Analizar y comparar la composición proteica del fluido oviductal pre- y post-ovulatorio equino.
3. Estudiar el efecto de diferentes concentraciones de metabolitos encontrados en el fluido oviductal post-ovulatorio sobre parámetros relacionados con la capacitación en espermatozoides equinos descongelados.
4. Comprobar el efecto del fluido oviductal post-ovulatorio en la inducción de la fosforilación en residuos de tirosina en espermatozoides descongelados y en la fecundación *in vitro* convencional.

Material, Métodos y Resultados

A continuación, se exponen los resultados obtenidos en los cuatro trabajos que componen la presente Tesis Doctoral. La sección de Material y Métodos se ha incluido en este apartado ya que cada trabajo contiene una descripción detallada de los mismos. Los tres primeros trabajos están aceptados y publicados y el último se trata de un estudio preliminar presentado como póster en el Congreso Internacional de Reproducción Animal celebrado del 26 al 30 de junio de 2022 en Bolonia (*19th International Congress on Animal Reproduction ICAR 2020+2*).

1. **Pablo Fernández-Hernández**, María Jesús Sánchez-Calabuig, Luis Jesús García-Marín, María J. Bragado, Alfonso Gutiérrez-Adán, Óscar Millet, Chiara Bruzzone, Lauro González-Fernández and Beatriz Macías-García. 2020. "Study of the metabolomics of equine preovulatory follicular fluid: A way to improve current in vitro maturation media." *Animals* 10(5):883. doi: 10.3390/ani10050883.
2. **Pablo Fernández-Hernández**, Federica Marinaro, María Jesús Sánchez-Calabuig, Luis Jesús García-Marín, María Julia Bragado, Lauro González-Fernández and Beatriz Macías-García. 2021. "The proteome of equine oviductal fluid varies before and after ovulation: A comparative study." *Frontiers in Veterinary Science* 8:694247. doi: 10.3389/fvets.2021.694247.
3. **Pablo Fernández-Hernández**, Luis Jesús García-Marín, María Julia Bragado, Andrés Domingo, Lauro González-Fernández and Beatriz Macías-García. 2022. "Selected metabolites found in equine oviductal fluid do not modify the parameters associated to capacitation of the frozen-thawed equine spermatozoa in vitro." *Journal of Equine Veterinary Science* 111:103875. doi: 10.1016/j.jevs.2022.103875.

4. **Pablo Fernández-Hernández**, Beatriz Macías-García and Lauro González-Fernández. 2022. "Influence of supplementation of fertilization medium with equine oviductal fluid on the fertilizing capacity of frozen/thawed equine spermatozoa" Abstract book W49, pag. 194 of 19th International Congress on Animal Reproduction ICAR 2020+2. <https://iris.unito.it/retrieve/f08db1bf-68d0-4fa7-896d-80abfe6967f9/ICAR%202020%2B2%20abstract-book%20T81%20pp%20135.pdf>

Article

Study of the Metabolomics of Equine Preovulatory Follicular Fluid: A Way to Improve Current In Vitro Maturation Media

Pablo Fernández-Hernández ^{1,2}, María Jesús Sánchez-Calabuig ^{3,4}, Luis Jesús García-Marín ^{1,5},
María J. Bragado ^{1,6}, Alfonso Gutiérrez-Adán ³, Óscar Millet ⁷, Chiara Bruzzone ⁷,
Lauro González-Fernández ^{1,6,†} and Beatriz Macías-García ^{1,2,*}

¹ Research Group of Intracellular Signaling and Technology of Reproduction, Research Institute INBIO G + C, University of Extremadura, 10003 Cáceres, Spain; pablofh@unex.es (P.F.H.), ljgarcia@unex.es (L.J.G.M.), jbragado@unex.es (M.J.B.), lgonfer@unex.es (L.G.F.)

² Department of Animal Medicine, Faculty of Veterinary Sciences, University of Extremadura, 10003 Cáceres, Spain

³ Department of Animal Reproduction, INIA, 28040 Madrid, Spain; mariasanchezcalabuig@gmail.com (M.J.S.C.), agutierr@inia.es (A.G.A.)

⁴ Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Sciences, University Complutense of Madrid, 28040 Madrid, Spain

⁵ Department of Physiology, Faculty of Veterinary Sciences, University of Extremadura, 10003 Cáceres, Spain

⁶ Department of Biochemistry and Molecular Biology and Genetics, Faculty of Veterinary Sciences, University of Extremadura, 10003 Cáceres, Spain

⁷ Precision Medicine and Metabolism Lab., CICbioGUNE, 48160 Vizcaya, Spain; omillet@cicbiogune.es (O.M.), cbruzzone@cicbiogune.es (C.B.)

* Correspondence: bemaciasg@unex.es

† These authors contributed equally to the present work as senior investigators.

Received: 20 April 2020; Accepted: 14 May 2020; Published: 19 May 2020

Simple Summary: Commercial in vitro embryo production in horses by ICSI (intracytoplasmic sperm injection) is currently used to produce embryos clinically. However, the successful pregnancy and foaling rates obtained after ICSI are only 10% of the oocytes matured in vitro. Conditions used for oocyte in vitro maturation are not optimized for equine oocytes. Hence, in the present work, we aimed to elucidate the major metabolites present in equine preovulatory follicular fluid obtained from postmortem mares using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H-NMR). Twenty-two metabolites were identified; among these, nine of them are not included in the composition of in vitro maturation media. Hence, our data suggest that the currently used media for equine oocyte maturation can be further improved.

Abstract: Production of equine embryos in vitro is currently a commercial technique and a reliable way of obtaining offspring. In order to produce those embryos, immature oocytes are retrieved from postmortem ovaries or live mares by ovum pick-up (OPU), matured in vitro (IVM), fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI), and cultured until day 8–10 of development. However, at best, roughly 10% of the oocytes matured in vitro and followed by ICSI end up in successful pregnancy and foaling, and this could be due to suboptimal IVM conditions. Hence, in the present work, we aimed to elucidate the major metabolites present in equine preovulatory follicular fluid (FF) obtained from postmortem mares using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H-NMR). The results were contrasted against the composition of the most commonly used media for equine oocyte IVM: tissue culture medium 199 (TCM-199) and Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F-12 Ham (DMEM/F-12). Twenty-two metabolites were identified in

equine FF; among these, nine of them are not included in the composition of DMEM/F-12 or TCM-199 media, including (mean \pm SEM): acetylcarnitine (0.37 ± 0.2 mM), carnitine (0.09 ± 0.01 mM), citrate (0.4 ± 0.04 mM), creatine (0.36 ± 0.14 mM), creatine phosphate (0.36 ± 0.05 mM), fumarate (0.05 ± 0.007 mM), glucose-1-phosphate (6.9 ± 0.4 mM), histamine (0.25 ± 0.01 mM), or lactate (27.3 ± 2.2 mM). Besides, the mean concentration of core metabolites such as glucose varied (4.3 mM in FF vs. 5.55 mM in TCM-199 vs. 17.5 mM in DMEM/F-12). Hence, our data suggest that the currently used media for equine oocyte IVM can be further improved.

Keywords: IVM; oocytes; equine; metabolomic

1. Introduction

Production of equine embryos *in vitro* is currently a commercial technique and a reliable way of producing embryos for vitrification or uterine/oviductal transfer [1]. In order to produce those embryos, immature oocytes are retrieved from postmortem ovaries or live mares by ovum pick-up (OPU) [2], matured *in vitro* (IVM), fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI), and cultured until day 8–10 of development [3]. However, among all the oocytes used for ICSI, in the best of the scenarios, roughly 10% of them end up in successful pregnancy and foaling [1,4]. Surprisingly, when *in vivo* matured equine oocytes are transferred to oviducts of live mares to produce equine offspring, the likelihood of pregnancy rises to 75%, contrasting with the 40% obtained when the oocytes transferred are matured *in vitro* [1]. These results highlight the fact that the media and conditions used for oocytes matured *in vitro* (IVM) largely differ from the physiological conditions required for correct nuclear and cytoplasmic maturation in horses, therefore decreasing the oocyte's developmental competence.

It has to be noted that the base media more commonly used for equine IVM are tissue culture medium 199 (TCM-199) or Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F-12 Ham (DMEM/F-12), which are generally chosen depending on the preferences of the laboratory where IVM is performed, and core differences exist among them [5]. Furthermore, none of these media have been developed specifically for equine IVM; instead, they were developed for cell culture, albeit equine cumulus–oocyte complexes (COCs) are capable of maturing with similar efficiency in either media [3,6,7].

To try to better understand the physiological conditions that equine COCs require and improve current IVM conditions, several reports have tried to address the metabolic requirements of equine COCs *in vitro* [5,6,8], the differences between the proteomic profiles of equine COCs matured *in vivo* or *in vitro* [8], or the differential expression and localization of glycosidic residues in equine COCs matured *in vitro* vs. *in vivo* [9], among other approaches. All these reports have revealed a specific metabolic profile of equine COCs matured *in vitro* and important differences between equine COCs matured *in vitro* vs. *in vivo*. However, no research has been conducted to develop a defined oocyte equine-specific maturation medium. Hence, in the present work, we aimed to elucidate the metabolomic composition of equine preovulatory follicular fluid (FF). To do this, the major metabolites present in equine preovulatory follicular fluid were analyzed by high-field proton nuclear magnetic resonance spectroscopy ($^1\text{H-NMR}$) and the results were contrasted against the composition of the formerly mentioned media according to the manufacturer's specifications.

2. Materials and Methods

2.1. Collection of Equine Follicular Fluid

Follicular fluid was obtained immediately postmortem at a commercial slaughterhouse, on four separate days. At the time of evisceration, the entire mare reproductive tract was extracted and carefully inspected. The ovaries were examined and those tracts having a preovulatory follicle ≥ 35 mm in diameter, associated with uterine edema on examination of the opened endometrial surface (vivid endometrial folds with a gelatinous appearance), were sampled as preovulatory. The fluid was collected using a 10 mL plastic syringe attached to a 20 g hypodermic needle. The fluid obtained was separated into 1.5 mL Eppendorf tubes and centrifuged for 2 min in a microcentrifuge at room temperature (RT) to remove large cellular masses. The supernatant was retrieved, transferred to a clean tube, and placed in dry ice until its arrival at the laboratory (4–5 h). Once at the laboratory, the fluid was thawed and centrifuged at $16,000\times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min, and the supernatant was transferred to a clean tube. The samples were then kept at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

2.2. Sample Preparation

Samples of follicular fluid from six different mares (one sample per mare) at the preovulatory stage (PRE) were used ($n = 6$). For the preparation of the nuclear magnetic resonance samples (NMR), the follicular fluids were pretreated. A methanol extraction was performed with the following protocol: samples were defrosted at room temperature for 30 min slowly on ice and 170 μL of follicular fluid of each sample were placed in a 1.5 mL Eppendorf tube and 1.3 mL of a mixture of methanol:deuterated water in a ratio 2:1 was added to the follicular fluid. The Eppendorf tube with the extraction was placed at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ with agitation for 4 h. The mixture was centrifuged at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ at $25,000\times g$ for 30 min. The supernatant was transferred to a new 2 mL Eppendorf tube and the samples were plunged in liquid N_2 . Once the mixtures were frozen, samples were subjected to lyophilization. For sample analysis, the lyophilized product was resuspended with 500 μL of 0.2 M potassium phosphate buffer in deuterium oxide (D_2O) with a pH of 7.4 ± 0.5 and 1.11 μL of TSP (3-(Trimethylsilyl) propanoic acid), to reach a final volume of 500 μL . Samples were briefly vortexed and 500 μL of the follicular fluid/buffer mixture were finally pipetted into a 5 mm NMR tube. In all cases, sample preparation was manually done at RT.

2.3. NMR Measurements

Samples were measured at 298 K in an 800 MHz Bruker spectrometer (AVANCE III, Bruker Biospin GmbH, Reinsthetten, Germany) equipped with a ^1H detected cryoprobe with z-gradient and automatic tuning and matching unit. Optimization of experimental conditions included automated tuning and matching, automated locking, and automated shimming using TopShim. The 90° hard pulse was optimized to be sample-specific and the presaturation field strength was adjusted to 25 Hz. To minimize the interference of the water content in the NMR spectrum, solvent suppression techniques were applied.

For each sample, one-dimensional (1D) ^1H -NMR spectra were collected using a Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) pulse sequence; 2D J -resolved included 800×40 points. Data analysis was done using the TopSpin 3.5 software (Bruker Biospin GmbH, Reinsthetten, Germany). Free induction decays were multiplied by an exponential function equivalent to 0.3 Hz line-broadening before applying a Fourier transformation. All transformed spectra were automatically corrected for phase and baseline distortions and referenced to the DSS singlet at 0 ppm for further analysis.

The 2D- J res experiment was also routinely included in the acquisition package, along with the 1D ^1H -NOESY. This experiment separates J -couplings and chemical shifts in the 2D plane and provides a useful and simplified proton-decoupled projection spectrum. A standard pulse sequence with a water peak suppression was used. After 16 dummy scans, 2 free induction decays (FIDs) were accumulated into $8\text{ k} \times 40$ data points at a spectral width of 16 ppm.

For assignment purposes, a battery of experiments including 2D-¹H, ¹³C-HSQC, 2D-¹H, ¹H-TOCSY, and 2D ¹H-¹H-NOESY were recorded in a Bruker Avance III 800 MHz spectrometer (Figure S1). The chemical shift, multiplet type, and number of contributing nuclei to each metabolite are provided in Table 1 and were determined following previously validated methods [10–12].

Table 1. Chemical shift assignment, multiplicity, and number of contributing protons for the identified metabolites.

Metabolite Name	Chemical Shift (ppm)	Multiplet Type	Protons Contributing
Acetylcarnitine	3.8	dd	9
	3.2	s	
	2.6	dd	
Acetate	1.91	s	3
Alanine	1.46	d	3
	3.76	q	
Aspartate	3.89	dd	2
	2.66	dd	
Carnitine	3.41	m	9
	3.21	s	
	2.42	m	
Choline	3.18	s	9
Citrate	2.52	d	2
Creatine	3.02	s	3
Creatine phosphate	3.03	s	3
Fumarate	6.51	s	2
	5.22	d	
Glucose	3.88	dd	1
	3.72	m	
	3.52	dd	
	3.45	m	
	3.23	dd	
Glucose-1-phosphate	3.75	m	1
	3.39	t	
Glycine	3.54	s	2
Histamine	7.99	s	1
	7.14	s	
Histidine	7.9	d	1
	7.09	d	
Isoleucine	0.99	d	3
Lactate	4.1	q	3
	1.3	d	
Leucine	3.72	m	6
	1.70	m	
	0.94	t	
Pyruvate	2.4	s	3
Succinate	2.39	s	
Threonine	4.24	m	1
	1.31		
Valine	1.02	m	3
	0.97	d	

Multiplet type: s—singlet; d—doublet; t—triplet; dd—doublet of doublets; q—quadruplet; m—multiplet.

2.4. Commercial Media Composition

The composition of commercial media routinely used in our laboratory: TCM-199 with Earle's salts (Ref. 31150022; Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)) and DMEM/F-12 (Ref. 11320033;

Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)) were directly extracted from the manufacturer's website.

2.5. Statistical Analysis

Data were analyzed using descriptive statistics to establish the mean, standard error of the mean, minimum, and maximum for each metabolite using the software Sigma Plot (ver. 12.0) for windows (Systat Software, Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Metabolite Identification

The chemical shift assignment for each metabolite was performed using a random follicular fluid sample; the spectra of the FF (Figure S1) was contrasted against the identified metabolites that were chosen based on our previous study in horses [13]. The list of the chemical shift for each proton nucleus of each metabolite is provided in Table 1. The measured concentrations of 22 metabolites, which were selected based on the report of González-Fernández et al. (2020) [13], and the known identification capabilities of the NMR facility for preovulatory follicular fluid samples are presented in Table 2. Pyruvate and succinate are characterized by one single peak with the same chemical shift and cannot be discriminated; therefore, they are presented as the sum of both metabolites. All metabolites were detected in all the samples except for acetylcarnitine, which could not be detected in one sample submitted to NMR analysis.

Table 2. Concentrations of metabolites detected in equine preovulatory follicular fluid.

Metabolite	Follicular Fluid (mM)
Acetylcarnitine	0.37 ± 0.2 (0.02–1.148)
Acetate	1.5 ± 0.6 (0.5–4.1)
Alanine	1.1 ± 0.14 (0.74–1.6)
Aspartate	2.7 ± 0.3 (2.1–3.7)
Carnitine	0.09 ± 0.01 (0.04–0.14)
Choline	0.03 ± 0.01 (0.01–0.09)
Citrate	0.4 ± 0.04 (0.3–0.5)
Creatine	0.36 ± 0.14 (0.15–0.9)
Creatine phosphate	0.36 ± 0.05 (0.2–0.6)
Fumarate	0.05 ± 0.007 (0.03–0.07)
Glucose	4.3 ± 0.4 (3.1–5.5)
Glucose-1-phosphate	6.9 ± 0.4 (5.75–8.9)
Glycine	3.2 ± 0.5 (1.26–4.8)

Histamine	0.25 ± 0.01 (0.2–0.27)
Histidine	0.05 ± 0.009 (0.04–0.07)
Isoleucine	0.6 ± 0.07 (0.4–0.9)
Lactate	27.3 ± 2.2 (19.3–35.02)
Leucine	0.5 ± 0.05 (0.4–0.8)
Pyruvate + Succinate	0.16 ± 0.03 (0.08–0.3)
Threonine	0.35 ± 0.03 (0.14–0.8)
Valine	0.13 ± 0.02 (0.09–0.2)

The results are presented as mean ± SEM (minimum value–maximum value); the values correspond to 6 different mares ($n = 6$).

3.2. Comparison of the Metabolites Present in Commercial Media and Equine Preovulatory Follicular Fluid

Among the 22 metabolites identified in native preovulatory FF, nine of them are not present in TCM-199 or DMEM/F-12 according to the manufacturer's specifications (Table 3). These metabolites were: acetylcarnitine, carnitine, citrate, creatine, creatine phosphate, fumarate, glucose-1-phosphate, histamine, and lactate. Other metabolites such as acetate is present in FF and TCM-199 but not in DMEM/F-12, while pyruvate is included in the composition of DMEM/F-12 and possibly is present in FF (as it cannot be discriminated from succinate) but not in TCM-199. Vivid differences exist in the concentration of core metabolites such as lactate (27.3 mM in FF vs. 0 mM in TCM-199 and DMEM/F-12), glucose (4.3 mM in FF vs. 5.55 mM in TCM-199 vs. 17.5 mM in DMEM/F-12), alanine (1.1 mM in FF vs. 0.28 mM in TCM-199 vs. 0.05 mM in DMEM/F-12), aspartate (2.7 mM in FF vs. 0.22 mM in TCM-199 vs. 0.05 mM in DMEM/F-12), or glycine (3.2 mM in FF vs. 0.67 mM in TCM-199 vs. 0.25 mM in DMEM/F-12).

Table 3. Presence and concentration of the metabolites found in equine preovulatory follicular fluid, and in TCM-199 and DMEM/F-12 media (manufacturer's specifications).

Metabolite	Follicular Fluid (mM)	TCM-199 (mM)	DMEM/F-12 (mM)
Acetate	1.5	0.61	-
Acetylcarnitine	0.37	-	-
Alanine	1.1	0.28	0.05
Aspartate	2.7	0.22	0.05
Carnitine	0.09	-	-
Citrate	0.4	-	-
Creatine	0.36	-	-
Creatine phosphate	0.36	-	-
Choline	0.03	0.003	0.064
Fumarate	0.05	-	-
Glucose (d-Glucose)	4.3	5.55	17.5
Glucose-1-phosphate	6.9	-	-
Glycine	3.2	0.67	0.25
Histamine	0.25	-	-
Histidine	0.05	0.1	0.15
Isoleucine	0.6	0.3	0.41

Lactate	27.3	-	-
Leucine	0.5	0.46	0.45
Pyruvate + Succinate	0.16	-	0.5
Threonine	0.35	0.25	0.45
Valine	0.13	0.21	0.45

4. Discussion

In the present work, the metabolome of equine preovulatory FF was investigated using $^1\text{H-NMR}$. Our work revealed the presence of at least 22 metabolites including carbohydrates, amino acids, and intermediate metabolites (Table 2). The metabolome of equine FF at different dominant follicular stages (early dominant, late dominant, and healthy preovulatory stage) has previously been described by Gérard et al. in 2002 [14]. In their work, they did not detect apparent differences in the pattern or concentration of the metabolites detected among the studied stages. These authors described eight peaks corresponding to chemical groups of sugar chains and N-acetyl groups of glycoconjugates, CH_3 groups of lipoproteins, trimethylamines, acetate, alanine, creatine/creatinine, and polyamines, plus a non-identified peak at 3.1 ppm, but quantitative identification of the peaks is not provided [14]. In our work, we detected 21 peaks (as succinate and pyruvate were overlapped; Table 1); an explanation for the differences found in the number of peaks (8 vs. 21) can be easily explained as Gérard et al. (2002) used a 200 MHz Bruker spectrometer (in our work we used an 800 MHz spectrometer and a cryoprobe) and the samples were directly diluted in deuterated water (instead of being previously subjected to a methanol extraction and lyophilization as in the present work), likely resulting in higher water interferences and lower spectra resolution [14]. Hence, in the formerly mentioned work, some peaks as citrate are suspected, while in our work, it was detected in all samples due to a better resolution of current NMR spectrometers (Tables 1 and 2). It must be mentioned that citrate and fumarate are not routinely added to base equine IVM media (Table 3) as both are intermediate metabolites produced by the metabolism of glucose in the tricarboxylic acid cycle (TCA); specifically, citrate comes from acetyl-CoA and oxaloacetate in the tricarboxylic acid cycle (TCA). Citrate acts as a key substrate for epigenetic modifiers in the oocyte [15,16] and is a link between TCA, β -hydroxybutyrate, and lipid metabolism in FF [17,18], so adequate supplementation could be important during equine IVM and should be added to TCM-199 (Table 3). Regarding pyruvate, this molecule has been previously reported to range between 0.03 and 0.13 mM in FF from early and late dominant equine follicles, respectively [19]. This metabolite has been demonstrated to be crucial for adequate oocyte metabolism [5] and is also involved in active reactive oxygen species scavenging [20]. In equine oocytes, it has been demonstrated that when DMEM/F-12 is supplemented with pyruvate at 0.15 mM, this induces an increase in glycolytic activity, without affecting mitochondrial oxidative phosphorylation [5]. The concentration of pyruvate above reported for equine FF [19] coincides with our work in which $0.16 \text{ mM} \pm 0.03$ was observed. However, in our experiments, succinate could not be discriminated from pyruvate, and thus, exact values cannot be provided; nevertheless, as per previous reports, pyruvate addition to equine IVM media and the concentration at which it is supplemented needs to be seriously considered.

The research group of Gérard et al. also published in 2015 another report in which they performed a comparative metabolomic study of porcine, equine, and bovine FF [21]. In this report, even when the extraction method remained the same as in their previous work, a 500 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectrometer was used and the resolution of the analysis was improved. In this work, they described the presence and concentration of some metabolites that coincide with the ones reported in the present work such as acetate, alanine, citrate, and glucose (alpha and beta, while in our work, glucose and glucose-1-phosphate were detected) [21]. However, the concentration of other metabolites reported in their work such as histidine ($0.05 \pm 0.009 \text{ mM}$ in our work vs. 0.27 mM [21]) and valine ($0.13 \pm 0.02 \text{ mM}$ in our work vs. 0.37 mM [21]) do not agree with our findings. These differences can be attributed to the different equipment used, the sample extraction method, or the fact that Gérard et al. (2015) recovered the FF by transvaginal aspiration of follicles around 33 mm and in our work postmortem FF was obtained from bigger follicles (35–45 mm). Interestingly, lactate concentration

largely differs in our report compared with that obtained by Gerard et al. [21] ($27.3 \text{ mM} \pm 2.2$ vs. $0.70 \text{ mM} \pm 0.18$, respectively), the time between mare decease and sample obtention being around 30 min. This time lapse could lead to lactate postmortem accumulation [22] as previously observed for equine oviductal fluid [13]. Nevertheless, the high lactate concentration observed in the present work ($19.3\text{--}35.02 \text{ mM}$) cannot be solely explained as the metabolism of the typical amount of available glucose (2 molecules of lactate per 1 of glucose consumed [17]), as the concentration of glucose observed in our work matches previous reports [14,19,21,23], and thus appears to reflect a high level of lactate in the equine FF. However, it has to be noticed that the equine FF analyzed by Gérard et al. (2015) [21] was retrieved when the dominant follicle reached 33 mm, while it has been demonstrated that in equine follicles reaching 39 mm 24 h after equine crude gonadotropin administration, the lactate values reach 4 mM, this concentration of lactate being closely related to adequate meiosis resumption in equine oocytes [19]. Similar findings among lactate production during IVM and oocyte competence in the horse have been recently reported *in vitro* [5], highlighting the important relationship existing between anaerobic glycolysis and oocyte meiotic competency in the horse, strongly suggesting that FF may be providing energy to the oocyte in the form of lactate as postulated in humans [17]. Furthermore, high lactate concentrations in the FF have been linked to improved pregnancy rates in humans [24], and this metabolite could be an important additive contributing to osmolarity adjustment, as reported in human oviductal fluid [25]; hence, lactate would need to be supplemented to equine IVM media (Table 3).

Notably in our NMR spectra, different intracellular metabolites such as glucose-1-phosphate, creatine, creatine phosphate, and carnitine were found. These metabolites cannot be incorporated into the oocytes in their molecular form and may have been released from the granulosa cells due to cellular damage. However, recent investigations have demonstrated that a wide variety of intracellular metabolites are also present in the oviductal fluid of cows and horses [13,26], embedded in extracellular vesicles [27]. The compounds included in these vesicles could enter the oocytes/embryos via fusion as previously demonstrated in mouse embryos [28], contributing to the oocyte's developmental competence and metabolism as observed in cows [29]. It is known that carnitine plays a major role in the catabolism of lipids, allowing the transport of fatty acids from the cytosol to the mitochondria, where they are metabolized through beta-oxidation, which has also been identified in human FF [30]. Surprisingly, this work demonstrated the presence of carnitine in the FF but did not find expression of the enzymes involved in the carnitine synthesis either in oocytes or in cumulus cells. In contrast, the enzymes related to beta-oxidation were highly expressed in the oocyte and cumulus cells as also demonstrated in horses [8]. Therefore, this compound may also need to be somehow included in equine IVM media to ensure adequate oocyte lipid metabolism [30], as low concentration of carnitine in the FF has been associated with low reproductive performance outcome in sows [31]. The presence of creatine in the equine FF has been previously reported at similar concentrations to the ones reported in the present work [14]. Creatine and creatine phosphate are produced as a result of arginine and glycine metabolism. Even when arginine was not found in equine FF (Tables 1 and 2), arginine was present in TCM-199 (0.33 mM) and DMEM/F-12 (0.7 mM). Interestingly, arginine depletion during the final 6 h of IVM of human oocytes was associated with a higher maturation potential [32,33]. Hence, even when arginine was not detected in our experiments (Table 1), our data suggest that an active metabolism of arginine could be occurring during *in vivo* maturation of equine oocytes explaining the depletion of this amino acid in the FF and thus, the arginine present in the equine IVM media (TCM-199 and DMEM/F-12) could be needed. Glycine is known to be an organic osmolyte that regulates osmolarity in cells and embryos [34] and is one of the most abundant amino acids in follicular and uterine fluids [35]. Interestingly, its concentration in the FF has been demonstrated to predict the cleavage rate of oocytes after insemination (being a stronger marker of cleavage capacity in lower grade oocytes) as well as to be a good marker of the blastocyst rate in bovine [36]. Hence, considering the vivid difference existing in glycine concentration among TCM-199, DMEM/F-12, and native equine preovulatory FF (Table 3), the concentration at which this amino acid is added to equine IVM media should be carefully evaluated.

Interestingly, glucose-1-phosphate was detected in equine preovulatory FF (Table 1). This molecule is derived from glycogen, which is generally metabolized in the liver but is also a metabolic source used by granulosa cells in humans, pigs, bulls, and mice [15,37,38]. Thus, in view of our data, the equine oocyte also relies on glycogen metabolism as is also proposed in previous reports [5]. This is an interesting finding as, in our experiments, the amount of glucose-1-phosphate found ($6.9 \text{ mM} \pm 0.4$) surpassed the quantity of glucose ($4.3 \pm 0.4 \text{ mM}$), indicating that glycogen metabolism could support equine oocyte maturation *in vivo*, and more research is needed in this field, as this energy source is not generally considered in equine oocytes.

Other metabolites such as histamine, which has recently been found in equine oviductal fluid [13], are also present in horse FF and could be involved in ovulation induction, as observed in rabbits and rats [39,40] and as also postulated in horses [41].

Our results demonstrate that the base media used for equine IVM and the composition of preovulatory equine FF greatly differ. One limitation of the present study is that the composition of fetal bovine serum (FBS) that is usually added at concentrations ranging from 10% to 20% to equine IVM media has not been considered [4,42]. It is well known that FBS composition greatly varies among batches, and thus, a significant error could be introduced if the composition of a single batch was considered; this is why FBS composition is not considered in the present report.

5. Conclusions

In conclusion, our data provide new insights into equine preovulatory follicular fluid composition comparing it with the most widely used commercial media available for equine IVM (TCM-199 and DMEM/F-12). Our data provide new metabolite information that should be considered to design specific equine IVM media and help to improve current *in vitro* fertilization outcomes in the equine species. More research is warranted to better understand the metabolic requirements of equine oocytes and the relationship among metabolism, oocyte meiotic competence, and developmental competence.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/10/5/883/s1, Figure S1. Metabolite assignment on 1D ^1H NMR spectra of an FF sample. (A) Chemical shift region from 6.4 to 8.0 ppm, (B) chemical shift region from 3 to 4.2 ppm, (C) chemical shift region from 1.8 to 2.5 ppm, (D) chemical shift region from 0.8 to 1.5 ppm.

Author Contributions: Conceptualization, L.G.F. and B.M.G.; Data curation, P.F.H. and Ó.M.; Formal analysis, P.F.H., Ó.M., C.B., and B.M.G.; Funding acquisition, M.J.S.C., L.J.G.M., M.J.B., A.G.A., and B.M.G.; Investigation, M.J.S.C., A.G.A., C.B., and L.G.F.; Methodology, M.J.S.C. and Chiara Bruzzone; Project administration, B.M.G.; Resources, Ó.M.; Software, C.B.; Supervision, Ó.M.; Validation, C.B.; Writing—original draft, P.F.H., M.J.B., A.G.A., and B.M.G.; Writing—review & editing, M.J.S.C., L.J.G.M., Ó.M., and L.G.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (AEI/FEDER/UE); References: RTI2018-093548-B-I00, AGL2017-84681-R and RYC-2017-21545 (this last awarded to B. Macías-García). L. González-Fernández was supported by regional grant “Atracción y retorno de talento investigador a Centros de I+D+i pertenecientes al Sistema Extremeño de Ciencia, Tecnología e Innovación” from “Junta de Extremadura” (Spain); Reference: TA18008. P. Fernández-Hernández was supported by a grant “Acción II” from the University of Extremadura (Ref. Beca RC4).

Acknowledgments: The help of the veterinary team (Gerardo, Carmen, and Jesús) at the slaughterhouse (Incarsa, Burgos, Spain) is warmly appreciated. This work is dedicated to all the victims of Covid-19 who will not directly benefit from our results but would possibly be relieved to know that science never stops, not even in difficult scenarios. To Daniela and Bruno González-Macías and all the kids who are valiantly coping with confinement.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Hinrichs, K. Assisted reproductive techniques in mares. *Reprod. Domest. Anim.* **2018**, *53*, 4–13, doi:10.1111/rda.13259.
2. Velez, I.C.; Arnold, C.; Jacobson, C.C.; Norris, J.D.; Choi, Y.H.; Edwards, J.F.; Hayden, S.S.; Hinrichs, K. Effects of repeated transvaginal aspiration of immature follicles on mare health and ovarian status: Effect of transvaginal aspiration on health. *Equine Vet. J.* **2012**, *44*, 78–83, doi:10.1111/j.2042-3306.2012.00606.x.
3. Choi, Y.-H.; Velez, I.C.; Macías-García, B.; Riera, F.L.; Ballard, C.S.; Hinrichs, K. Effect of clinically-related factors on in vitro blastocyst development after equine ICSI. *Theriogenology* **2016**, *85*, 1289–1296, doi:10.1016/j.theriogenology.2015.12.015.
4. Galli, C.; Duchi, R.; Colleoni, S.; Lagutina, I.; Lazzari, G. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: From the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology* **2014**, *81*, 138–151, doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.008.
5. Lewis, N.; Hinrichs, K.; Leese, H.J.; Argo, C.M.; Brison, D.R.; Sturmey, R. Energy metabolism of the equine cumulus oocyte complex during in vitro maturation. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 3493, doi:10.1038/s41598-020-60624-z.
6. González-Fernández, L.; Sánchez-Calabuig, M.J.; Alves, M.G.; Oliveira, P.F.; Macedo, S.; Gutiérrez-Adán, A.; Rocha, A.; Macías-García, B. Expanded equine cumulus-oocyte complexes exhibit higher meiotic competence and lower glucose consumption than compact cumulus-oocyte complexes. *Reprod. Fertil. Dev.* **2018**, *30*, 297–306, doi:10.1071/RD16441.
7. Galli, C.; Lazzari, G. The manipulation of gametes and embryos in farm animals. *Reprod. Domest. Anim. Zuchtthg.* **2008**, *43* (Suppl. 2), 1–7, doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01136.x.
8. Walter, J.; Huwiler, F.; Fortes, C.; Grossmann, J.; Roschitzki, B.; Hu, J.; Naegeli, H.; Laczko, E.; Bleul, U. Analysis of the equine “cumulome” reveals major metabolic aberrations after maturation in vitro. *BMC Genom.* **2019**, *20*, 588, doi:10.1186/s12864-019-5836-5.
9. Accogli, G.; Douet, C.; Ambruosi, B.; Martino, N.A.; Uranio, M.F.; Deleuze, S.; Dell’Aquila, M.E.; Desantis, S.; Goudet, G. Differential expression and localization of glycosidic residues in in vitro- and in vivo-matured cumulus-oocyte complexes in equine and porcine species. *Mol. Reprod. Dev.* **2014**, *81*, 1115–1135, doi:10.1002/mrd.22432.
10. Embade, N.; Cannet, C.; Diercks, T.; Gil-Redondo, R.; Bruzzzone, C.; Ansó, S.; Echevarría, L.R.; Ayucar, M.M.M.; Collazos, L.; Lodoso, B.; et al. NMR-based newborn urine screening for optimized detection of inherited errors of metabolism. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13067, doi:10.1038/s41598-019-49685-x.
11. Beckonert, O.; Keun, H.C.; Ebbels, T.M.D.; Bundy, J.; Holmes, E.; Lindon, J.C.; Nicholson, J.K. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2692–2703, doi:10.1038/nprot.2007.376.
12. Wishart, D.S. Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 228–237, doi:10.1016/j.trac.2007.12.001.
13. González-Fernández, L.; Sánchez-Calabuig, M.J.; Calle-Guisado, V.; García-Marín, L.J.; Bragado, M.J.; Fernández-Hernández, P.; Gutiérrez-Adán, A.; Macías-García, B. Stage-specific metabolomic changes in equine oviductal fluid: New insights into the equine fertilization environment. *Theriogenology* **2020**, *143*, 35–43, doi:10.1016/j.theriogenology.2019.11.035.
14. Gérard, N.; Loiseau, S.; Duchamp, G.; Seguin, F. Analysis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in the mare using proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR). *Reprod. Camb. Engl.* **2002**, *124*, 241–248, doi:10.1530/rep.0.1240241.
15. Gu, L.; Liu, H.; Gu, X.; Boots, C.; Moley, K.H.; Wang, Q. Metabolic control of oocyte development: Linking maternal nutrition and reproductive outcomes. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 251–271, doi:10.1007/s00018-014-1739-4.
16. Harvey, A.J. Mitochondria in early development: Linking the microenvironment, metabolism and the epigenome. *Reproduction* **2019**, *157*, R159–R179, doi:10.1530/REP-18-0431.
17. Piñero-Sagredo, E.; Nunes, S.; de los Santos, M.J.; Celda, B.; Esteve, V. NMR metabolic profile of human follicular fluid. *NMR Biomed.* **2010**, *23*, 485–495, doi:10.1002/nbm.1488.
18. Guo, X.; Wang, X.; Di, R.; Liu, Q.; Hu, W.; He, X.; Yu, J.; Zhang, X.; Zhang, J.; Broniowska, K.; et al. Metabolic Effects of FecB Gene on Follicular Fluid and Ovarian Vein Serum in Sheep (*Ovis aries*). *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 539, doi:10.3390/ijms19020539.

19. Gérard, N.; Prades, I.; Couty, M.; Labberté, M.; Daels, P.; Duchamp, G. Concentrations of glucose, pyruvate and lactate in relation to follicular growth, preovulatory maturation and oocyte nuclear maturation stage in the mare. *Theriogenology* **2000**, *53*, 372.
20. Guarino, V.A.; Oldham, W.M.; Loscalzo, J.; Zhang, Y.-Y. Reaction rate of pyruvate and hydrogen peroxide: Assessing antioxidant capacity of pyruvate under biological conditions. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 19568, doi:10.1038/s41598-019-55951-9.
21. Gérard, N.; Fahiminiya, S.; Grupen, C.G.; Nadal-Desbarats, L. Reproductive Physiology and Ovarian Folliculogenesis Examined via ¹H-NMR Metabolomics Signatures: A Comparative Study of Large and Small Follicles in Three Mammalian Species (*Bos taurus*, *Sus scrofa domesticus* and *Equus ferus caballus*). *OMICS J. Integr. Biol.* **2015**, *19*, 31–40, doi:10.1089/omi.2014.0097.
22. Tews, J.K.; Carter, S.H.; Roa, P.D.; Stone, W.E. Free amino acids and related compounds in dog brain: Post-mortem and anoxic changes, effects of ammonium chloride infusion, and levels during seizures induced by picrotoxin and by pentylenetetrazol. *J. Neurochem.* **1963**, *10*, 641–653.
23. Engle, C.C.; Foley, C.W. Certain physiochemical properties of uterine tubal fluid, follicular fluid, and blood plasma in the mare. *Am. J. Vet. Res.* **1975**, *36*, 149–154.
24. Wallace, M.; Cottell, E.; Gibney, M.J.; McAuliffe, F.M.; Wingfield, M.; Brennan, L. An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome. *Fertil. Steril.* **2012**, *97*, 1078–1084.e8, doi:10.1016/j.fertnstert.2012.01.122.
25. Ménéz, Y.; Guérin, P.; Elder, K. The oviduct: A neglected organ due for re-assessment in IVF. *Reprod. Biomed. Online* **2015**, *30*, 233–240, doi:10.1016/j.rbmo.2014.11.011.
26. Lamy, J.; Gatien, J.; Dubuisson, F.; Nadal-Desbarats, L.; Salvetti, P.; Mermillod, P.; Saint-Dizier, M. Metabolomic profiling of bovine oviductal fluid across the oestrous cycle using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Reprod. Fertil. Dev.* **2018**, *30*, 1021, doi:10.1071/RD17389.
27. Gatien, J.; Mermillod, P.; Tsikis, G.; Bernardi, O.; Janati Idrissi, S.; Uzbekov, R.; Le Bourhis, D.; Salvetti, P.; Almiñana, C.; Saint-Dizier, M. Metabolomic Profile of Oviductal Extracellular Vesicles across the Estrous Cycle in Cattle. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 6339, doi:10.3390/ijms20246339.
28. Marinaro, F.; Macías-García, B.; Sánchez-Margallo, F.M.; Blázquez, R.; Álvarez, V.; Matilla, E.; Hernández, N.; Gómez-Serrano, M.; Jorge, I.; Vázquez, J.; et al. Extracellular vesicles derived from endometrial human mesenchymal stem cells enhance embryo yield and quality in an aged murine model†. *Biol. Reprod.* **2018**, doi:10.1093/biolre/iory263.
29. Hung, W.-T.; Hong, X.; Christenson, L.K.; McGinnis, L.K. Extracellular Vesicles from Bovine Follicular Fluid Support Cumulus Expansion1. *Biol. Reprod.* **2015**, *93*, doi:10.1095/biolreprod.115.132977.
30. Montjean, D.; Entezami, F.; Lichtblau, I.; Belloc, S.; Gurgan, T.; Menez, Y. Carnitine content in the follicular fluid and expression of the enzymes involved in beta oxidation in oocytes and cumulus cells. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2012**, *29*, 1221–1225, doi:10.1007/s10815-012-9855-2.
31. Chen, M.; Zhang, B.; Cai, S.; Zeng, X.; Ye, Q.; Mao, X.; Zhang, S.; Zeng, X.; Ye, C.; Qiao, S. Metabolic disorder of amino acids, fatty acids and purines reflects the decreases in oocyte quality and potential in sows. *J. Proteom.* **2019**, *200*, 134–143, doi:10.1016/j.jprot.2019.03.015.
32. Hemmings, K.E.; Maruthini, D.; Vyjayanthi, S.; Hogg, J.E.; Balen, A.H.; Campbell, B.K.; Leese, H.J.; Picton, H.M. Amino acid turnover by human oocytes is influenced by gamete developmental competence, patient characteristics and gonadotrophin treatment. *Hum. Reprod.* **2013**, *28*, 1031–1044, doi:10.1093/humrep/des458.
33. Houghton1, F.D.; Hawkhead, J.A.; Humpherson, P.G.; Hogg, J.E.; Balen, A.H.; Rutherford, A.J.; Leese, H.J. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum. Reprod.* **2002**, *17*, 999–1005, doi:10.1093/humrep/17.4.999.
34. Steeves, C.L.; Baltz, J.M. Regulation of intracellular glycine as an organic osmolyte in early preimplantation mouse embryos. *J. Cell. Physiol.* **2005**, *204*, 273–279, doi:10.1002/jcp.20284.
35. Hugentobler, S.A.; Diskin, M.G.; Leese, H.J.; Humpherson, P.G.; Watson, T.; Sreenan, J.M.; Morris, D.G. Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine. *Mol. Reprod. Dev.* **2007**, *74*, 445–454, doi:10.1002/mrd.20607.
36. Sinclair, K.; Lunn, L.; Kwong, W.; Wonnacott, K.; Linforth, R.; Craigon, J. Amino acid and fatty acid composition of follicular fluid as predictors of in-vitro embryo development. *Reprod. Biomed. Online* **2008**, *16*, 859–868, doi:10.1016/S1472-6483(10)60153-8.

37. Uzbekova, S.; Salhab, M.; Perreau, C.; Mermillod, P.; Dupont, J. Glycogen synthase kinase 3B in bovine oocytes and granulosa cells: Possible involvement in meiosis during in vitro maturation. *Reproduction* **2009**, *138*, 235–246, doi:10.1530/REP-09-0136.
38. Otani, T.; Maruo, T.; Yukimura, N.; Mochizuki, M. Effect of insulin on porcine granulosa cells: Implications of a possible receptor mediated action. *Acta Endocrinol.* **1985**, *108*, 104–110, doi:10.1530/acta.0.1080104.
39. Schmidt, G.; Owman, Ch.; Sjoberg, N.-O. Histamine induces ovulation in the isolated perfused rat ovary. *Reproduction* **1986**, *78*, 159–166, doi:10.1530/jrf.0.0780159.
40. Kobayashi, Y.; Wright, K.H.; Santulli, R.; Kitai, H.; Wallach, E.E. Effect of Histamine and Histamine Blockers on the Ovulatory Process in the in Vitro Perfused Rabbit Ovary. *Biol. Reprod.* **1983**, *28*, 385–392, doi:10.1095/biolreprod28.2.385.
41. Watson, E.D.; Sertich, P.L. Concentrations of arachidonate metabolites, steroids and histamine in preovulatory horse follicles after administration of human chorionic gonadotrophin and the effect of intrafollicular injection of indomethacin. *J. Endocrinol.* **1991**, *129*, 131–139, doi:10.1677/joe.0.1290131.
42. González-Fernández, L.; Macedo, S.; Lopes, J.S.; Rocha, A.; Macías-García, B. Effect of Different Media and Protein Source on Equine Gametes: Potential Impact During In Vitro Fertilization. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* **2015**, *50*, 1039–1046, doi:10.1111/rda.12634.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



The Proteome of Equine Oviductal Fluid Varies Before and After Ovulation: A Comparative Study

Pablo Fernández-Hernández^{1,2†}, Federica Marinaro^{3†}, María Jesús Sánchez-Calabuig⁴, Luis Jesús García-Marín^{1,5}, María Julia Bragado^{1,6}, Lauro González-Fernández^{1,6*‡} and Beatriz Macías-García^{1,2*‡}

¹ Research Group of Intracellular Signaling and Technology of Reproduction (Research Institute INBIO G+C), University of Extremadura, Cáceres, Spain, ² Department of Animal Medicine, Faculty of Veterinary Sciences, University of Extremadura, Cáceres, Spain, ³ Stem Cell Therapy Unit, Jesús Usón Minimally Invasive Surgery Centre, Cáceres, Spain, ⁴ Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Sciences, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain, ⁵ Department of Physiology, Faculty of Veterinary Sciences, University of Extremadura, Cáceres, Spain, ⁶ Department of Biochemistry and Molecular Biology and Genetics, Faculty of Veterinary Sciences, University of Extremadura, Cáceres, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Jordi Roca,
University of Murcia, Spain

Reviewed by:

Ivan Cunha Bustamante-Filho,
Universidade do Vale do Taquari -
Univates, Brazil
Arumugam Kumaresan,
National Dairy Research Institute
(ICAR), India

*Correspondence:

Lauro González-Fernández
lgonfer@unex.es
Beatriz Macías-García
bemaciasg@unex.es

[†] These authors have contributed
equally to this work and share first
authorship

[‡] These authors share
senior authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Animal Reproduction -
Theriogenology,
a section of the journal
Frontiers in Veterinary Science

Received: 12 April 2021

Accepted: 25 June 2021

Published: 05 August 2021

Citation:

Fernández-Hernández P, Marinaro F,
Sánchez-Calabuig MJ,
García-Marín LJ, Bragado MJ,
González-Fernández L and
Macías-García B (2021) The Proteome
of Equine Oviductal Fluid Varies Before
and After Ovulation: A Comparative
Study. *Front. Vet. Sci.* 8:694247.
doi: 10.3389/fvets.2021.694247

Equine fertilization cannot be performed in the laboratory as equine spermatozoa do not cross the oocyte's zona pellucida *in vitro*. Hence, a more profound study of equine oviductal fluid (OF) composition at the pre-ovulatory and post-ovulatory stages could help in understanding what components are required to achieve fertilization in horses. Our work aimed to elucidate the proteomic composition of equine OF at both stages. To do this, OF was obtained postmortem from oviducts of slaughtered mares ipsilateral to a pre-ovulatory follicle ($n = 4$) or a recent ovulation ($n = 4$); the samples were kept at -80°C until analysis. After protein extraction and isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ) labeling, the samples were analyzed by nano-liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The analysis of the spectra resulted in the identification of a total of 1,173 proteins present in pre-ovulatory and post-ovulatory samples; among these, 691 were unique for *Equus caballus*. Proteins from post-ovulatory oviductal fluid were compared with the proteins from pre-ovulatory oviductal fluid and were categorized as upregulated (positive log fold change) or downregulated (negative log fold change). Fifteen proteins were found to be downregulated in the post-ovulatory fluid and 156 were upregulated in the post-ovulatory OF compared to the pre-ovulatory fluid; among the upregulated proteins, 87 were included in the *metabolism of proteins* pathway. The identified proteins were related to *sperm-oviduct interaction*, *fertilization*, and *metabolism*, among others. Our data reveal consistent differences in the proteome of equine OF prior to and after ovulation, helping to increase our understanding in the factors that promote fertilization and early embryo development in horses.

Keywords: horse, oviductal fluid, ovulation, mass spectrometry, proteome, domestic animal reproduction

INTRODUCTION

Assisted reproductive technologies (ARTs) are commonly used in the field of reproduction to obtain embryos in domestic species (1). Currently, *in vitro* fertilization (IVF) is the technique of choice to produce embryos *in vitro* in domestic species such as bovine (2). The first report of unequivocal successful IVF in domestic species was published in rabbits in 1954 (3, 4). In this report, the authors

used spermatozoa recovered from the female's reproductive tract after artificial insemination to perform IVF (3). Until that moment, IVF failure was associated with the lack of adequate induction of sperm capacitation, a maturational process in which the spermatozoon needs to fully acquire its fertilizing capacity (4, 5). Since then, fertilization media were designed for each species based on the composition of the reproductive fluids, which consistently vary among species (bovine, human, mice, and porcine) (6, 7). Unfortunately, despite the efforts of different research groups around the world, the *in vitro* production of equine embryos is still very inefficient, in part due to the low success rate of *in vitro* fertilization that varies from 0 to 33% (8, 9).

Recent research demonstrates that the failure of equine IVF is most likely attributable to the inability of the spermatozoa to penetrate the oocyte's zona pellucida (10) and, hence, to a suboptimal composition of the fertilization media that results in ineffective sperm capacitation (9, 11). This theory is supported by the fact that oviductal transfer of *in vitro* matured equine oocytes in an inseminated mare results in embryonic development at similar rates to those obtained from spontaneous ovulations (12). Interestingly, it has been described that equine IVF conditions support the binding of stallion spermatozoa to the zona pellucida, but they fail to induce the acrosome reaction and other capacitation-related events (8). Therefore, mimicking the conditions of the oviductal environment could be the key for successful equine IVF as it provides the ideal microenvironment for fertilization, promoting adequate sperm capacitation (8). A deeper understanding of the composition of oviductal secretions is required to better mimic the oviductal milieu and to ensure sperm capacitation *in vitro* in the horse.

Oviductal fluid (OF) is composed of ions, hormones, growth factors, metabolites, and proteins, among other compounds (6). The oviduct is lined with an epithelium coated by OE, which is composed of secretions of these cells and of blood plasma filtrate (11). Hence, the oviduct provides a dynamic microenvironment that changes according to the stage of the estrus cycle (13), ovulation site (14), oviductal region (15), and the presence of gametes or embryos (16). At present, the addition of natural reproductive fluids to commercial IVF media has been shown to improve embryo quality and yield in cows (2), highlighting the importance of studying the composition of oviductal secretions to improve current ARTs in domestic species (17).

The composition of the OF greatly varies depending on the species in study; hence, the results obtained from a single species cannot be extrapolated to others (18). In the particular case of horses, the difficult anatomical approach of the oviduct, the limited number of equine slaughterhouses, and the low amount of OF produced (11) render the addition of native oviductal fluid to the IVF media unfeasible in horses.

For these reasons, to fully develop an equine IVF protocol and to increase the embryo yield and the quality of the embryos produced *in vitro*, a more profound study of the physiology of the oviduct and the composition of its secretions is of outmost importance (8). Previous studies have reported the metabolome of equine OF (11) or the proteome of OF in mares during early embryo development (19), but more research is required to fully

unravel the key factors leading to successful fertilization *in vitro* in horses.

One of the main components of the OF are proteins, but their functions are still under study (6, 18). In horses, consistent differences in the proteomic composition of the oviductal secretions in pregnant mares compared to non-pregnant counterparts, and also in the ipsilateral and contralateral oviduct where the embryo is allocated, have been described (19). In this regard, some authors claim that unsuccessful *in vitro* fertilization is related to the lack of specific proteins in the fertilization medium that may be impeding complete sperm capacitation (6).

Thus, in the present work, we aimed to elucidate the proteomic composition of equine OF at the pre-ovulatory and post-ovulatory stages. Besides, the different protein compositions between both stages were also contrasted. Our results show that the proteome of equine OF varies prior to and post-ovulation. Interestingly, enrichment analysis of the upregulated proteins revealed that 15 proteins were found to be downregulated and 156 were upregulated in post-ovulatory OF compared to pre-ovulatory OF. Using the enrichment analysis approach, the main categories identified were directly related with metabolism. The Reactome pathway analysis showed that, in the proteins identified as upregulated in the post-ovulatory OF, 87 of them were included in the *metabolism of proteins* pathway and 56 were enclosed in the *developmental biology* pathway, revealing an intense protein turnover during early embryo development in horses.

MATERIALS AND METHODS

Collection of Oviductal Fluid

Oviducts were obtained immediately postmortem at a commercial slaughterhouse, on three separate days. At evisceration, the entire reproductive tract was extracted and carefully inspected. The ovaries were examined and those tracts with a pre-ovulatory follicle ≥ 35 mm in diameter (as confirmed after opening the follicle using a scalpel blade), associated with uterine edema on examination of the opened endometrial surface (vivid endometrial folds with a gelatinous appearance), were sampled as pre-ovulatory (pre-OV). When the ovaries had evidence of a recent ovulation, as confirmed after sectioning the ovary to examine the presence of a corpus hemorrhagicum or juvenile corpus luteum (CL) identified as a luteal structure with a large, red central clot and a luteinized wall that was still visibly crenulated, the reproductive tracts were classified as post-ovulatory (post-OV) and also harvested. The oviduct and the attached ovary containing the pre-ovulatory follicle or the CL were separated from the uterus distally to the uterotubal junction, the ovary was dissected, and the oviduct was carefully dried with a tissue and placed into a Petri dish within ~ 30 min of slaughter. A non-heparinized hematocrit capillary tube (Merck, Madrid, Spain) attached to a 5-ml syringe by a silicone tube was inserted into the ampulla of the oviduct through the infundibular opening. Gentle aspiration was performed to recover fluid, and the fluid retrieved was expressed into 500- μ l tubes. Aspiration was repeated for a total of at least three times per oviduct. The retrieved fluid was centrifuged for 2 min in

a microcentrifuge at room temperature (RT) to remove large cellular masses. The supernatant was retrieved, transferred to a clean tube, and placed in dry ice until its arrival at the laboratory (4–5 h). Once at the laboratory, the OF was centrifuged at $16,000 \times g$ at 4°C for 20 min and the supernatant transferred to a clean tube. The volume obtained was measured using a micropipette, and the samples were then kept at -80°C until analysis. A total of four pre-ovulatory OF samples and four post-ovulatory OF samples were submitted for proteomic analysis. Each sample was extracted from an individual female ($n = 8$ samples in total). Between 8 and 10 μl per sample was used for proteomic analysis.

Protein Digestion and Tagging With the iTRAQ® 8-Plex Reagent

After sample thawing, the total protein concentration of each sample was determined using the Pierce 660-nm protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). For digestion, 40 μg of protein from each replicate and condition (pre-ovulatory OF, $n = 4$; post-ovulatory OF, $n = 4$) was precipitated by the methanol/chloroform method. Protein pellets were resuspended and denatured in 20 μl of triethylammonium bicarbonate (TEAB; 7 M urea/2 M thiourea, 0.1 M, pH 7.5; SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany), reduced with 1 μl of 50 mM Tris (2-carboxyethyl)phosphine (TCEP; AB SCIEX, Foster City, CA, USA), pH 8.0, at 37°C for 60 min, and followed by 2 μl of 200 mM cysteine-blocking reagent (methyl methanethiosulfonate, MMTS; Pierce) for 10 min at RT. The samples were diluted up to 120 μl to reduce the urea/thiourea concentration with 50 mM TEAB. Digestions were initiated by adding 2 μg of sequencing grade modified trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to each sample in a ratio of 1:20 (w/w), which were then incubated at 37°C overnight on a shaker. Sample digestions were evaporated to dryness.

Each trypsin-digested sample, previously reconstituted with 80 μl of 70% ethanol/50 mM TEAB, was labeled at RT for 2 h with a half unit of iTRAQ Reagent 8-plex kit (AB SCIEX, Foster City, CA, USA). Isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ) labeling was performed according to the following schema: iTRAQ 113 reagent: pre-ovulatory OF R1; iTRAQ 114 reagent: pre-ovulatory OF R2; iTRAQ 115 reagent: pre-ovulatory OF R3; iTRAQ 116 reagent: pre-ovulatory OF R4; iTRAQ 117: post-ovulatory OF R1; iTRAQ 118 reagent: post-ovulatory OF R2; iTRAQ 119 reagent: post-ovulatory OF R3; and iTRAQ 121 reagent: post-ovulatory OF R4. After labeling, the samples were combined and the reaction stopped by evaporation in a SpeedVac. Salts were washed using a Sep-Pak C18 cartridge (Waters, Milford, MA, USA).

Liquid Chromatography and Mass Spectrometry Analysis

A 2- μg aliquot of each sample was subjected to 2D nano-liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) analysis using a nano-liquid chromatography system (Eksigent Technologies NanoLC Ultra-1D Plus, AB SCIEX, Foster City, CA, USA) coupled to a high-speed TripleTOF 5600 mass spectrometer (SCIEX, Foster City,

CA, USA) with a Nanospray III source. The injection volume was 5 μl . The analytical column used was a silica-based reversed-phase nanoACQUITY UPLC 75- $\mu\text{m} \times 15\text{-cm}$ column (Waters), with 1.7 μm particle size. The trap column was an Acclaim PepMap 100 column (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), with 5 μm particle diameter and 100 \AA pore size, switched on-line with the analytical column. The loading pump delivered a solution of 0.1% formic acid in water at 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. The nano-pump provided a flow rate of 250 nl/min and was operated under gradient elution conditions using 0.1% formic acid in water as mobile phase A and 0.1% formic acid in acetonitrile as mobile phase B. Gradient elution was performed according to the following scheme: isocratic conditions of 96% A/4% B for 5 min, a linear increase to 40% B in 205 min, then a linear increase to 90% B for an additional 15 min, isocratic conditions of 90% B for 10 min, and a return to the initial conditions in 2 min. The total gradient length was 250 min.

Data acquisition was performed with the TripleTOF 5600 system. Ionization occurred under the following conditions: ion spray voltage floating (ISVF), 2,800 V; curtain gas (CUR), 20; interface heater temperature (IHT), 150; ion source gas 1 (GS1), 20; and declustering potential (DP), 85 V. All data were acquired using the information-dependent acquisition (IDA) mode with Analyst TF 1.7 software (AB SCIEX, Foster City, CA, USA). For the IDA parameters, a 0.25-s MS survey scan in the mass range of 350–1,250 Da was followed by 30 MS/MS scans of 150 ms in the mass range of 100–1,500 Da (total cycle time, 4.5 s). Switching criteria were set to ions greater than the mass-to-charge ratio (m/z) 350 and smaller than m/z 1,250, with a charge state of 2–5 and an abundance threshold of more than 90 counts per second. Former target ions were excluded for 20 s. The IDA rolling collision energy (CE) parameters script was used for automatically controlling the CE.

Data Analysis and Statistics

The MS/MS spectra were exported to mgf format using Peak View v1.2.0.3 and searched using Mascot Server 2.5.1, OMSSA 2.1.9, X!TANDEM 2013.02.01.1, and Myrimatch 2.2.140 against a composite target/decoy database built from the *Equus caballus* reference proteome sequences at UniProt Knowledgebase (January 2020), together with commonly occurring contaminants. After recalibration of patent ion mass measurements using high-scoring X!TANDEM hits, the search engines were configured to match potential peptide candidates with mass error tolerance of 10 ppm and fragment ion tolerance of 0.02 Da, allowing for up to two missed tryptic cleavage sites and isotope error (^{13}C) of 1, considering a fixed MMTS modification of cysteine and variable oxidation of methionine, pyroglutamic acid from glutamine or glutamic acid at the peptide N-terminus, acetylation of the protein N-terminus, and modifications of lysine, tyrosine, and peptide N-terminus with iTRAQ 8-plex reagents. Score distribution models were used to compute the peptide-spectrum match p -values (20), and spectra recovered by a false discovery rate (FDR) ≤ 0.01 (peptide-level) filter were selected for quantitative analysis. Approximately 5% of the signals with the lowest quality were removed prior to further analysis. Differential regulation was

measured using linear models (21), and statistical significance was measured using q -values (FDR). All analyses were conducted using software from Proteobiotics (Madrid, Spain).

RESULTS

Proteomic analysis resulted in the identification of a total of 1,173 proteins that were present in pre-ovulatory and post-ovulatory OF. Only the characterized proteins with at least one peptide and FDR < 0.01 have been presented (**Supplementary Table 1**).

For enrichment analyses, the UniProt¹ accession numbers were associated with the gene names and Ensembl² IDs by using the databases for *E. caballus* proteins, genes, and transcripts from DAVID Bioinformatics³ (22, 23) and g:Profiler⁴ (24). Enrichment analysis of the proteins identified in the OF was performed using the Functional Annotation Tool provided by DAVID Bioinformatics. Gene Ontology (GO) (molecular function, cellular component, and biological process), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), and UniProt keywords were used as the annotation databases. Among the initial 1,173 proteins, the DAVID software recognized 691 unique proteins from the *E. caballus* species (**Supplementary Table 2A**). Enrichment analysis of these 691 proteins revealed that 54.3% (375 among the initial 691) were associated with the *extracellular exosome* category (GO:0070062) and 111 with the *cytoplasm* category (GO:0005737). Reactome⁵ pathway analysis of the identified proteins belonging to these two GO categories was performed by exploring the corresponding gene names in the *Homo sapiens* database (**Supplementary Tables 2B,C**). Additionally, Voronoi pathway visualizations (Reacfoam) (**Figure 1**) showed that proteins belonging to the categories *extracellular exosome* (GO:0070062) and *cytoplasm* (GO:0005737) were almost equally involved to pathways related to metabolism, immune system, cell cycle, and developmental biology, among others. On the other hand, proteins from the category *extracellular exosome* showed a unique involvement in the processes of hemostasis and organelle biogenesis and maintenance, while proteins from the category *cytoplasm* were involved in signal transduction processes. Moreover, proteins from *extracellular exosome* were associated with disease-related pathways. To represent protein changes in pre- and post-ovulatory equine OF, the iTRAQ results (1,173 characterized proteins) were analyzed to obtain log₂ fold changes. Proteins from post-ovulatory OF were compared with the proteins from pre-ovulatory OF and were categorized as upregulated (positive log fold change) or downregulated (negative log fold change) (**Figure 2**). Only differentially expressed upregulated or downregulated proteins categorized as “likely” or “confident” (FDR < 0.05 and FDR < 0.01, respectively) and with $p < 0.05$ were taken into consideration and are listed in **Figure 1**, **Supplementary Table 3**. Among

the identified proteins, 15 were found to be downregulated in post-ovulatory OF compared to the pre-ovulatory counterpart and 156 were upregulated in post-ovulatory OF compared to pre-ovulatory OF.

Enrichment analysis of the upregulated and downregulated proteins was performed on the corresponding Ensembl IDs using the g:GOST Functional profiling tool⁶ of g:Profiler. Ensembl IDs were examined as ordered query in the *E. caballus* database, taking into consideration only annotated genes. GO molecular function, cellular component, and biological process and KEGG were used as the annotation databases (**Supplementary Tables 4A, 5A**). Furthermore, pathway analyses of the downregulated and upregulated proteins in equine post-ovulatory vs. pre-ovulatory OFs were performed exploring the corresponding gene names in the *H. sapiens* database (**Supplementary Tables 4B, 5B**). Representative pictures of the enriched GO and KEGG categories in downregulated and upregulated proteins were obtained uploading gene symbols in the *E. caballus* database of the bioinformatics tool Omicsbean⁷ (**Figure 3**).

Interestingly, when the enrichment analysis was performed for the 15 downregulated proteins (**Supplementary Table 4A**), seven of them (47% of the proteins) were included in the category *metabolic pathways* (KEGG:01100). The downregulated proteins under this category were aminoacylase 1 (ACY1), glutathione S-transferase Mu 1 and 3 (GSTM1 and GSTM3, respectively), glutamine–fructose-6-phosphate aminotransferase 1 (GFPT1), NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 1 (NME2), lactate dehydrogenase B (LDHB), and phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH).

On the other hand, when the 154 upregulated proteins were investigated using an enrichment analysis approach, the main categories identified were directly related to metabolism (**Supplementary Table 5A**). In the *metabolic process* category (GO:0008152), 116 proteins (75% of the initial 167 upregulated transcripts) were enclosed, *organic substance metabolic process* (GO:0071704) involved 110 proteins (71%), and *cellular metabolic process* (GO:0071704) included 109 proteins (71%), while in *nitrogen compound metabolic process* (GO:0006807) and *primary metabolic process* (GO:0044238), 107, and 105 proteins were included, respectively. Of note is that 35% of the proteins were involved in *peptide metabolic process* (GO:0006518), suggesting an active protein synthesis and remodeling in the post-ovulatory phase. Moreover, 124 (81%) post-ovulatory upregulated proteins were localized in the *cytoplasm* (GO:0005737), in particular in the *cytosolic ribosome* (GO:0005840; 31%). Interestingly, eight upregulated proteins in post-ovulatory OF were grouped into the categories *single fertilization* (GO:0007338), *sperm–egg recognition* (GO:0035036), and *binding of sperm to zona pellucida* (GO:0007339). The proteins involved in these categories were the T-complex 1 (TCP1) and its chaperonin-containing TCP1 subunits 2, 3, 5, 7, and 8 (CCT2, CCT3, CCT5, CCT7, and CCT8, respectively), together with sperm autoantigenic protein 17 (SPA17). Moreover,

¹<https://www.uniprot.org/>

²<https://www.ensembl.org/index.html>

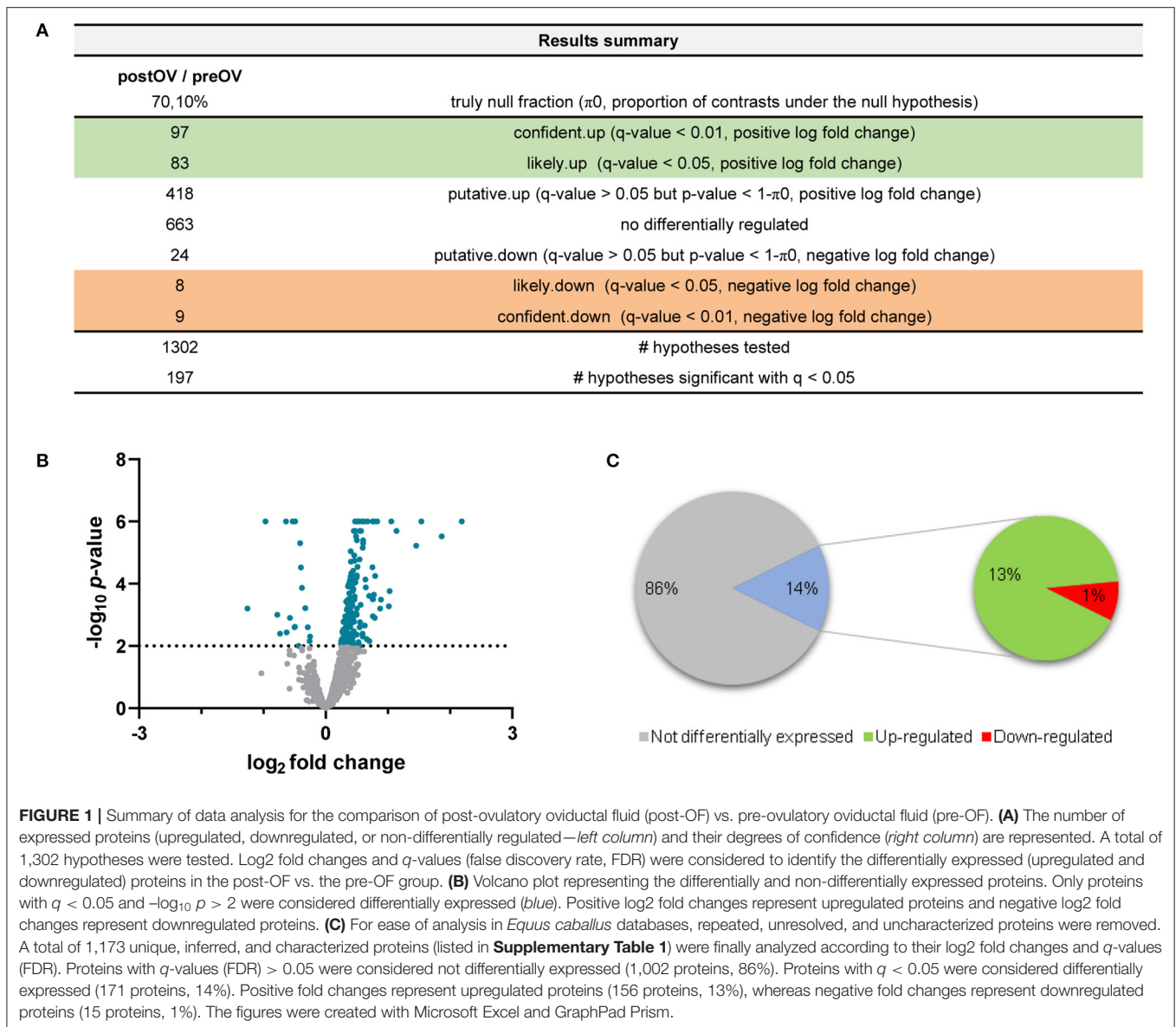
³<https://david.ncifcrf.gov/>

⁴<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/convert>

⁵<https://reactome.org/>

⁶<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>

⁷<https://www.omicsbean.cn/>



five out of these eight proteins were under the category *zona pellucida receptor complex* (GO:0002199). STRING⁸ was used to investigate the protein–protein interaction networks. Protein names were searched in the *H. sapiens* database as multiple protein query. STRING revealed that all these proteins, except SPA17, were also specifically associated with the highest edge confidence (**Figure 4**), so it may be assumed that they contribute to a shared function. In addition, the Reactome pathway analysis of the upregulated proteins showed their involvement in the categories *metabolism of proteins* (R-HSA-392499), *cellular responses to stress* (R-HSA-2262752), and *developmental biology* (R-HSA-1266738), among others (**Supplementary Table 5B**). An enrichment analysis of the upregulated proteins belonging to these categories was performed with GO, confirming their

involvement not only as *structural constituent of ribosome* (GO:0003735) and in *peptide metabolic process* (GO:0006518) (**Supplementary Table 5C**) but also in *reactive oxygen species metabolic process* (GO:0072593) (**Supplementary Table 5D**).

It is worth mentioning that among the upregulated proteins, there were albumin (ALB), the secretoglobin SCGB1A1, versican (VCAN), myosin heavy chain 9 (MYH9), and gelsolin (GSN).

DISCUSSION

The present work explores the proteome of equine OF in the peri-ovulatory period. Our data reveal that consistent differences exist in the composition of equine OF obtained from oviducts ipsilateral to a pre-ovulatory follicle and the one obtained after ovulation, coinciding with previous results in bovine (25). Interestingly, the enrichment analysis revealed that,

⁸<https://string-db.org/>

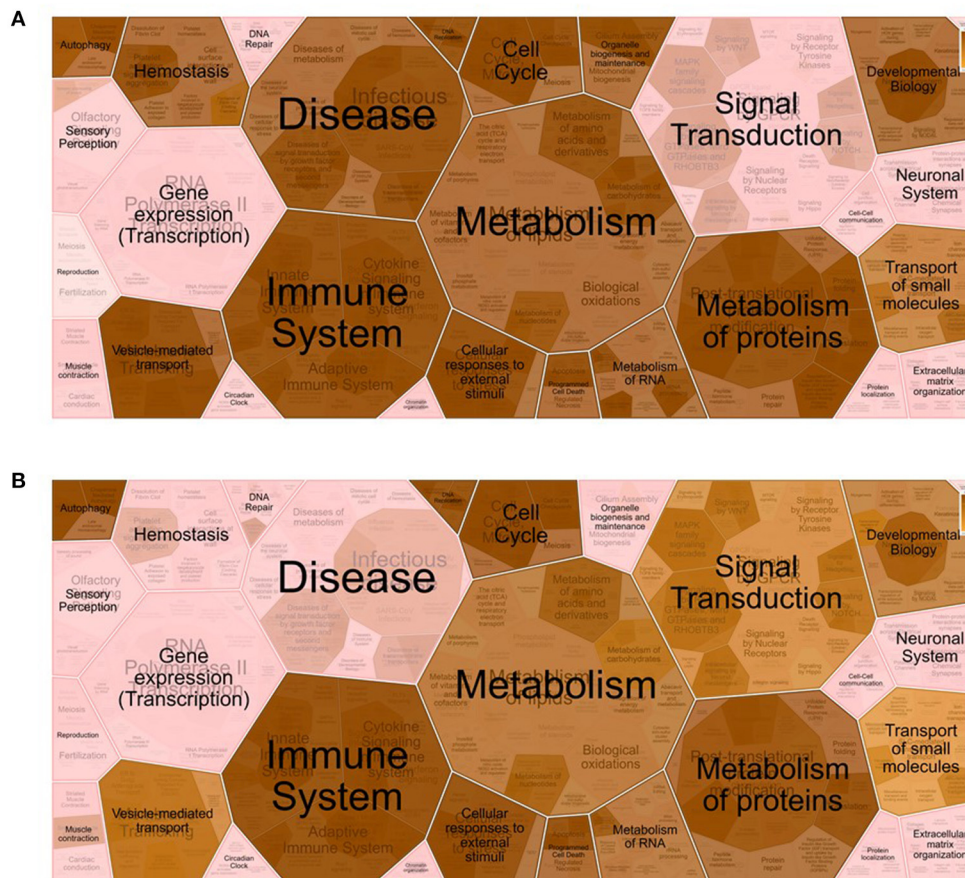


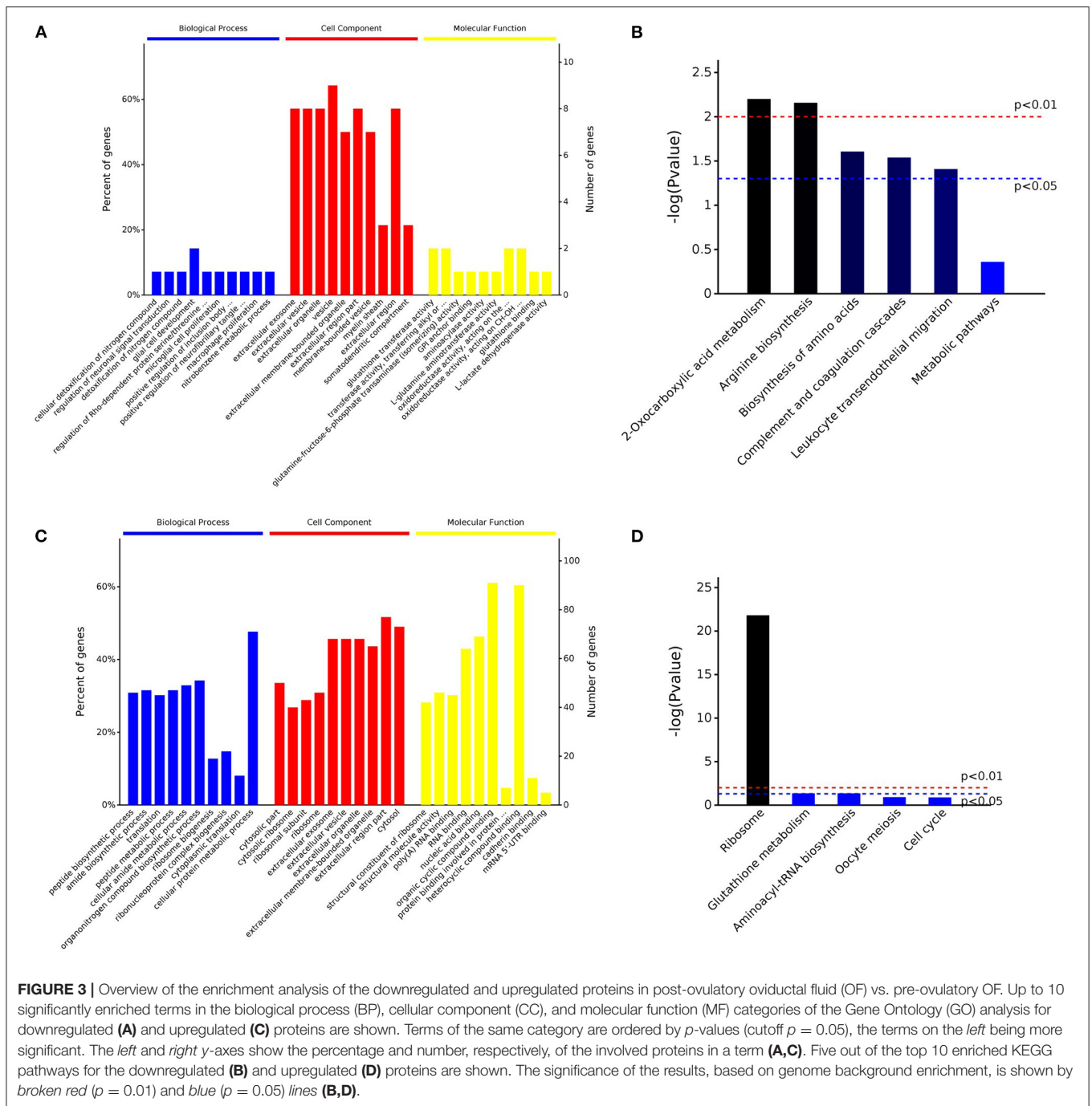
FIGURE 2 | Voronoi pathway visualization (Reacoam) for the identified proteins from equine oviductal fluid belonging to the Gene Ontology (GO) categories *extracellular exosome* (GO:0070062) **(A)** and *cytoplasm* (GO:0005737) **(B)**. A Reactome overrepresentation pathway analysis of the identified proteins listed in the above-mentioned GO categories (see **Supplementary Table 2**) was performed with the analysis tool of Reactome (<https://reactome.org/>) by exploring the corresponding gene names in the *Homo sapiens* database. The *p*-values are shown with the gradient from pink ($p > 0.05$) through light brown ($0.05 < p < 0$) to dark brown ($p \approx 0$).

among the 691 unique proteins recognized for *E. caballus*, 375 (54.3%) were associated with the *extracellular exosome* category (GO:0070062). Hence, the majority of the identified proteins in equine OF may be involved in cell-to-cell communication as the identified protein cargo may be delivered from the oviductal milieu to the gametes/embryos in membrane-enclosed microparticles, as also demonstrated in other species (18, 26). The second category obtained in the enrichment analysis was *cytoplasm* (GO:0005737; 200 identified proteins), which corresponds with 28.9% of all the identified proteins, as also described in other species in which 13–27% of all the identified proteins were shown to have a cytoplasmic origin (18). The cytoplasmic origin of the proteins could be related to epithelial cell breakdown during OF extraction, or, most likely, they could be derived from apocrine or non-canonical secretory pathways (27, 28). Interestingly, these cytoplasmic proteins have also been described to have an exosomal origin (28). In our samples, the enrichment analysis revealed that 111 proteins identified as having a cytoplasmic origin (55.5%)

were also enclosed in the *extracellular exosome* category (data not shown). Hence, it is likely that this cytoplasmic protein cargo is delivered by extracellular vesicles to the gametes and embryos.

The Reactome pathway analysis showed that, in the proteins identified as upregulated in post-ovulatory OF, 87 of them were included in the *metabolism of proteins* pathway and 56 were enclosed in the *developmental biology* pathway, revealing an intense protein turnover during early embryo development in horses, as demonstrated in other species (29). Interestingly, regarding the 15 downregulated proteins found in post-ovulatory OF, eight of them exhibited an FDR < 0.01 and were classified as confident downregulated, namely, FABP3, CLU, ACY1, GFPT1, LDHB, GSTM3, NME2, and TAGLN2 (**Supplementary Table 3**).

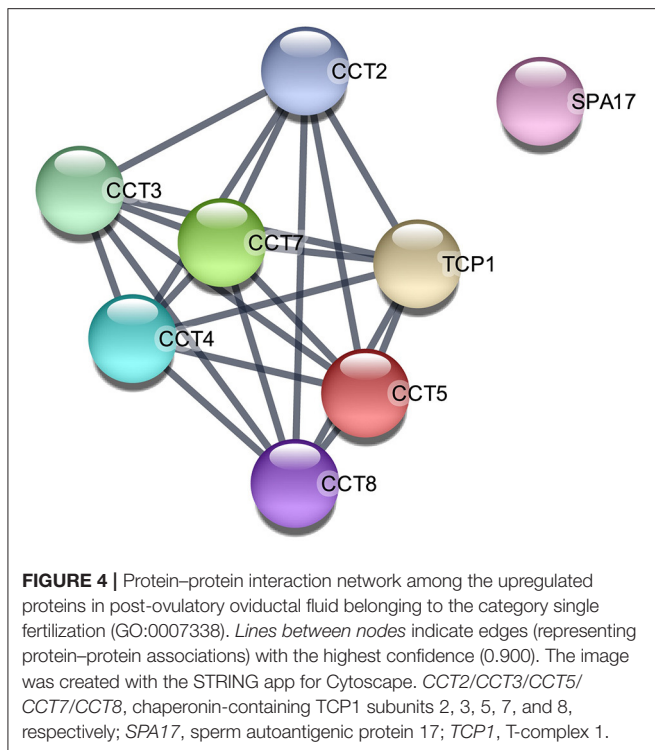
The fatty acid-binding protein 3 FABP is part of a protein family known as fatty acid-binding proteins, in which nine isoforms are enclosed. These proteins bind to long-chain fatty acids (C16–C20) and transport them to intracellular compartments (into the peroxisome, mitochondria, or the



endoplasmic reticulum) or to the extracellular milieu, free, or enclosed in extracellular vesicles (30).

Isoform 3 of FABP is called FABP3 or heart FABP and has been demonstrated to be involved in aberrant lipid accumulation in bovine oocytes subjected to *in vitro* maturation (31). Interestingly, Smits et al. (32) showed that equine embryos produced *in vitro* showed lower messenger RNA (mRNA) expression of *FABP3* compared to *in vivo*-derived embryos, indicating that lipids could be a potential energy source

for the embryo during the pre-implantation window. The lower expression of *FABP3* in post-ovulatory OF compared to pre-ovulatory OF may also be linked to the fact that *FABP3* overexpression induces apoptosis, as demonstrated in heart and embryonic cancer cells, and thus, its expression needs to be finely regulated when the embryo enters the oviduct (33). In porcine oviductal cells cultured *in vitro*, the changing mRNA expression of *FABP3* over the culture time has also been described, highlighting that the oviduct has the



ability to modulate fatty acid metabolism. This modulation by oviductal cells could avoid possible lipotoxic effects favoring early embryo quality and survival (34), which can also explain our findings.

Regarding GFPT1, this enzyme controls the flux of glucose into the hexosamine pathway, being determinant for the production of hyaluronic acid. GFPT1 is significantly overexpressed in *in vivo* matured equine cumulus cells compared to the *in vitro* matured counterparts, explaining in part the vivid cumulus expansion observed in equine oocytes produced *in vivo* (35). In the porcine oviduct, it has been demonstrated that hyaluronic acid modulates sperm capacitation and enhances sperm survival, delaying the capacitation process (36). Hence, the lower expression of GFPT1 in equine post-ovulatory OF could be related to a physiological change in the oviductal milieu in which capacitation needs to be induced to achieve oocyte fertilization. In this sense, lactate dehydrogenase B (LADHB) is involved in lactate synthesis from pyruvate, and it is known that lactate is a core metabolite found in equine OF (11). Lactate is required to maximize mitochondrial activity and motility in equine spermatozoa incubated under capacitating conditions (37) and is also required during *in vitro* oocyte maturation (38, 39). Hence, the downregulation of LADHB in post-ovulatory OF compared to pre-ovulatory OF could also be related to the specific lactate needs of equine gametes during capacitation and fertilization. Similarly, clusterin (CLU) may also be playing a role modulating sperm capacitation in the oviduct. CLU is a chaperone found in the extracellular space and in various body fluids secretions, including equine OF (19, 40). In rabbits, CLU expression increases in the mixture of spermatozoa

and OF retrieved from the oviduct 4 h post-insemination during the pre-ovulatory period (41). CLU has also been demonstrated to undergo re-localization in mice during capacitation (42) and could be supporting the final maturation process of spermatozoa in the equine oviduct, as previously demonstrated in rabbits (40).

Another protein present in the OF is GSTM3, an antioxidant enzyme involved in cell protection against oxidative stress that has been found in the uterine fluid of pregnant and non-pregnant mares (43). This protein has been detected in goat sperm surface and plays a crucial role as a zona pellucida-binding protein (44); hence, as our data and previous reports in sheep (45) show a GSTM3 downregulation in post-ovulatory OF compared to pre-ovulatory OF, this protein could be playing a crucial role in gamete interaction promoting fertilization.

The protein TAGLN2 belongs to the transgelin (TAGLN) family, which comprised three isoforms and have been identified as actin-binding proteins, which are known to stabilize the actin cytoskeleton (46). TAGLN2 is known to affect actin cross-linking blocking F-actin depolymerization and has been described to play a core role in embryo implantation in mice (46). However, equine embryos undergo fixation around day 21 post-ovulation, so the downregulation of TAGLN2 expression in post-ovulatory OF could be instead modulating actin depolymerization during sperm capacitation, promoting acrosome reaction, as previously reported in other species (47), or may be playing another role that needs to be further explored.

Nucleoside diphosphate kinase B (NME2) plays a major role in the synthesis of nucleoside triphosphates other than adenosine triphosphate. It has also been identified as a potential canonical transcription factor that regulates gene transcription through its DNA-binding activity (48) and has been described to be overexpressed in bovine OF ipsilateral to the pre-ovulatory follicle (25) in the form of extracellular vesicle cargo (49). However, the role that nucleoside diphosphate kinase B may play in equine fertilization remains to be studied. This is the same scenario for ACY1, a soluble homodimeric zinc-binding enzyme that is involved in the hydrolysis of *N*-acetylated proteins. The *N*-acylation of a protein usually leads to the extension of its half-life, and interestingly, 50–80% of all cellular proteins show formylated or acetylated *N*-termini. After the degradation of proteins, free amino acids can be recycled by the enzymatic hydrolysis of *N*-acylated amino acids catalyzed by aminoacylases, such as ACY1 that has a wide substrate specificity (50). Amino acid metabolism is crucial for embryo development, and a different amino acid turnover has been demonstrated to happen in the culture medium of human embryos resulting in clinical pregnancy and those that underwent reabsorption (51). Once more, the exact role that this protein may play in equine OF remains to be further studied.

In our setting, the most significantly upregulated protein was secretoglobin (SCGB1A1), coinciding with previous studies in horses in which this uteroglobin was significantly upregulated in the ipsilateral oviduct of pregnant mares (19). A similar secretoglobin (SCGB1D2) was already found to be upregulated in the human oviduct in the early luteal phase, and both secretoglobins have been associated with anti-inflammatory/immunomodulatory, anti-chemotactic, and

embryonic growth-stimulatory activities, as also proposed in horses (19, 52). The upregulated VCAN was demonstrated to promote cell motility and migration (53, 54), suggesting that the post-ovulatory oviductal microenvironment is involved in the migration process of the zygote toward the uterus. ALB upregulation in post-ovulatory OF has already been described in equine (19), while GSN was found in bovine oviductal exosomes playing a core role in sperm–oviduct interaction and early embryo development (49). Moreover, the upregulation of MYH9 in post-ovulatory OF is in agreement with a previous study on bovine post-ovulatory OF in which this protein was demonstrated to be a specific sperm-interacting protein (55). Regarding the upregulated proteins in the category *single fertilization* (GO:0007338), it has already been reported that the molecules involved in the process of sperm–egg recognition and binding are not only expressed in the spermatozoa or oocytes but can also be dispersed in OF (56). According to the STRING analysis, TCP1 and its subunits CCT2, CCT3, CCT5, CCT7, and CCT8 interact in common pathways (Figure 4). This result is in accordance with previous studies that hypothesized that chaperone proteins are necessary to deliver and assemble multiprotein complexes on the surface of gametes before sperm–egg interaction (57).

Our data reveal interesting differences in the proteome of equine OF prior to and post-ovulation. These findings may help to continue unraveling which factors promote fertilization and early embryo development, aiming to improve *in vitro* fertilization outcome in horses. More studies are required to achieve the proposed goal, and further studies will be carried out to keep improving our understanding regarding the physiology of oocyte fertilization in horses.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found at: <http://www.proteomexchange.org/>, PXD025320.

ETHICS STATEMENT

Ethical review and approval was not required for the animal study because samples were retrieved from a slaughterhouse.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PF-H contributed to the investigation, methodology, writing the original draft, manuscript review, and editing. FM helped

with the data curation, formal analysis, methodology, writing the original draft, and in manuscript review and editing. MS-C contributed to the investigation and in manuscript review and editing. LJG-M and MJB helped with manuscript review and editing and in funding acquisition. LG-F did the formal analysis, investigation, methodology, writing the original draft, and in manuscript review and editing. BM-G contributed to the conceptualization, data curation, formal analysis, funding acquisition, investigation, methodology, project administration, supervision, writing the original draft, and in manuscript review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was supported by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (AEI/FEDER/UE), references: AGL2017-84681-R and RYC-2017-21545 (the last awarded to BM-G). LG-F was supported by a grant Atracción y retorno de talento investigador a “Centros de I+D+i pertenecientes al Sistema Extremeño de Ciencia, Tecnología e Innovación from Junta de Extremadura” (Spain; reference: TA18008). PF-H was supported by a grant Acción II, Plan propio “Plan de Iniciación a la Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación” from the University of Extremadura (reference: Beca RC4).

ACKNOWLEDGMENTS

The help of the veterinary team at the slaughterhouse (Carmen, Gerardo, and Jesús) is warmly appreciated (Incarsa, Burgos). Proteomic analysis was performed by Dr. Alberto Paradela Elizade and his research group at the CNB-CSIC (Madrid, Spain), and the proteome statistical analysis was performed by Antonio Ramos Fernández (Proteobiotics, Madrid, Spain). The help of both researchers is kindly acknowledged. Analysis of the proteomics data was possible thanks to the kind suggestions of María de los Ángeles de Pedro Muñoz. The authors wish to acknowledge the suggestions provided by Dr. Shavahn Loux. This work is dedicated to Martín González Macías and to the memory of Juan Antonio García Iglesias.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.694247/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Galli C, Lazzari G. The manipulation of gametes and embryos in farm animals. *Reprod Domest Anim Zuchthyg.* (2008) 43(Suppl. 2):1–7. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01136.x
- Lopera-Vasquez R, Hamdi M, Maillou V, Lloreda V, Coy P, Gutierrez-Adan A, et al. Effect of bovine oviductal fluid on development and quality of bovine embryos produced *in vitro*. *Reprod Fertil Dev.* (2017) 29:621–9. doi: 10.1071/RD15238
- Thibault C, Dauzier L, Wintenberger S. Cytological study of fecundation *in vitro* of rabbit ovum. *C R Seances Soc Biol Fil.* (1954) 148:789–90.
- Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature.* (1951) 168:697–8. doi: 10.1038/168697b0
- Austin C. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Biol Sci.* (1951) 4:581. doi: 10.1071/BI9510581
- Coy P, Yanagimachi R. The common and species-specific roles of oviductal proteins in mammalian fertilization and embryo development. *BioScience.* (2015) 65:973–84. doi: 10.1093/biosci/biv119

7. Gardner DK, Leese HJ. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. *Reproduction*. (1990) 88:361–8. doi: 10.1530/jrf.0.0880361
8. Leemans B, Gadella BM, Stout TAE, De Schauwer C, Nelis H, Hoogewijs M, et al. Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization. *Reproduction*. (2016) 152:R233–45. doi: 10.1530/REP-16-0420
9. Leemans B, Stout TAE, De Schauwer C, Heras S, Nelis H, Hoogewijs M, et al. Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species? *Reproduction*. (2019) 157:R181–97. doi: 10.1530/REP-18-0541
10. Choi YH, Okada Y, Hochi S, Braun J, Sato K, Oguri N. In vitro fertilization rate of horse oocytes with partially removed zona. *Theriogenology*. (1994) 42:795–802. doi: 10.1016/0093-691X(94)90448-R
11. González-Fernández L, Sánchez-Calabuig MJ, Calle-Guisado V, García-Marín LJ, Bragado MJ, Fernández-Hernández P, et al. Stage-specific metabolomic changes in equine oviductal fluid: new insights into the equine fertilization environment. *Theriogenology*. (2020) 143:35–43. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.11.035
12. Hinrichs K, Love CC, Brinsko SP, Choi YH, Varner DD. In vitro fertilization of *in vitro*-matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization *in vivo* after oviductal Transfer1. *Biol Reprod*. (2002) 67:256–62. doi: 10.1095/biolreprod67.1.256
13. Lamy J, Gatien J, Dubuisson F, Nadal-Desbarats L, Salvetti P, Mermillod P, et al. Metabolomic profiling of bovine oviductal fluid across the oestrous cycle using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Reprod Fertil Dev*. (2018) 30:1021. doi: 10.1071/RD17389
14. Bauersachs S, Blum H, Mallok S, Wenigerkind H, Rief S, Prella K, et al. Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the postovulation period: a transcriptomics approach1. *Biol Reprod*. (2003) 68:1170–7. doi: 10.1095/biolreprod.102.010660
15. Maillou V, de Frutos C, O'Gaora P, Forde N, Burns GW, Spencer TE, et al. Spatial differences in gene expression in the bovine oviduct. *Reproduction*. (2016) 152:37–46. doi: 10.1530/REP-16-0074
16. Hunter RHF. Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc*. (2012) 87:244–55. doi: 10.1111/j.1469-185X.2011.00196.x
17. Avilés M, Gutiérrez-Adán A, Coy P. Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *MHR Basic Sci Reprod Med*. (2010) 16:896–906. doi: 10.1093/molehr/gaq056
18. Saint-Dizier M, Schoen J, Chen S, Banliat C, Mermillod P. Composing the early embryonic microenvironment: physiology and regulation of oviductal secretions. *Int J Mol Sci*. (2019) 21:223. doi: 10.3390/ijms21010223
19. Smits K, Nelis H, Van Steendam K, Govaere J, Roels K, Ververs C, et al. Proteome of equine oviductal fluid: effects of ovulation and pregnancy. *Reprod Fertil Dev*. (2017) 29:1085. doi: 10.1071/RD15481
20. Ramos-Fernández A, Paradelo A, Navajas R, Albar JP. Generalized method for probability-based peptide and protein identification from tandem mass spectrometry data and sequence database searching. *Mol Cell Proteomics*. (2008) 7:1748–54. doi: 10.1074/mcp.M800122-MCP200
21. Lopez-Serra P, Marcilla M, Villanueva A, Ramos-Fernandez A, Palau A, Leal L, et al. A DERL3-associated defect in the degradation of SLC2A1 mediates the Warburg effect. *Nat Commun*. (2014) 5:3608. doi: 10.1038/ncomms4608
22. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. (2009) 4:44–57. doi: 10.1038/nprot.2008.211
23. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*. (2009) 37:1–3. doi: 10.1093/nar/gkn923
24. Reimand J, Kull M, Peterson H, Hansen J, Vilo J. g:Profiler—a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic Acids Res*. (2007) 35:W193–200. doi: 10.1093/nar/gkm226
25. Lamy J, Labas V, Harichaux G, Tsikis G, Mermillod P, Saint-Dizier M. Regulation of the bovine oviductal fluid proteome. *Reproduction*. (2016) 152:629–44. doi: 10.1530/REP-16-0397
26. Capra E, Lange-Consiglio A. The biological function of extracellular vesicles during fertilization, early embryo—maternal crosstalk and their involvement in reproduction: review and overview. *Biomolecules*. (2020) 10:1510. doi: 10.3390/biom10111510
27. Binelli M, Gonella-Diaza A, Mesquita F, Membrive C. Sex steroid-mediated control of oviductal function in cattle. *Biology*. (2018) 7:15. doi: 10.3390/biology7010015
28. Saint-Dizier M, Marnier C, Tahir MZ, Grimard B, Thoumire S, Chastant-Maillard S, et al. *OVGP1* is expressed in the canine oviduct at the time and place of oocyte maturation and fertilization: expression of oviductin in the canine oviduct. *Mol Reprod Dev*. (2014) 81:972–82. doi: 10.1002/mrd.22417
29. Van Winkle LJ. Amino acid transport regulation and early embryo development. *Biol Reprod*. (2001) 64:1–12. doi: 10.1095/biolreprod64.1.1
30. Hotamisligil GS, Bernlohr DA. Metabolic functions of FABPs—mechanisms and therapeutic implications. *Nat Rev Endocrinol*. (2015) 11:592–605. doi: 10.1038/nrendo.2015.122
31. del Collado M, da Silveira JC, Sangalli JR, Andrade GM, Sousa LR da S, Silva LA, et al. Fatty acid binding protein 3 and transzonal projections are involved in lipid accumulation during *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Sci Rep*. (2017) 7:2645. doi: 10.1038/s41598-017-02467-9
32. Smits K, Goossens K, Van Soom A, Govaere J, Hoogewijs M, Peelman LJ. *In vivo*-derived horse blastocysts show transcriptional upregulation of developmentally important genes compared with *in vitro*-produced horse blastocysts. *Reprod Fertil Dev*. (2011) 23:364. doi: 10.1071/RD10124
33. Song GX, Shen YH, Liu YQ, Sun W, Miao LP, Zhou LJ, et al. Overexpression of *FABP3* promotes apoptosis through inducing mitochondrial impairment in embryonic cancer cells. *J Cell Biochem*. (2012) 113:3701–8. doi: 10.1002/jcb.24243
34. Budna J, Celichowski P, Knap S, Jankowski M, Magas M, Nawrocki MJ, et al. Fatty acids related genes expression undergo substantial changes in porcine oviductal epithelial cells during long-term primary culture. *Med J Cell Biol*. (2018) 6:39–47. doi: 10.2478/acb-2018-0008
35. Walter J, Huwiler F, Fortes C, Grossmann J, Roschitzki B, Hu J, et al. Analysis of the equine “cumulome” reveals major metabolic aberrations after maturation *in vitro*. *BMC Genomics*. (2019) 20:588. doi: 10.1186/s12864-019-5836-5
36. Rodriguez-Martinez H, Tienthai P, Atikuzzaman M, Vicente-Carrillo A, Rubér M, Alvarez-Rodriguez M. The ubiquitous hyaluronan: functionally implicated in the oviduct? *Theriogenology*. (2016) 86:182–6. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.11.025
37. Darr CR, Varner DD, Teague S, Cortopassi GA, Datta S, Meyers SA. Lactate and pyruvate are major sources of energy for stallion sperm with dose effects on mitochondrial function, motility, and ROS Production1. *Biol Reprod*. (2016) 95:1–11. doi: 10.1095/biolreprod.116.140707
38. González-Fernández L, Sánchez-Calabuig MJ, Alves MG, Oliveira PF, Macedo S, Gutiérrez-Adán A, et al. Expanded equine cumulus-oocyte complexes exhibit higher meiotic competence and lower glucose consumption than compact cumulus-oocyte complexes. *Reprod Fertil Dev*. (2018) 30:297–306. doi: 10.1071/RD16441
39. Lewis N, Hinrichs K, Leese HJ, Argo McG C, Brison DR, Sturmey R. Energy metabolism of the equine cumulus oocyte complex during *in vitro* maturation. *Sci Rep*. (2020) 10:3493. doi: 10.1038/s41598-020-60624-z
40. Steinberger B, Yu H, Brodmann T, Milovanovic D, Reichart U, Besenfelder U, et al. Semen modulated secretory activity of oviductal epithelial cells is linked to cellular proteostasis network remodeling: proteomic insights into the early phase of interaction in the oviduct *in vivo*. *J Proteomics*. (2017) 163:14–27. doi: 10.1016/j.jprot.2017.05.006
41. Yu H, Hackenbroch L, Meyer FRL, Reiser J, Razzazi-Fazeli E, Nöbauer K, et al. Identification of rabbit oviductal fluid proteins involved in pre-fertilization processes by quantitative proteomics. *Proteomics*. (2019) 19:1800319. doi: 10.1002/pmic.201800319
42. Saewu A, Kadunganattil S, Raghupathy R, Kongmanas K, Diaz-Astudillo P, Hermo L, et al. Clusterin in the mouse epididymis: possible roles in sperm maturation and capacitation. *Reproduction*. (2017) 154:867–80. doi: 10.1530/REP-17-0518
43. Smits K, Willems S, Van Steendam K, Van De Velde M, De Lange V, Ververs C, et al. Proteins involved in embryo-maternal interaction around the signalling of maternal recognition of pregnancy in the horse. *Sci Rep*. (2018) 8:5249. doi: 10.1038/s41598-018-23537-6

44. Hemachand T, Gopalakrishnan B, Salunke DM, Totey SM, Shaha C. Sperm plasma-membrane-associated glutathione S-transferases as gamete recognition molecules. *J Cell Sci.* (2002) 115:2053. doi: 10.1242/jcs.115.10.2053
45. Soleilhavoup C, Riou C, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, Kohnke P, et al. Proteomes of the female genital tract during the oestrous cycle*. *Mol Cell Proteomics.* (2016) 15:93–108. doi: 10.1074/mcp.M115.052332
46. Liang X, Jin Y, Wang H, Meng X, Tan Z, Huang T, et al. Transgelin 2 is required for embryo implantation by promoting actin polymerization. *FASEB J.* (2019) 33:5667–75. doi: 10.1096/fj.201802158RRR
47. Breitbart H, Cohen G, Rubinstein S. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction.* (2005) 129:263–8. doi: 10.1530/rep.1.00269
48. Puts GS, Leonard MK, Pamidimukkala NV, Snyder DE, Kaetzel DM. Nuclear functions of NME proteins. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* (2018) 98:211–8. doi: 10.1038/labinvest.2017.109
49. Almiñana C, Tsikis G, Labas V, Uzbekov R, da Silveira JC, Bauersachs S, et al. Deciphering the oviductal extracellular vesicles content across the estrous cycle: implications for the gametes-oviduct interactions and the environment of the potential embryo. *BMC Genomics.* (2018) 19:622. doi: 10.1186/s12864-018-4982-5
50. Sommer A, Christensen E, Schwenger S, Seul R, Haas D, Olbrich H, et al. The molecular basis of aminoacylase 1 deficiency. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* (2011) 1812:685–90. doi: 10.1016/j.bbdis.2011.03.005
51. Gardner DK, Wale PL. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertil Steril.* (2013) 99:1062–72. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.12.004
52. Hess AP, Talbi S, Hamilton AE, Baston-Buest DM, Nyegaard M, Irwin JC, et al. The human oviduct transcriptome reveals an anti-inflammatory, anti-angiogenic, secretory and matrix-stable environment during embryo transit. *Reprod Biomed Online.* (2013) 27:423–35. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.06.013
53. Onken J, Moeckel S, Leukel P, Leidgens V, Baumann F, Bogdahn U, et al. Versican isoform V1 regulates proliferation and migration in high-grade gliomas. *J Neurooncol.* (2014) 120:73–83. doi: 10.1007/s11060-014-1545-8
54. Ricciardelli C, Russell DL, Ween MP, Mayne K, Suwihat S, Byers S, et al. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix by prostate cancer cells promotes cell motility. *J Biol Chem.* (2007) 282:10814–25. doi: 10.1074/jbc.M606991200
55. Lamy J, Nogues P, Combes-Soia L, Tsikis G, Labas V, Mermillod P, et al. Identification by proteomics of oviductal sperm-interacting proteins. *Reproduction.* (2018) 155:457–66. doi: 10.1530/REP-17-0712
56. Bernabò N, Ordinelli A, Di Agostino R, Mattioli M, Barboni B. Network analyses of sperm-egg recognition and binding: ready to rethink fertility mechanisms? *Omics J Integr Biol.* (2014) 18:740–53. doi: 10.1089/omi.2014.0128
57. Bromfield EG, Nixon B. The function of chaperone proteins in the assemblage of protein complexes involved in gamete adhesion and fusion processes. *Reprod Camb Engl.* (2013) 145:R31–42. doi: 10.1530/REP-12-0316

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Fernández-Hernández, Marinero, Sánchez-Calabuig, García-Marín, Bragado, González-Fernández and Macías-García. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Selected Metabolites Found in Equine Oviductal Fluid do not Modify the Parameters Associated to Capacitation of the Frozen-thawed Equine Spermatozoa *In Vitro*

Pablo Fernández-Hernández^{a,b}, Luis Jesús García-Marín^{a,c}, María Julia Bragado^{a,d}, Andrés Domingo^e, Lauro González-Fernández^{a,d,#}, Beatriz Macías-García, DVM, PhD^{a,b,#,*}

^a Grupo de Investigación Señalización Intracelular y Tecnología de la Reproducción (SINTREP), Instituto de Investigación INBIO G+C, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

^b Departamento de Medicina Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

^c Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

^d Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

^e Centro de Selección y Reproducción Animal de Extremadura (CENSRYA), Badajoz, Spain



ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 November 2021

Received in revised form 18 January 2022

Accepted 18 January 2022

Available online 22 January 2022

Keywords:

Capacitation
Horse
Metabolites
Sperm

ABSTRACT

In the horse, a repeatable protocol for *in vitro* fertilization has not been developed, possibly due to incomplete sperm capacitation. We have previously identified the metabolites present in equine oviductal fluid (OF). We aimed to test the effects of different metabolites found in equine oviductal fluid on quality parameters of frozen-thawed spermatozoa. Different concentrations of myoinositol (5–25 mM), lactate (6–60 mM), glycine (0.1–5 mM), β -alanine (1–6 mM), and histamine (0.05–0.4 mM) were added independently to modified Whitten's medium (pH = 7.25). Thawed equine spermatozoa (three stallions, one ejaculate per stallion, n = 3) were incubated for 2 hours at 37°C in presence of the selected metabolites. After sperm incubation, total motility (TM), and progressive motility (PM) were evaluated by computer-assisted sperm analysis. Viability (SYBR-14⁺/PI⁻), mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) (JC-1), acrosome reaction (PNA⁺/PI⁻) and reactive oxygen species (ROS) production (CellRox⁺/PI⁻), were evaluated by flow cytometry. Protein tyrosine phosphorylation (PY) was evaluated by indirect immunofluorescence. Our results show that the addition of the metabolites at the dosages tested does not exert any effect on the sperm parameters analyzed. More research is needed to ascertain if metabolite addition at the dosages found in the equine OF exerts any remarkable effect on *in vitro* equine sperm capacitation.

© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Inc.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

1. Introduction

Conventional *in vitro* fertilization (IVF) is an important assisted reproduction technique routinely used in domestic animals to produce transferrable embryos [5]. However, in horses there is still no repeatable conventional IVF protocol [24] being its low efficiency generally related to inefficient sperm capacitation.

Conflict of interest statement: The authors have declared that no competing interests exist.

Ethical Statement: Ethical review and approval were not required for the animal study.

* Corresponding author at: Beatriz Macías-García, Departamento de Medicina Animal, Facultad de veterinaria, Universidad de Extremadura, Avda. de la Universidad s/n, 10003, Cáceres, Spain

E-mail address: bemaciasg@unex.es (B. Macías-García).

These authors contributed equally as senior investigators to this study.

tion was described in 1951 by [3] and [8] and is a complex process that confers the spermatozoa the ability to fertilize an oocyte.

Several studies have been conducted in an attempt to determine the optimum environment required to induce *in vitro* capacitation in equine spermatozoa. In this regard, the fertilization medium has been supplemented with different substances and/or molecules such as bicarbonate and albumin [28], heparin [2], progesterone [35], leptin [22], alkaline pH [14], and also with equine oviducts explants cultured from epithelial cells [23]. Although some of these treatments result in increased protein tyrosine phosphorylation (PY) (a final event related to capacitation) or induced sperm hyperactivation and/or acrosome reaction, none of them have consistently shown to improve IVF success in horses.

In mammals, the oviductal environment plays a crucial role for gamete interaction and fertilization [29]; hence, different studies have been conducted to study its composition in order to design

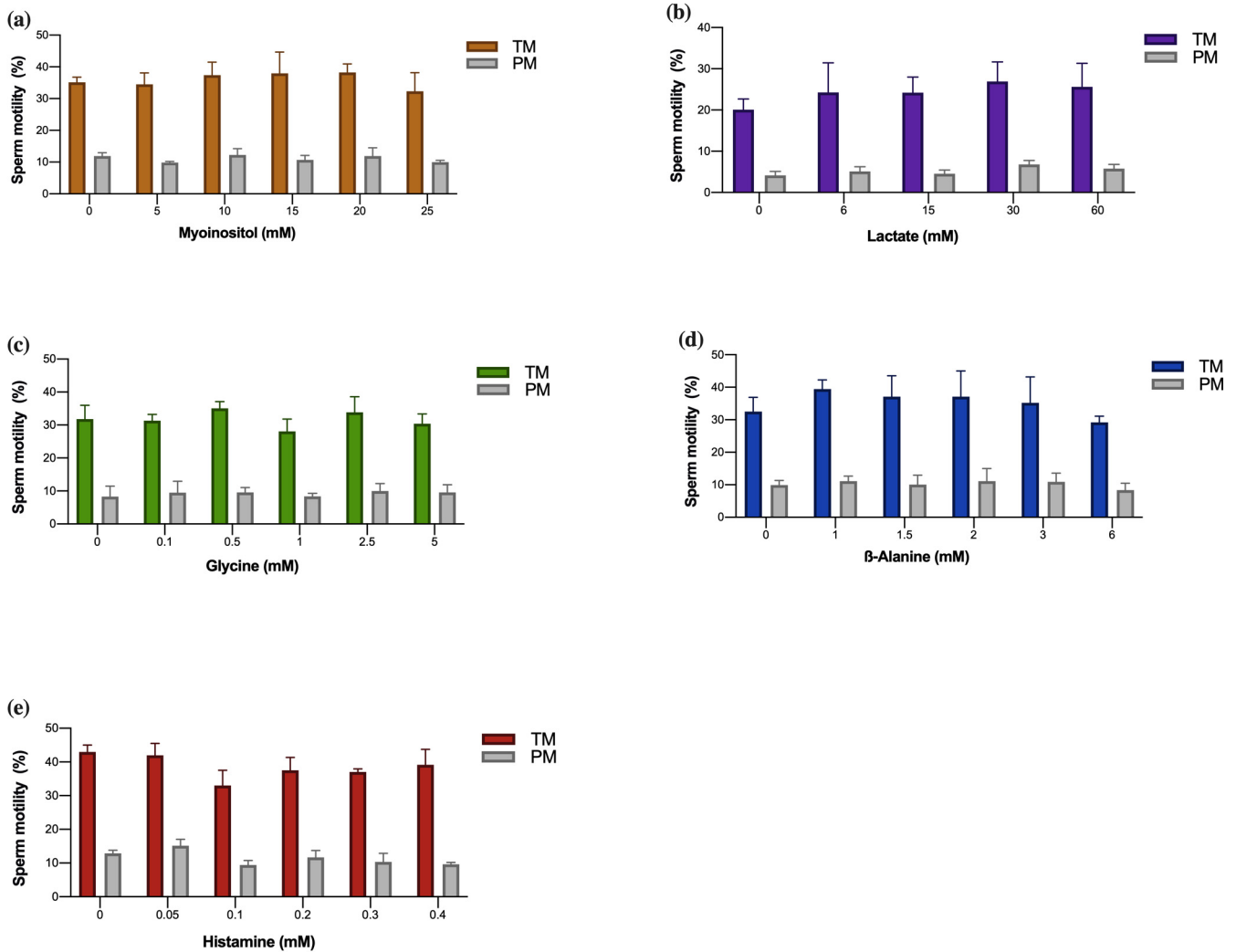


Fig. 1. Effect of different concentrations of myoinositol, lactate, glycine, β -alanine and histamine on sperm motility. Spermatozoa were incubated in MW medium with (A) myoinositol (5, 10, 15, 20, and 25 mM); (B) lactate (6, 15, 30, and 60 mM); (C) glycine (0.1, 0.5, 1, 2.5, and 5 mM); (D) β -alanine (1, 1.5, 2, 3, and 6 mM); and (E) histamine (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, and 0.4 mM) for 2 hours at 37 °C in air. The bars represent the mean of the percentage of total motility (TM) and progressive motility (PM) \pm SEM (n = 3).

an optimal *in vitro* fertilization medium. The oviductal fluid (OF) is secreted by oviductal epithelial cells and is a dynamic fluid composed of a mixture of different molecules such as ions, growth factors, proteins, hormones, and metabolites among others [32]. Many studies have tested the effect of OF in events related with capacitation in bull spermatozoa [20], boar spermatozoa [21] and ram spermatozoa [11], with the final objective of increasing *in vitro* fertilization rates.

Furthermore, the *in vitro* supplementation of specific metabolites found in the OF, have demonstrated to enhance fertilization or capacitation-related events in other species. As an example, the addition of myoinositol increases motility when added to frozen bovine spermatozoa [6] or fresh human spermatozoa [16]; glycine and β -alanine are able to induce acrosome reaction in hamster spermatozoa [27] and pyruvate supplementation increases progressive motility, hyperactivation, and PY in human spermatozoa [18].

In this regard, we have previously reported that native OF increases PY in equine spermatozoa when added at very low dosages to a modified Whitten's medium [15]. As equine OF metabolomics has already been analyzed, based on our previous research we have selected candidate metabolites found in the oviductal fluid (myoinositol, lactate, glycine, β -alanine, and histamine) and have

added them individually at the concentrations found in OF to a classical capacitating medium. These metabolites were chosen based on their extracellular nature, the high concentration found in OF or their impact on capacitation-related events in spermatozoa of other species.

We aim to elucidate if any of the conditions tested improve equine sperm capacitation with the final goal of improving the composition of the classical fertilization media currently used in horses.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagents

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich Inc (Barcelona, Spain) unless otherwise stated.

2.2. Media

The basal incubation medium used was modified Whitten's (MW) medium [15]. MW was composed of 100 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose (anhydrous), 22 mM HEPES,

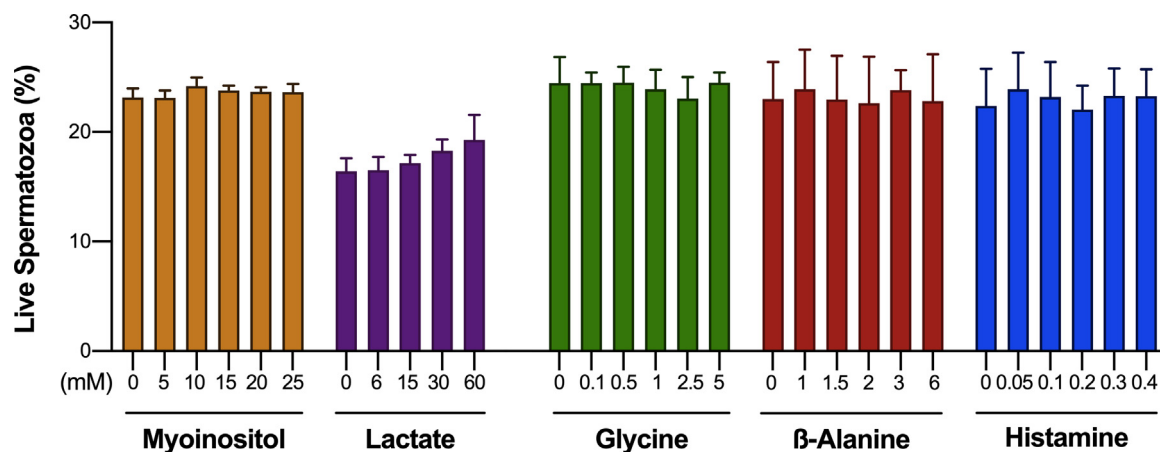


Fig. 2. Effect of different concentrations of myoinositol, lactate, glycine, β -alanine and histamine on sperm viability. Spermatozoa were incubated in MW medium with myoinositol (5, 10, 15, 20, and 25 mM), lactate (6, 15, 30, and 60 mM), glycine (0.1, 0.5, 1, 2.5, and 5 mM), β -alanine (1, 1.5, 2, 3, and 6 mM) and histamine (0.05, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 mM) for 2 hours at 37 °C in air. The bars represent the mean of the percentage of live spermatozoa \pm SEM (n = 3).

2.4 mM sodium lactate, 1.0 mM pyruvic acid, 25 mM bicarbonate, 2.4 mM calcium chloride, and 0.02% of polyvinyl alcohol (PVA) to prevent agglutination. A variant of MW (washing medium) was made omitting calcium chloride and bicarbonate; NaCl was added to adjust osmolarity. Media were adjusted to a pH of 7.25 prior sperm incubation.

2.3. Semen processing

Frozen semen was donated by the "Centro de Selección y Reproducción Animal of Extremadura" (CENSYRA), Spain. Ejaculates from three different stallions of proven fertility were used and each experiment was performed using one ejaculate from each of the three stallions (n = 3). Frozen semen was stored in liquid nitrogen in 0.5 mL French straws at 200×10^6 spermatozoa/mL. For each experiment, two straws were thawed in a water bath at 37°C for 1 minute. Afterwards, spermatozoa were centrifuged at room temperature (RT) in 1 mL of colloidal silica suspension (Pure Sperm 60%) for 10 minutes at 600 g. The pellet was washed in washing medium by centrifugation for 1 minute at 6,700 g at RT, and then diluted in MW medium at $15\text{--}20 \times 10^6$ spermatozoa/mL. MW was supplemented with different concentrations of myoinositol, lactate, glycine, β -alanine and histamine prior dilution and sperm suspensions were incubated at 37°C for 2 hours in a water bath. The control was added with NaCl to reach an equivalent osmolarity of the metabolite in study at the higher concentration used.

2.4. Evaluation of sperm motility

After incubation, sperm motility was analyzed using a computer-assisted sperm analysis (CASA) system (ISAS 1.0.6; Proiser S.L., Valencia, Spain). Two microliters of each sperm sample were placed in a warmed (37°C) counting chamber with a fixed height of 20 μ m (Leja Standard Count two Chamber slides; Leja Products, B.V., Nieuw-Vennep, The Netherlands).

A minimum of four microscopic fields and at least 300 spermatozoa were evaluated for each sample. The parameters assessed were total motility (TM) and progressive motility (PM).

2.5. Flow cytometry

Flow cytometry analysis was performed using an ACEA Novo-Cyte flow cytometer (ACEA Biosciences, Inc, San Diego, CA, USA) equipped with a three detection channels for blue laser (488 nm): BL-1 (530 \pm 30 nm band pass filter); BL-2 (572 \pm 28 nm band

pass filter) and BL-4 (675 \pm 30 nm band pass filter) and a detection channel for a red laser (640 nm): RL-1 (675 \pm 30 nm band pass filter). A total of 10,000 events at 400–800 cells/sec were acquired. Flow cytometry experiments and data analyses were performed using the ACEA Novo Express software (ACEA Biosciences, Inc, San Diego, CA, USA). Fluorescence data were acquired in a logarithmic scale.

After incubation, spermatozoa were evaluated by flow cytometry using different protocols described below. The samples were diluted to a final concentration of 1×10^6 spermatozoa/mL in phosphate buffered saline (PBS).

2.5.1. Analysis of sperm viability

Sperm viability was determined using SYBR-14 and Propidium Iodide (PI) probes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) [12] at final concentration of 20 nM and 5 μ M respectively. Samples were incubated for 10 minutes at RT. Viable spermatozoa were expressed as the percentage of SYBR-14 positive and PI negative (SYBR-14⁺ and PI⁻).

2.5.2. Analysis of mitochondrial membrane potential

Mitochondrial membrane potential was evaluated using the probe 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodine (JC-1) [31] at a final concentration of 0.9 μ M. Samples were incubated for 10 minutes at 37°C. The results were expressed in percentage of spermatozoa with high mitochondrial membrane potential (orange-stained cells).

2.5.3. Evaluation of acrosome reaction

The acrosome reaction was evaluated using the probes *Arachis hypogaea* lectin (PNA)-FITC and PI [31], at a final concentration of 0.4 μ g/mL, and 1.2 μ M respectively. Samples were incubated for 10 minutes at RT. Results were expressed as the average of the percentage of acrosome-reacted in live spermatozoa (PNA⁺/PI⁻).

2.5.4. Evaluation of reactive oxygen species production

The reactive oxygen species production was evaluated using the specific probe CellRox (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at a final concentration of 5 μ M. Samples were incubated for 30 minutes at 37°C; PI was added at 4.8 μ M in the last 5 minutes [30]. The fluorescence values were calculated on the geometric mean fluorescence intensity (MFI) of CellRox in live spermatozoa (PI⁻). Results are expressed as the relative fluorescent intensity (RFI) in arbitrary units normalized to the control.

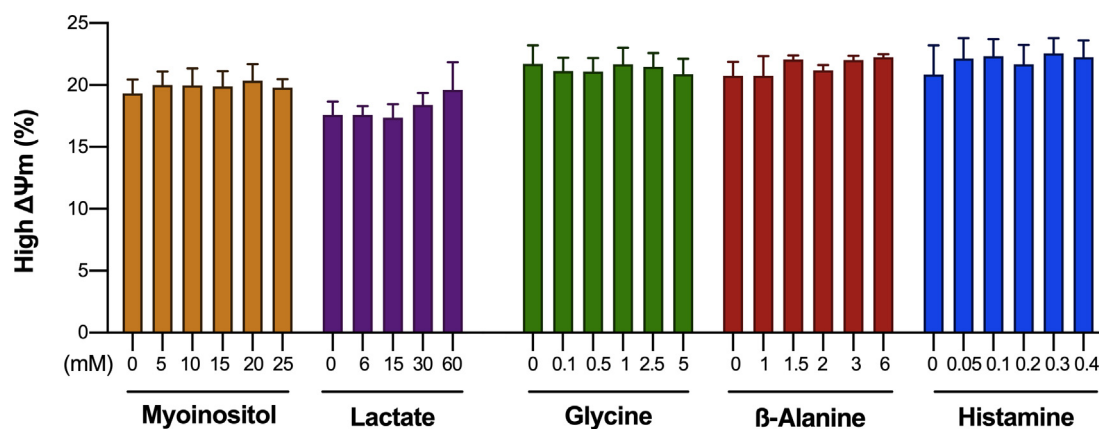


Fig. 3. Effect of different concentrations of myoinositol, lactate, glycine, β -alanine and histamine on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). Spermatozoa were incubated in MW medium with myoinositol (5, 10, 15, 20, and 25 mM), lactate (6, 15, 30, and 60 mM), glycine (0.1, 0.5, 1, 2.5, and 5 mM), β -alanine (1, 1.5, 2, 3, and 6 mM) and histamine (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, and 0.4 mM) for 2 hours at 37 °C in air. The bars represent the mean of the percentage of spermatozoa with high mitochondrial membrane potential \pm SEM (n = 3).

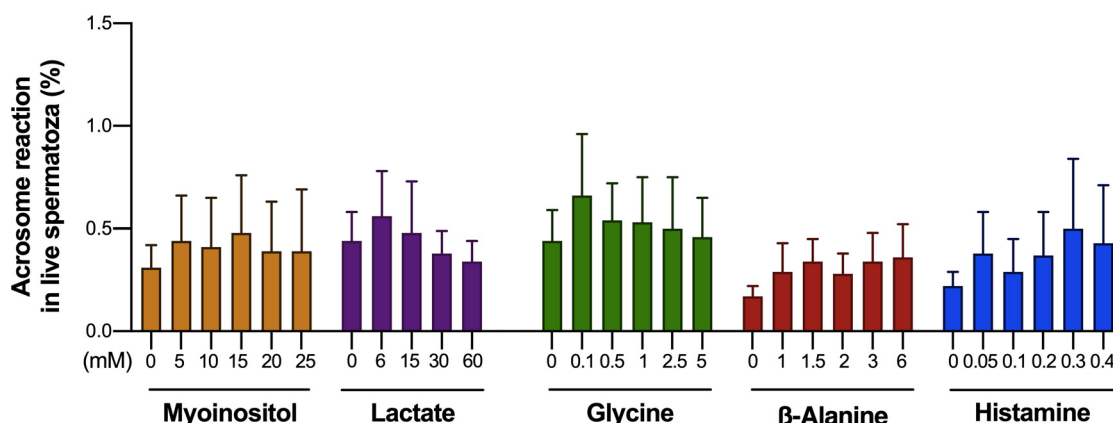


Fig. 4. Effect of different concentrations of myoinositol, lactate, glycine, β -alanine and histamine on acrosome reaction. Spermatozoa were incubated in MW medium with myoinositol (5, 10, 15, 20, and 25 mM), lactate (6, 15, 30, and 60 mM), glycine (0.1, 0.5, 1, 2.5, and 5 mM), β -alanine (1, 1.5, 2, 3, and 6 mM) and histamine (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, and 0.4 mM) for 2 hours at 37 °C in air. The bars represent the mean of the percentage of acrosome-reacted in live spermatozoa \pm SEM (n = 3).

2.5.5. Evaluation of protein tyrosine phosphorylation by indirect immunofluorescence

The protocol used was performed as previously described [13]. Following incubation, each sample was centrifuged for 3 minutes at 5,000 g. After centrifugation, the pellet was washed with 1 mL of PBS, and centrifuged again (3 minutes at 5,000 g). Then, spermatozoa were fixed with 4% formaldehyde in PBS for 15 minutes at RT, and washed with 1 mL of PBS for 1 minutes at 6,700 g. Spermatozoa were permeabilized with 0.1% Triton X-100 (v/v) in PBS for 10 minutes at RT. Spermatozoa were washed with PBS and blocked with 3% Bovine Serum Albumin (BSA) (w/v) in PBS for 60 minutes at RT. The samples were incubated with anti-phosphotyrosine monoclonal antibody 4G10 (diluted 1:500) in 3% BSA (w/v) in PBS at 4°C overnight.

The next morning, each sample was washed twice with 1% BSA in PBS (1 minute at 6,700 g), and then cells were incubated with goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa FluorPlus 488 (2 mg/mL)-conjugated secondary antibody (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (diluted 1:500) in 3% BSA in PBS for 60 minutes at RT. After three washings with 1% BSA in PBS (1 minute at 6,700 g) each pellet was diluted in 25 μ L of PBS and samples were mounted on a slide using ProLong gold antifade reagent with DAPI solution from Molecular Probes following manufacturer's indications (Eugene, OR, USA). Samples were then evaluated using an Olympus BX60 fluorescence microscope (New Hyde Park, NY, USA) equipped with a 60 x objective. A minimum of one hundred sper-

matozoa were counted for each sample. Spermatozoa were considered as positively stained when green fluorescence was detected along the tail.

2.6. Statistical analysis

The data were first examined using a Saphiro-Wilk test to confirm data distribution and analyzed for equal variances using a Levenéstest. A one-way ANOVA was used to compare values when normality was confirmed. A Kruskal-Wallis ANOVA on ranks test was used when the data did not show a gaussian distribution. Statistical significance was set at $P < .05$. Analyses were performed using SigmaPlot ver. 12.0 for Windows (Systat Software, Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Evaluation of sperm motility and viability

First, we investigated the possible effects of the selected metabolites after sperm incubation on sperm motility, and viability. We did not observe statistically significant differences in any metabolite and concentration tested compared with its own control in total motility (TM; Fig. 1), progressive motility (PM; Fig. 1) or viability (Fig. 2).

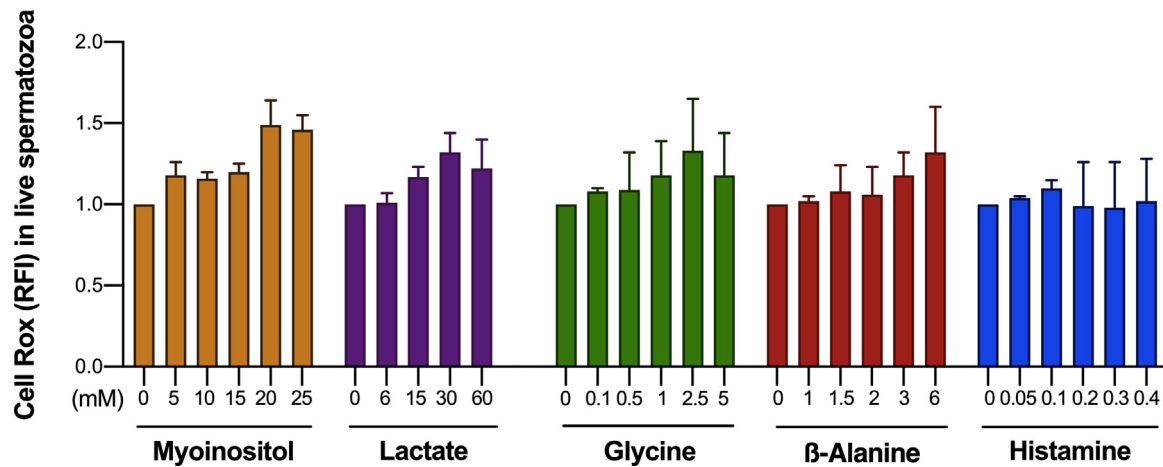


Fig. 5. Effect of different concentrations of myoinositol, lactate, glycine, β -alanine and histamine on reactive oxygen species production in live sperm. Spermatozoa were incubated in MW medium with myoinositol (5, 10, 15, 20, and 25 mM), lactate (6, 15, 30, and 60 mM), glycine (0.1, 0.5, 1, 2.5, and 5 mM), β -alanine (1, 1.5, 2, 3, and 6 mM) and histamine (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, and 0.4 mM) for 2 hours at 37°C in air. The bars represent the relative fluorescent intensity (RFI) in arbitrary units of CellRox positive in live spermatozoa normalized to the control \pm SEM (n = 3).

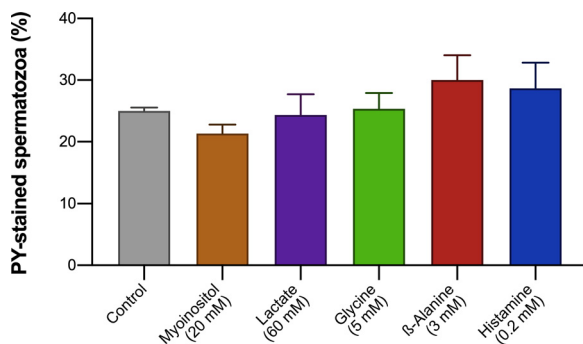


Fig. 6. Effect of different concentrations of myoinositol, lactate, glycine, β -alanine, and histamine on protein tyrosine phosphorylation. Spermatozoa were incubated in MW medium with 20 mM myoinositol, 60 mM lactate, 5 mM glycine, 3 mM β -alanine, and 0.2 mM histamine for 2 hours at 37°C in air. The bars represent the mean of the spermatozoa showing protein tyrosine phosphorylation along the entire tail \pm SEM (n = 3).

3.2. Analysis of mitochondrial membrane potential, acrosome reaction, and reactive oxygen species production

Next, we investigated the effects of the selected metabolites on different sperm parameters. None of the sperm parameters studied were affected by any condition used when compared to its own control ($P > .05$): mitochondrial membrane potential (Fig. 3), acrosome reaction (Fig. 4), and reactive oxygen species production (Fig. 5).

3.3. Evaluation of protein tyrosine phosphorylation by indirect immunofluorescence

Finally, we studied the effect of the different metabolites at one of the concentrations found in the OF on PY. We did not observe statistically significant differences in the number of spermatozoa showing PY-associated fluorescence along the entire tail compared to the control (Fig. 6).

4. Discussion

In the present work, we aimed to assess the effect of specific metabolites found in the equine OF on equine frozen-thawed spermatozoa. To this end, we chose the candidate metabolites found

in equine post-ovulatory OF [15] (myoinositol, lactate, glycine, β -alanine, and histamine).

The first metabolite analyzed was myoinositol, a polyalcohol that is mainly produced by Sertoli cells [9], and is known to be involved in sperm function regulation [7]. Myoinositol has been described to exert an antioxidant effect and play a role in the regulation of intracellular Ca^{+2} [4]. Interestingly, a study of the transcriptome of spermatozoa from fertile stallions showed a significantly enriched array of proteins related to D-myoinositol phosphate metabolism compared to subfertile stallions, suggesting that this metabolite may play a role in equine fertility [34]. However, in our conditions we did not observe any effect of myoinositol on sperm motility, mitochondrial membrane potential, acrosome reaction induction or changes in PY. These results are consistent with previous reports in which cooled equine sperm were supplemented with myoinositol [1] and no effects were observed.

In a previous work we demonstrated that the most concentrated metabolite found in equine OF prior and after ovulation is lactate [15]; this molecule is known to be a major source of energy for equine spermatozoa. It is well known that oxidative phosphorylation is the primary source of ATP that maintains motility and mitochondrial function in equine spermatozoa [10]; in this sense, it has been demonstrated that lactate, and pyruvate promote maximal mitochondrial function as equine sperm require a high rate of energy metabolism [10]. Even when typical capacitation media such as Modified Whitten's medium or Tyrode's albumin lactate pyruvate (TALP) contain lactate, it is added at concentrations ranging from 0.45 to 21.6 mM, which are significantly lower to what is found in equine oviductal fluid, whose concentration varies from 29.7 to 90 mM [15]. Hence, we hypothesized that a higher concentration of lactate could better mimic the oviductal environment, and enhance equine spermatozoa ability to undergo capacitation. However, in our setting, lactate addition did not induce any significant change in equine sperm motility, acrosome reaction or PY induction after 2 hours. These results are in contrast to those reported by Hernández-Avilés, *et al.* who described that lactate addition at 19.8, 40- or 80-mM decreased sperm motility and acrosome intactness after 1 hour of incubation at 37°C [19]. However, these authors used a skimmed-milk based extender added with 10% seminal plasma to perform their incubations and the osmolarity of the medium was adjusted using sucrose. Hence, these divergences in the experimental design may explain why in our setting no differences in the sperm parameters assessed were detected.

In our work, the effects of two additional metabolites namely glycine, and β -alanine were tested. Both metabolites trigger the activation of the glycine receptor/Cl⁻ (GlyR) that induces acrosome reaction [27] as demonstrated in human, porcine, mouse, and hamster spermatozoa [33]. In our experimental setting, the induction of acrosome reaction was not observed at any of the dosages tested for glycine or β -alanine. These differences with previous reports can be attributed to the fact that our spermatozoa were incubated in a capacitating medium in presence of glycine or β -alanine, while in previous reports in hamster spermatozoa, 3 hours of pre-capacitation prior amino acid addition were used [27]; besides, the zona pellucida seems to be required to properly trigger GlyR activation, and in our setting, no oocytes were present [25].

The last metabolite tested was histamine, which has been reported to trigger an increase in intracellular calcium levels in human spermatozoa that lead to cell death in dosages ranging from 50 to 165 mM [17], well above the 0.08–0.37 mM histamine concentration found in equine OF [15]. In our setting, no deleterious effects were observed when histamine was added at any dosage tested, and no effect on capacitation related events was noticed either. Hence, as previously postulated, histamine may be involved in the regulation of smooth muscle contractions in the oviduct, promoting sperm progression [26].

Unfortunately, none of the metabolites tested in the present work at the dosages found in the equine oviduct seemed to promote sperm capacitation. However, no deleterious effects on sperm viability were observed, and hence, the dosages tested demonstrated to be non-toxic. Our data failed to show a single metabolite and/or dosage that enhanced capacitation-related events *in vitro*, but these metabolites may need to be tested in combination. The use of frozen spermatozoa in our experimental setting tried to mimic the most common scenario found in IVF laboratories in which frozen semen is generally used, however, the use of fresh equine spermatozoa could also yield different results, and more studies should be conducted.

5. Conclusion

Our data are the first to analyze the effects of selected metabolites at the concentrations found in equine oviductal fluid on equine spermatozoa. Even when our results did not show any significant change in any of the parameters analyzed, we keep increasing our understanding of the equine sperm capacitation requirements aiming to develop a repeatable equine *in vitro* fertilization protocol. More research is warranted to better understand the capacitation requirements of equine spermatozoa and the role of the oviductal environment during *in vitro* fertilization.

Acknowledgments

Grants AGL2017-84681-R and PID2020-112723RB-I00 funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and, by “ERDF A way of making Europe”. Grants RYC-2017-21545 and RYC2020-028915-I funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and, by “ESF Investing in your future”. P. Fernández-Hernández was supported by a grant “Acción II” from the University of Extremadura (Ref. Beca RC4).

References

- Affonso FJ, Carvalho HF, Lançon R, Lemes KM, Leite TG, Oliveira LZ, Celeghini ECC, de Arruda RP. Addition of antioxidants myoinositol, ferulic acid, and melatonin and their effects on sperm motility, membrane integrity, and reactive oxygen species production in cooled equine semen. *J Equine Vet Sci* 2017;59:57–63. doi:10.1016/j.jevs.2017.09.006.
- Alm H, Torner H, Blottner S, Nürnberg G, Kanitz W. Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on *in vitro* fertilization of horse oocytes. *Theriogenology* 2001;56(5):817–29. doi:10.1016/S0093-691X(01)00610-0.
- Austin C. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Biol Sci* 1951;4(4):581. doi:10.1071/B19510581.
- Barbagallo F, La Vignera S, Cannarella R, Aversa A, Calogero AE, Condorelli RA. Evaluation of sperm mitochondrial function: a key organelle for sperm motility. *J Clin Med*. 2020;9(2):363. doi:10.3390/jcm9020363.
- Bavister B. Early history of *in vitro* fertilization. *Reproduction* 2002;181–96. doi:10.1530/rep.0.1240181.
- Boni R, Gallo A, Cecchini S. Kinetic activity, membrane mitochondrial potential, lipid peroxidation, intracellular pH and calcium of frozen/thawed bovine spermatozoa treated with metabolic enhancers. *Andrology* 2017;5(1):133–45. doi:10.1111/andr.12259.
- Calogero AE, Gullo G, La Vignera S, Condorelli RA, Vaiarelli A. Myoinositol improves sperm parameters and serum reproductive hormones in patients with idiopathic infertility: A prospective double-blind randomized placebo-controlled study. *Andrology* 2015;3(3):491–5. doi:10.1111/andr.12025.
- Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951;168(4277):697–8. doi:10.1038/168697b0.
- Condorelli RA, La Vignera S, Mongioi LM, Vitale SG, Laganà AS, Cimino L, Calogero AE. Myo-inositol as a male fertility molecule: speed them up!. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017;21(2 Suppl):30–5.
- Darr CR, Varner DD, Teague S, Cortopassi GA, Datta S, Meyers SA. Lactate and pyruvate are major sources of energy for stallion sperm with dose effects on mitochondrial function, motility, and ROS production. *Biol Reprod* 2016;95(2):34. doi:10.1095/biolreprod.116.140707.
- El-Shahat KH, Taysser MI, Badr MR, Zaki KA. Effect of oviduct and follicular fluids on ram sperm capacitation and acrosome reaction *in vitro*. *Int J Vet Sci Med* 2018;6(sup1):S57–62. doi:10.1016/j.ijvsm.2017.12.002.
- Foster ML, Love CC, Varner DD, Brinko SP, Hinrichs K, Teague S, LaCaze K, Blanchard TL. Comparison of methods for assessing integrity of equine sperm membranes. *Theriogenology* 2011;76(2):334–41. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.02.012.
- González-Fernández L, Macías-García B, Loux SC, Varner DD, Hinrichs K. Focal adhesion kinases and calcium/calmodulin-dependent protein kinases regulate protein tyrosine phosphorylation in stallion sperm. *Biol Reprod* 2013;88(6):138. doi:10.1095/biolreprod.112.107078.
- González-Fernández L, Macías-García B, Velez IC, Varner DD, Hinrichs K. Calcium-calmodulin and pH regulate protein tyrosine phosphorylation in stallion sperm. *Reproduction* 2012;144(4):411–22. doi:10.1530/REP-12-0067.
- González-Fernández L, Sánchez-Calabuig MJ, Calle-Guisado V, García-Marín LJ, Bragado MJ, Fernández-Hernández P, Gutiérrez-Adán A, Macías-García B. Stage-specific metabolic changes in equine oviductal fluid: new insights into the equine fertilization environment. *Theriogenology* 2020;143:35–43. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.11.035.
- Governini L, Ponchia R, Artini PG, Casarosa E, Marzi I, Capaldo A, Luddi A, Piomboni P. Respiratory mitochondrial efficiency and DNA oxidation in human sperm after *in vitro* myo-inositol treatment. *J Clin Med* 2020;9(6):1638. doi:10.3390/jcm9061638.
- Gupta A, Khosla R, Gupta S, Tiwary AK. Influence of histamine and H1- receptor antagonists on ejaculated human spermatozoa: role of intrasperm Ca²⁺. *Indian J Exp Biol* 2004;42:481–5.
- Hereng TH, Elgstøen KBP, Cederkvist FH, Eide L, Jahnsen T, Skålhegg BS, Rosendal KR. Exogenous pyruvate accelerates glycolysis and promotes capacitation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2011;26(12):3249–63. doi:10.1093/humrep/der317.
- Hernández-Avilés C, Ramírez-Agámez L, Love CC, Friedrich M, Pearson M, Kelley DE, Beckham AMN, Teague SR, LaCaze KA, Brinko SP, Varner DD. The effects of metabolic substrates glucose, pyruvate, and lactate added to a skim milk-based semen extender for cooled storage of stallion sperm. *Theriogenology* 2021;161:83–97. doi:10.1016/j.theriogenology.2020.11.017.
- Küçük N, Lopes JS, Soriano-Úbeda C, Hidalgo CO, Romar R, Gadea J. Effect of oviductal fluid on bull sperm functionality and fertility under non-capacitating and capacitating incubation conditions. *Theriogenology* 2020;158:406–15. doi:10.1016/j.theriogenology.2020.09.035.
- Kumaresan A, González R, Johannisson A, Berqvist A-S. Dynamic quantification of intracellular calcium and protein tyrosine phosphorylation in cryopreserved boar spermatozoa during short-time incubation with oviductal fluid. *Theriogenology* 2014;82(8):1145–53. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.07.029.
- Lange-Consiglio A, Cremonesi F. Hyperactivation of stallion sperm in follicular fluid for *in vitro* fertilization of equine oocyte. *Reprod Fertil Dev* 2012;24(1):193. doi:10.1071/RDV24n1Ab163.
- Leemans B, Gadella BM, Sostaric E, Nelis H, Stout TAE, Hoogewijs M, Van Soom A. Oviduct binding and elevated environmental pH induce protein tyrosine phosphorylation in stallion spermatozoa. *Biol Reprod* 2014(1):91. doi:10.1095/biolreprod.113.116418.
- Leemans B, Gadella BM, Stout TAE, De Schauwer C, Nelis H, Hoogewijs M, Van Soom A. Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization. *Reproduction* 2016;152(6):R233–45. doi:10.1530/REP-16-0420.
- Leemans B, Stout TAE, De Schauwer C, Heras S, Nelis H, Hoogewijs M, Van Soom A, Gadella BM. Update on mammalian sperm capacitation: How much does the horse differ from other species? *Reproduction* 2019;157(5):R181–97. doi:10.1530/REP-18-0541.
- Leese H, Tay J, Reischl J, Downing S. Formation of fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction* 2001;339–46. doi:10.1530/rep.0.1210339.
- Llanos, M. N., Ronco, A. M., Aguirre, M. C., Meizel, S. (2001). Hamster sperm glycine receptor: Evidence for its presence and involvement in

- the acrosome reaction. *Mol Reprod Dev*, 58(2), 205–215. doi:10.1002/1098-2795(200102)58:2<205::AID-MRD10>3.0.CO;2-J
- [28] Macías-García B, González-Fernández L, Loux SC, Rocha AM, Guimarães T, Peña FJ, Varner DD, Hinrichs K. Effect of calcium, bicarbonate, and albumin on capacitation-related events in equine sperm. *Reproduction* 2015;149(1):87–99. doi:10.1530/REP-14-0457.
- [29] Ménézo Y, Guérin P, Elder K. The oviduct: a neglected organ due for re-assessment in IVF. *Reproductive BioMedicine Online* 2015;30(3):233–40. doi:10.1016/j.rbmo.2014.11.011.
- [30] Nakano T, Kono M, Segawa K, Kurosaka S, Nakaoka Y, Morimoto Y, Mitani T. Effects of exposure to methylglyoxal on sperm motility and embryonic development after fertilization in mice. *J Reprod Dev* 2021. doi:10.1262/jrd.2020-150.
- [31] Robles, V., Martínez-Pastor, F. (2013). Flow cytometric methods for sperm assessment. In D. T. Carrell & K. I. Aston (Eds.), *Spermatogenesis* 927, 175–186). Humana Press. doi:10.1007/978-1-62703-038-0_16
- [32] Saint-Dizier M, Schoen J, Chen S, Banliat C, Mermillod P. Composing the early embryonic microenvironment: physiology and regulation of oviductal secretions. *Int J Mol Sci* 2019;21(1):223. doi:10.3390/ijms21010223.
- [33] Sato Y, Son JH, Meizel S. The mouse sperm glycine receptor/chloride channel: cellular localization and involvement in the acrosome reaction initiated by glycine. *J Androl* 2000;21(1):99–106. doi:10.1002/j.1939-4640.2000.tb03281.x.
- [34] Suliman Y, Becker F, Wimmers K. Implication of transcriptome profiling of spermatozoa for stallion fertility. *Reprod Fertil Dev* 2018;30(8):1087. doi:10.1071/RD17188.
- [35] Tremoleda JL, Stout TAE, Gadella BM, Colenbrander B. Sperm-oocyte interaction during *in vitro* fertilization in the horse. *Reprod Fertil Dev* 2004;16(2):263. doi:10.1071/RDv16n1Ab286.

W49

INFLUENCE OF SUPPLEMENTATION OF FERTILIZATION MEDIUM WITH EQUINE OVIDUCTAL FLUID ON THE FERTILIZING CAPACITY OF FROZEN/THAWED EQUINE SPERMATOZOA

*P. Fernández Hernández*¹, *B. Macías García*¹, *L. González Fernández*²

¹*Department of Animal Medicine, University of Extremadura, Cáceres.*

²*SINTREP group, University of Extremadura, Cáceres.*

BACKGROUND-AIM

A repeatable protocol for conventional in vitro fertilization (IVF) has remained elusive in the horse. Recently this group has demonstrated that addition of equine postovulatory oviductal fluid (OF) at 0.125 % (v/v) induces stallion-independent protein tyrosine phosphorylation (PY) in fresh equine spermatozoa when incubated in a capacitating medium. Hence, the aim of the study was to test the effect of OF on PY induction in frozen equine spermatozoa and determine its usefulness in conventional IVF.

METHODS

Thawed equine spermatozoa (37 °C for 60 s; n = 3, one ejaculate per stallion) were incubated for 2 h at 37 °C in Modified Whitten's medium (MW; pH = 7.25) in presence or absence of OF at 0.125 % (v/v). After incubation, spermatozoa were fixed and PY was evaluated by immunofluorescence using an anti-phosphotyrosine monoclonal antibody (clone 4G10). In parallel, equine cumulus-oocyte complexes (COCs) retrieved in vivo or post-mortem were matured in Tissue Culture Medium 199 (TCM-199) added with 5 mU/mL of follicle-stimulating hormone and 10 % of fetal bovine serum for 28-30 hours. Mature COCs were then co-incubated in MW medium added with OF at 0.125 % (v/v) for 20-24 hours in a 5 % CO₂/95 % air atmosphere at 38.5 °C with 1 x 10⁶ spermatozoa/mL (5 ejaculates from 5 different stallions). After co-incubation, oocytes (n = 78, 6 replicates) were denuded, fixed and stained with 2.5 µg/mL of Hoechst 33342. PY and oocyte fertilization were evaluated by fluorescence microscopy.

RESULTS

The individual percentage of PY positive sperm (stained tails) in control for stallion 1 was 31 %, for stallion 2 was 28 % and for stallion 3 was 26 %, and OF addition yielded 48 %, 22 % and 30 % respectively. The data of the study showed an increase in the percentage of PY positive sperm in stallions 1 and 3 when OF was added, however no effective fertilization was observed.

CONCLUSIONS

Hence, even when PY can be induced in frozen-thawed equine spermatozoa using OF at 0.125 %, this PY induction does not correlate with the sperm's ability to fertilize an oocyte in the horse. IVF in the horse still remains a matter of study and more research is needed to develop repeatable protocols.

Discusión

Uno de los factores claves que ha impedido incrementar las tasas de éxito de las técnicas de reproducción asistida en los mamíferos ha sido la falta de homología entre las condiciones *in vivo* y las condiciones durante los procedimientos *in vitro*. En base a esto, numerosos estudios realizados en diferentes especies han usado distintos fluidos reproductivos como el FF o FO para suplementar los medios usados en el laboratorio con unos significativos impactos positivos (Tesfaye et al., 2022). Previo a la realización de ensayos para demostrar el beneficio de utilizar estos fluidos *in vitro*, es necesario la caracterización y análisis funcional de las diferentes fracciones que lo componen. En el caso del caballo existe una evidente falta de conocimiento sobre la composición del FF y el FO, en base a lo cual planteamos los diferentes trabajos que componen la presente Tesis Doctoral.

En el primer trabajo de esta Tesis se caracterizó el perfil metabólico del FF pre-ovulatorio en yeguas de matadero comparándolo con la composición de los principales medios comerciales de maduración *in vitro*: TCM-199 y DMEM/F-12. Previamente, Gerard y colaboradores en 2002 y 2015 realizaron la determinación de estos fluidos por resonancia magnética nuclear de protones (del inglés: *proton nuclear magnetic resonance, H-NMR*) (Gerard et al., 2002; Gérard et al., 2015). Sin embargo, la gran diferencia con nuestro trabajo fue que en nuestro estudio analizamos el FF procedente de folículos de diámetro igual o superior a 35 mm asociado a edema uterino en yeguas de matadero mientras que, en los trabajos de Gerard y colaboradores (2002 y 2015), el FF pre-ovulatorio no procedía de folículos de diámetro superior a 35 mm y no se tuvo en cuenta el estado del útero. Por lo tanto, no se aseguró la caracterización de los metabolitos procedentes del ambiente más cercano a la ovulación o bien, podría tratarse de un ambiente no pre-ovulatorio debido al menor tamaño del folículo (Davies Morel et al., 2010).

Dentro de los metabolitos con mayor relevancia encontrados en nuestro trabajo está el lactato, que con una concentración de $27,3 \text{ mM} \pm 2,2$ (media \pm error estándar de la media) fue notablemente superior a la concentración encontrada en el trabajo de Gerard y colaboradores (2002): $0,70 \text{ mM} \pm 0,18$. Esto podría ser fácilmente explicado debido a la acumulación del lactato *post mortem* (Tews et al., 1963), ya que las muestras en nuestro trabajo se obtuvieron unos 30 minutos tras el sacrificio de los animales, a diferencia del trabajo de Gerard y colaboradores (2002) en el que se recogieron *in vivo*. La presencia de concentraciones elevadas de lactato en otros fluidos biológicos recuperados *post mortem*, como el FO equino ya fue descrita previamente por este grupo de investigación, sugiriendo también esta hipótesis (González-Fernández et al., 2020). Sin embargo, debemos tener en cuenta que en la producción de lactato se generan 2 moléculas por cada molécula de glucosa consumida (Piñero-Sagredo et al., 2010), y si tenemos en cuenta que el rango de concentración de glucosa que detectamos fue $3,1 - 5,5 \text{ mM}$, coincidiendo con otros trabajos (Engle & Foley, 1975; Gerard et al., 2000, 2002; Gérard et al., 2015), esta elevada concentración de lactato no puede ser explicada únicamente por el metabolismo de la glucosa *post mortem*. Además, otros trabajos han mostrado la presencia de concentraciones elevadas de este metabolito en el FF pre-ovulatorio *in vivo* (Gerard et al., 2000), así como su consumo por parte de los CCOs madurados *in vitro* (Lewis, Hinrichs, Leese, McG. Argo, et al., 2020). En base a esto y teniendo en cuenta que el 95% de la glucosa consumida por el ovocito equino se lleva a cabo mediante la glucólisis aerobia (Lewis, Hinrichs, Leese, McG. Argo, et al., 2020), el lactato podría ser usado como fuente de energía primaria y no constituir únicamente un subproducto, como sucede en otros mamíferos (Piñero-Sagredo et al., 2010). Esto sugiere que podría ser necesaria la suplementación con lactato de los medios comerciales de MIV, los cuales carecen de este metabolito.

Otro metabolito encontrado en nuestro trabajo con una gran relevancia en el metabolismo energético, así como en el metabolismo del ovocito equino es el piruvato. La presencia de este metabolito se ha demostrado en el FF de folículos tempranos y en la última

fase de dominancia a una concentración de 0,03 y 0,13 mM respectivamente (Gerard et al., 2000), siendo muy similar a la concentración de $0,16 \pm 0,03$ mM encontrada en nuestro trabajo en folículos pre-ovulatorios. Se ha demostrado que la adición de piruvato al medio *DMEM/F-12* a una concentración de 0,15 mM incrementa de forma significativa el consumo de glucosa, confirmando que es un importante sustrato energético (Lewis, Hinrichs, Leese, McG. Argo, et al., 2020). Sin embargo, cabe destacar que en nuestro trabajo no pudimos distinguir el piruvato del succinato, por lo que no hemos podido conocer la concentración exacta de este metabolito. A pesar de esto, según nuestros resultados y en base a otros trabajos, sería importante analizar los efectos de la adición de piruvato, así como la concentración usada en los medios de MIV.

Otros metabolitos como el acetato, la alanina, el citrato y la glucosa fueron encontrados en nuestro trabajo en concentraciones similares a las descritas por Gérard y colaboradores (2015). Además, aunque encontramos diferencias en otros metabolitos como la histidina y la valina ($0,05 \pm 0,009$ y $0,13 \pm 0,02$ mM, respectivamente) comparadas con el trabajo de Gerard y colaboradores (2015) (0,27 y 0,37 mM, respectivamente), ninguna de ellos se ha relacionado con funciones conocidas hasta el momento que puedan ser relevantes en la maduración ovocitaria (Pors et al., 2021; S. Zhang et al., 2017).

En el presente trabajo, además identificamos otros metabolitos como la carnitina, la creatina, la creatina fosfato y la glucosa-1-fosfato. Dado que estos metabolitos son metabolitos intracelulares, su presencia podría explicarse por un incremento de la muerte celular y rotura de las membranas. Sin embargo, en la actualidad se ha demostrado que existen componentes intracelulares presentes en fluidos biológicos de yegua y vaca vehiculados por vesículas extracelulares (da Silveira et al., 2012; Gatién et al., 2019; González-Fernández et al., 2020). Estos componentes localizados en las vesículas extracelulares pueden ser incluidos en el interior de ovocitos y embriones mediante la fusión de sus membranas con la célula receptora (Abels & Breakefield, 2016). Se ha demostrado que los componentes de las vesículas extracelulares

intervienen en la comunicación intercelular, y en el caso del FF, han sido relacionadas con importantes funciones como el crecimiento folicular, la maduración y la viabilidad de los ovocitos (Machtinger et al., 2015). Incluso, se ha conseguido de forma reciente mejorar los resultados de maduración nuclear de ovocitos de yegua con la adición de vesículas extracelulares, procedentes de FF, a los medios de MIV convencionales (Gabryś et al., 2022).

En relación al papel de la L-carnitina en la calidad ovocitaria, ésta juega un papel importante en la modulación del metabolismo de la glucosa y de los lípidos (Li et al., 2021; Montjean et al., 2012), así como en el incremento de la actividad de algunas enzimas antioxidantes (Arduini et al., 1992). Su presencia en el FF equino es interesante, ya que a día de hoy no se conoce ni la biosíntesis ni los mecanismos de transporte hasta las células foliculares de la L-carnitina (Li et al., 2021). Se han realizado experimentos añadiendo L-carnitina a los medios de MIV obteniendo efectos positivos en las tasas de maduración nuclear y en el desarrollo embrionario temprano de ovocitos ovinos, porcinos (Richani et al., 2021), ratón (Abdelrazik et al., 2009) y caninos (Moawad et al., 2021). En estos estudios se ha propuesto que la L-carnitina promueve el metabolismo lipídico a través del transporte de ácidos grasos a la mitocondria para que sean oxidados produciendo así energía (Li et al., 2021). En base a estos estudios se está comenzando a otorgar una gran relevancia al metabolismo lipídico, sugiriendo que puede ser una fuente energética más importante incluso que la glucosa (Dalbies-Tran et al., 2020).

La creatina y la creatina fosfato son producidas a partir del metabolismo de la arginina y la glicina, teniendo ambos metabolitos funciones importantes (Joncquel-Chevalier Curt et al., 2015). En nuestro trabajo, no identificamos la arginina en el FF, pero si está presente en los dos medios de incubación comerciales más utilizados para la MIV. En los ovocitos humanos se ha relacionado una eliminación de este metabolito durante las 6 horas finales de la MIV con una mayor tasa de maduración, lo que podría justificar la presencia de este metabolito en los medios

de MIV equinos (Hemmings et al., 2013). Otro metabolito que identificamos en el FF equino es la glicina; este metabolito está presente de forma mayoritaria en el fluido uterino y folicular (S. A. Hugentobler, Diskin, et al., 2007). La glicina es conocida por ser un regulador de la osmolaridad en embriones (Steeves & Baltz, 2005), incluso, se ha demostrado que su concentración en el FF bovino tras la inseminación puede ser usado como marcador de la tasa de división y de blastocistos (Sinclair et al., 2008). Los medios comerciales actuales utilizados en la especie equina contienen unas concentraciones notablemente menores de este metabolito en comparación con el FF pre-ovulatorio, por lo que podría ser importante la reformulación de este metabolito en los medios de MIV utilizados en équidos.

La glucosa-1-fosfato, la cual proviene del glucógeno, es una fuente energética usada por las células de la granulosa en varias especies de mamíferos (Gu et al., 2015; Otani et al., 1985; Uzbekova et al., 2009). Si tenemos en cuenta que en nuestro trabajo la concentración de glucosa ($4,3 \pm 0,4$ mM) es inferior a la de glucosa-1-fosfato ($6,9 \pm 0,4$ mM), se podría proponer que el metabolismo del glucógeno es una vía utilizada por los ovocitos durante la maduración, como ya han sugerido otros autores (Lewis, Hinrichs, Leese, McG. Argo, et al., 2020). Sin embargo, debemos tener en cuenta que se ha demostrado que la concentración de este metabolito en el interior de vesículas extracelulares provenientes del oviducto de vacas se ve muy afectada por el momento del ciclo estral (Gatien et al., 2019) y que en otros trabajos similares al nuestro no ha sido detectado (Gerard et al., 2002; Gérard et al., 2015). En base a estos resultados sugerimos la necesidad de realizar más investigación sobre la concentración de este metabolito y del glucógeno en el FF y su papel en el metabolismo energético del ovocito en su ambiente *in vivo*.

Una de las cuestiones a tener en cuenta es que, a pesar de que habitualmente el SFB se añade a una concentración entre 10 – 20% a los medios comerciales de MIV, consiguiendo los resultados de maduración nuclear más óptimos (González-Fernández et al., 2015; Hinrichs, 2018), este componente no ha sido considerado en el presente trabajo. Existe un gran dilema

sobre el uso de SFB en los medios de cultivo, debido a que la composición del SFB varía entre lotes y esto supone un problema a la hora de estandarizar los protocolos en los procedimientos clínicos así como realizar investigaciones reproducibles (van der Valk, 2022). La opción de haber realizado el presente trabajo con un único lote no hubiera mostrado un resultado representativo, siendo éste el motivo por el que este componente no ha sido considerado en nuestro trabajo.

Este trabajo aporta la primera comparativa entre la composición metabolómica del FF pre-ovulatorio frente a los medios de maduración comerciales usados en la actualidad en equino. Gracias al conocimiento previo de la metabolómica del ambiente de maduración *in vivo* se han podido dilucidar las principales deficiencias de los medios de maduración *in vitro* en otras especies, de igual forma estos resultados podrían ayudar a optimizar y mejorar la eficiencia de estos medios en el equino.

En el segundo trabajo de la presente Tesis Doctoral se caracterizó la proteómica del FO recuperado en oviductos de matadero antes y después del momento de la ovulación. Previamente a la publicación de este trabajo, este grupo de investigación describió por primera vez el método de obtención, mediante un capilar de hematocrito, del FO procedente del oviducto de yeguas de matadero, realizando además un análisis metabolómico (González-Fernández et al., 2020). Hasta la fecha, sólo se ha descrito la recogida mediante una cánula fija y mantenida en yeguas vivas (Campbell et al., 1979; Willis et al., 1994), la cual puede causar inflamación y alterar la composición de dicho fluido (H. J. Leese et al., 2008) o mediante el lavado del oviducto (Leemans, Gadella, Stout, Nelis, et al., 2015; Smits et al., 2017). Cabe mencionar que con este último método se pueden identificar los diferentes componentes, pero no su concentración de forma precisa. Utilizando nuestro método de obtención del fluido obtuvimos diferencias significativas entre la composición proteica del FO obtenido de los oviductos

ipsilaterales antes y después de la ovulación, coincidiendo con resultados previos descritos en bovino (Lamy et al., 2016; Mahé et al., 2022).

El análisis de enriquecimiento identificó 691 proteínas como únicas para la especie equina (*E. caballus*), de las cuales, el 54,3% pertenecían a la categoría de exosomas extracelulares, en concordancia con otro trabajo en el que se describe la proteómica del FO en bovino (Mahé et al., 2022). Los exosomas y las vesículas extracelulares provenientes del FO se han relacionado previamente con importantes funciones tanto en la fecundación, regulando la interacción de ambos gametos, como en el desarrollo embrionario temprano (Machtinger et al., 2015). Diferentes estudios han demostrado que la adición de vesículas extracelulares provenientes del FO a los medios de fecundación puede suponer ciertas ventajas mejorando el desarrollo y la calidad embrionaria en bovino (Asaadi et al., 2021), reduciendo la poliespermia e incrementando la tasa de embriones porcinos producidos *in vitro* (Alcântara-Neto et al., 2020). Recientemente se ha descrito el cultivo de células del oviducto para aislar vesículas extracelulares. Estas vesículas cuando se añaden a los medios de FIV convencional incrementan las tasas de fecundación espermática hasta un 44% (Lange-Consiglio et al., 2022), siendo superiores a las publicadas hasta la fecha. Además, ya se ha demostrado en la especie felina que las proteínas incluidas en estas vesículas extracelulares tienen un importante papel en la función espermática y en la fecundación, interactuando directamente con el espermatozoide (Ferraz et al., 2019). En base a esto y teniendo en cuenta que más del 50% de las proteínas identificadas en nuestro trabajo forman parte de las vesículas extracelulares (Machtinger et al., 2015), sugerimos que la mayoría de estas proteínas podrían tener un importante papel regulador en las funciones descritas anteriormente en la especie equina.

La segunda categoría obtenida en el análisis del enriquecimiento mostró que el 28,9% de las proteínas fueron de origen citoplasmático, en concordancia con otros trabajos que describen que entre 13 – 27% del total de las proteínas encontradas se engloban dentro de esta

misma categoría (Saint-Dizier et al., 2019). En la actualidad existe un gran debate sobre el verdadero origen de estas proteínas oviductales, pudiendo estar relacionado con la destrucción de células epiteliales durante la extracción del FO o más probablemente haber sido secretadas mediante una vía apocrina o a partir de otros mecanismo más desconocidos (Binelli et al., 2018; Saint-Dizier et al., 2014). Resulta interesante que del total de las proteínas de origen citoplasmático encontradas en nuestro trabajo, el 55.5% también aparecen recogidas dentro de la categoría de vesículas extracelulares, habiéndose descrito previamente el origen exosomal de estas proteínas citoplasmáticas (Saint-Dizier et al., 2014). Prestando atención al origen de estas proteínas, es probable que lleven a cabo su función en gametos y embriones, a través de las vesículas extracelulares que las portan.

El análisis de *Reactome* mostró un gran número de proteínas identificadas con mayor abundancia en el FO post-ovulatorio, de las cuales 87 fueron incluidas dentro del metabolismo proteico y 56 en desarrollo biológico, lo cual revela un recambio de proteínas intenso durante el desarrollo embrionario temprano en la especie equina, en concordancia con otras especies (Van Winkle, 2001). En cuanto a las proteínas encontradas en menor abundancia en el FO post-ovulatorio, 8 de ellas destacaron por encima de las demás por su nivel de significación (FDR < 0.01) y por ello serán comentadas a continuación.

En primer lugar, la proteína de unión a ácidos grasos 3 (del inglés: *fatty acid binding protein 3*, *FABP3*) tiene como principal función unirse a cadenas largas de ácidos grasos para poder transportarlos al interior de las células o hacia el espacio intracelular, libre o dentro de vesículas extracelulares (Hotamisligil & Bernlohr, 2015). Anteriormente se ha mencionado la importancia del metabolismo lipídico como productor de energía en los ovocitos y las grandes diferencias que existen entre especies (Dalbies-Tran et al., 2020). De forma específica en el equino, se ha descrito que el ARN-m que codifica la expresión de esta proteína en los embriones producidos *in vitro* es menor que los generados *in vivo*, volviendo a poner de manifiesto la

importancia de los lípidos como fuente de energía, en este caso para el embrión durante la implantación (Smits et al., 2011). Sin embargo, la isoforma 3 de esta proteína, está involucrada en la acumulación aberrante de los lípidos en los ovocitos bovinos durante la MIV (del Collado et al., 2017) y se ha demostrado que la sobreexpresión del *FABP3* induce apoptosis en células cancerígenas cardíacas y embrionarias (Song et al., 2012). Nuestros resultados revelan una menor expresión de *FABP3* en el FO post-ovulatorio comparado con el FO pre-ovulatorio, y en base a esto y a lo descrito anteriormente, sugerimos que debe existir una fina regulación de la expresión de esta proteína para que lleve a cabo su función reguladora sobre el metabolismo lipídico, sin llegar a inducir un efecto lipotóxico. Esta regulación puede venir modulada por el oviducto, ya que se ha demostrado que en células oviductales porcinas cultivadas *in vitro* existe una modificación de la expresión del ARN-m de *FABP3* durante el cultivo, poniendo de manifiesto la capacidad del oviducto para modular el metabolismo de los ácidos grasos, favoreciendo la calidad y supervivencia de los embriones tempranos (Budna et al., 2018).

En cuanto a la glutamina-fructosa 6 fosfato aminotransferasa (del inglés: *glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase 1, GFPT1*), esta proteína tiene una función determinante en la producción de ácido hialurónico, través del control del flujo de la glucosa en la vía de las hexosaminas (Collado-Fernandez et al., 2012). Se ha demostrado que esta proteína se sobre-expresa en las células del cúmulo de ovocitos equinos madurados *in vivo* en comparación con los madurados *in vitro*, pudiendo explicarse la evidente expansión de las células del cúmulo observada en los ovocitos producidos *in vivo* (Walter et al., 2019). Por otro lado, en la especie porcina se ha demostrado que el ácido hialurónico oviductal modula la capacitación espermática durante el periodo pre-ovulatorio retrasándola hasta el momento de la fecundación, manteniendo la supervivencia de los espermatozoide hasta los momentos próximos a la ovulación (Rodríguez-Martinez et al., 2016). Este puede ser el motivo por el cual observamos una menor expresión de esta proteína en el FO post-ovulatorio.

Volviendo al metabolismo energético de los ovocitos, la lactato deshidrogenasa B (del inglés: *lactate dehydrogenase B, LADHB*) participa en la síntesis de lactato a partir del piruvato. Como se ha explicado anteriormente, este metabolito tiene una gran importancia en el metabolismo energético tanto de ovocitos como de espermatozoides, siendo clave en la maduración de gametos y en la posterior fecundación (Darr et al., 2016; González-Fernández et al., 2018, 2020). Se ha demostrado que los ovocitos equinos, a diferencia de en otras especies, consumen energía durante la maduración de forma mayoritaria a través de la vía de la glucólisis aerobia en la cual el lactato tiene una importante función como fuente de energía y no como subproducto (Lewis, Hinrichs, Leese, McG. Argo, et al., 2020). Por otro lado, se ha demostrado de forma específica en el semental, que el lactato y el piruvato son los principales sustratos metabólicos necesarios para conseguir una adecuada funcionalidad mitocondrial o motilidad en los espermatozoides, estando asociados con un incremento de la fertilidad (Darr et al., 2016). Nuestros resultados podrían estar relacionados con los requerimientos específicos de piruvato y lactato de los gametos equinos durante la capacitación y la fecundación. Otra proteína con un importante papel en los últimos eventos previos a la fecundación es la clusterina (del inglés: *clusterin, CLU*). Esta proteína ha sido encontrada previamente en el fluido oviductal equino (Smits et al., 2017) y se ha demostrado su importante papel regulador en la capacitación espermática en ratón y conejo, aumentado su expresión en la mezcla de espermatozoide y FO recuperado del oviducto 4 h post-inseminación durante el periodo pre-ovulatorio (Yu et al., 2019). Además, también en ratón se ha demostrado que esta proteína cambia su localización en los espermatozoides durante la capacitación, habiéndose descrito un patrón específico de localización en la cabeza de los espermatozoides capacitados (Saewu et al., 2017). Es por tanto que proponemos que esta proteína podría sustentar los últimos cambios que el espermatozoide sufre en el oviducto equino tal y como se ha demostrado que sucede en conejos (Steinberger et al., 2017).

La glucagón S transferasa Mu 3 (del inglés: *Glutathione S-transferase Mu 3, GSTM3*) es una enzima con capacidad antioxidante presente en el FO, la cual también ha sido encontrada en fluido uterino de yeguas preñadas y no preñadas (Smits et al., 2018). Al igual que en nuestro trabajo, la concentración de esta proteína fue menor en el FO post-ovulatorio de ovejas comparado con el pre-ovulatorio (Soleilhavoup et al., 2016). Además, esta proteína se ha localizado en la superficie de la membrana de los espermatozoides de cabra y se le ha atribuido un importante papel regulador como proteína de unión a la ZP (Hemachand et al., 2002). Por otro lado, la transgelina 2, (del inglés: *transgelin 2, TAGLN2*) pertenece a una familia que participa en la estabilización del citoesqueleto de actina y se ha descrito su papel central en la implantación embrionaria en ratón (Liang et al., 2019). Sin embargo, teniendo en cuenta que en nuestro trabajo el FO post-ovulatorio se ha encontrado a una menor concentración y que la inmovilización embrionaria se produce alrededor del día 16 post-fecundación en caballo, no coincidiendo el proceso con la implantación que ocurre en la especie murina, es poco probable que en la especie equina esté relacionada con esta función como se ha descrito en ratón. Sin embargo, es posible que tenga un papel regulador en eventos previos a la ovulación, ya que se ha descrito su implicación en la polimerización de actina que sucede durante la capacitación espermática, así como la despolarización que debe suceder de forma previa a la RA y necesaria para que las membranas acrosómicas se acerquen y fusionen (Breitbart et al., 2005). Aunque existe la posibilidad de que esté llevando a cabo otro papel, lo que debe ser estudiado en profundidad.

La nucleótido difosfato quinasa B, (del inglés: *nucleoside diphosphate kinase B, NME2*) juega un papel en la síntesis de nucleósidos trifosfatos como la adenosin trifosfato, entre otros (Puts et al., 2018). En el FO bovino pre-ovulatorio ha sido descrita como una de las proteínas más abundantes (Lamy et al., 2016), sin embargo, su papel en la regulación de la interacción de los gametos en la fecundación requiere futuras investigaciones. La última proteína que disminuye en el FO post-ovulatorio de la que vamos a hablar es la aminoacilasa 1 (del inglés:

aminoacylase 1, ACY1) que se trata de un enzima de unión de zinc que interviene en la hidrólisis de proteínas N-acetiladas. Las aminocidas actúan reciclado los aminoácidos libres que se generan tras la degradación de las proteínas y en concreto la *ACY1* presenta una alta especificidad de sustrato (Sommer et al., 2011). El metabolismo de los aminoácidos es crucial para el desarrollo embrionario, habiéndose demostrado que se produce un recambio de aminoácidos diferente en los medio de cultivo de embriones humanos que resultan en una preñez clínica en comparación con los que dan lugar a reabsorciones (Gardner & Wale, 2013). Sin embargo, una vez más, la función específica como componente del FO equino no está clara actualmente.

En cuanto a las proteínas que presenta una mayor abundancia en el FO post-ovulatorio, la secretoglobina (del inglés: *secretoglobin SCGB1A1*) mostró la mayor diferencia, estos resultados coinciden con un aumento significativo de la presencia de esta proteína en el FO post-ovulatorio ipsilateral de yeguas preñadas (Smits et al., 2017). La *SCGB1A1*, junto con otra similar (*SCGB1D2*), la cual fue encontrada más abundante en el FO humano próxima a la fase luteal (Hess et al., 2013), se han asociado con funciones anti-inflamatorias, inmunomoduladoras, anti-quimiotácticas y estimuladoras del crecimiento embrionario (Smits et al., 2017). Otra proteína identificada en nuestro trabajo fue la *versican (VCAN)*, la cual promueve el movimiento celular y la migración, sugiriendo que en el ambiente oviductal post-ovulatorio podría estar involucrada en la migración del embrión hacia el útero (Onken et al., 2014; Ricciardelli et al., 2007). Por otra parte, la miosina de cadena pesada 9 (del inglés: *myosin heavy chain 9, MYH9*) demostró estar sobre-expresada en el FO bovino post-ovulatorio incubado con semen, demostrando su papel como proteína específica de interacción con el espermatozoide, además de sugerir que junto con otras proteínas oviductales podría tener un papel en la modulación de la capacitación espermática (Lamy, Nogues, et al., 2018).

Si nos fijamos en las proteínas más abundantes y englobadas dentro de la categoría de la fecundación, ya se ha demostrado que algunas moléculas involucradas en funciones como la interacción o unión entre los gametos, no solo están expresadas en el ovocito y/o en el espermatozoide, sino que se pueden encontrar en el FO. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos que sugieren que estas proteínas son necesarias para distribuir y ensamblar complejos multiproteicos en la superficie de los gametos antes de que interactúen entre sí (Bernabò et al., 2014; Bromfield & Nixon, 2013).

Resulta complejo conocer la función exacta de todas las proteínas descritas y su papel en los eventos que suceden alrededor del momento de la fecundación. Sin embargo, las aproximaciones descriptivas como el presente estudio son el primer paso para comprender más acerca de la fisiología de la fecundación en el oviducto equino.

En el tercer trabajo presentado en esta Tesis Doctoral nos planteamos si los metabolitos oviductales descritos por González-Fernández y colaboradores (2020) podrían tener algún papel clave en la función espermática equina. Por ello, se evaluó el efecto de algunos metabolitos en el rango de concentraciones encontradas en el FO post-ovulatorio (González-Fernández et al., 2020) en los espermatozoides equinos descongelados. Los metabolitos seleccionados fueron el mioinositol, lactato, glicina, β -alanina e histamina y se valoró el efecto en diferentes parámetros: motilidad espermática, viabilidad, potencial de membrana mitocondrial, RA, EROs y en la inducción de la PY.

El primer metabolito valorado fue el mioinositol, el cual es producido por las células de Sertoli (Condorelli et al., 2017). Este metabolito tiene efectos antioxidantes así como un importante papel en la regulación del calcio intracelular en el espermatozoide (Barbagallo et al., 2020). Además, se ha sugerido que el mioinositol podría tener un papel importante en la fertilidad equina, ya que en el transcriptoma de sementales fértiles se encontró un aumento significativo de proteínas relacionadas con el metabolismo del mismo comparado con

sementales subfértiles (Suliman et al., 2018). Sin embargo, se han publicado estudios previos añadiendo este metabolito al semen equino refrigerado, con unos resultados similares a los nuestros (Affonso et al., 2017).

Previamente, hemos comentado la relevancia del lactato como fuente de energía tanto del ovocito como del espermatozoide, y se ha discutido la importancia de la elevada concentración encontrada en el FF pre-ovulatorio. Este mismo grupo de investigación ya demostró que tanto en el FO pre-ovulatorio como post-ovulatorio, el lactato es el metabolito presente en mayor concentración ($69,25 \pm 7,3$ mM) (González-Fernández et al., 2020). Sin embargo, a pesar de la presencia de elevadas concentraciones de lactato en ambos fluidos, en el primer trabajo en el que se publicó un protocolo repetible y exitoso de FIV convencional en équidos (Felix et al., 2022), en el medio usado tanto para la pre-capitación como para la co-incubación, la concentración de lactato es baja (10 mM). En nuestro trabajo, el lactato añadido a concentraciones entre 0 y 60 mM no afectó de forma significativa a ninguno de los parámetros analizados en el espermatozoide equino. Sin embargo, en un trabajo similar publicado de forma previa, las concentraciones elevadas de lactato (19,8 – 40 – 80 mM) ejercieron un efecto negativo en la motilidad y en la integridad del acrosoma del semen equino refrigerado (Hernández-Avilés et al., 2021). Las diferencias observadas en los diferentes estudios sugieren que, posiblemente, una elevada concentración de lactato no sea estrictamente necesaria para conseguir una adecuada preparación del espermatozoide, sin embargo, la presencia de una alta concentración en el ambiente próximo a la fecundación, podría tener una importante relevancia en dicho proceso.

Otros dos metabolitos, como la glicina y la β -alanina, encontrados en el FO también han sido estudiados en esta Tesis Doctoral. Estos metabolitos son responsables de la activación del receptor glicina/ Cl^- que induce la RA en espermatozoides de hombre, cerdo, ratón y hámster (Llanos et al., 2001; Sato et al., 2000). Sin embargo, en nuestro trabajo no observamos ningún

efecto al incubar estos metabolitos con los espermatozoides equinos en ninguno de los parámetros analizados.

El último metabolito analizado fue la histamina, que se ha relacionado con el control del aumento del calcio intracelular en espermatozoides humanos a dosis de 50 – 165 mM, ocasionando una pérdida de viabilidad (Gupta A, et al., 2004). Estas concentraciones son notablemente superiores a las descritas en el FO post-ovulatorio equino (0,08 – 0,37 mM) (González-Fernández et al., 2020) y a las usadas en nuestro trabajo (0 – 0,4 mM). Por otro lado, se ha propuesto que este metabolito está involucrado en la regulación de las contracciones de la musculatura lisa presente en la pared del oviducto, favoreciendo el avance de los espermatozoides (H. Leese et al., 2001).

En nuestras condiciones, los metabolitos analizados no causaron ningún efecto en los parámetros espermáticos analizados, ni siquiera un descenso de la viabilidad, por lo que no podemos descartar que estos metabolitos a otras concentraciones y/o de forma combinada puedan tener un importante papel en otros eventos relacionados con la capacitación y por tanto con la fecundación equina. Por otro lado, hay que tener en cuenta que en nuestro trabajo hemos utilizado semen congelado, pudiendo ser este un limitante en la falta de efectos. Es por ello que se debería analizar el efecto de estos metabolitos en semen fresco para conocer el verdadero papel de estos metabolitos presentes en el FO.

En el último trabajo de esta Tesis Doctoral, nos planteamos realizar ensayos de FIV convencional adicionando FO post-ovulatorio a una concentración de 0,125% (v/v) al medio de fecundación utilizando semen descongelado. Previamente, corroboramos que la inducción de la PY, descrita en semen fresco al adicionar FO post-ovulatorio (González-Fernández et al., 2020), ocurría en semen descongelado. Los resultados obtenidos mostraron una inducción variable de la PY en la cola del espermatozoide descongelado en presencia de FO, ya que fue observada en 2 de los 3 caballos analizados, al igual que ocurre en semen fresco. Sin embargo,

esta inducción de la *PY* no está asociada con la fecundación ya que al co-incubar los gametos en presencia de 0,125% de FO no observamos fecundación. En el trabajo de Félix y colaboradores (2022) asocian una inducción de *PY* en la pieza intermedia y en las regiones apical y ecuatorial del espermatozoide con una fecundación exitosa en la especie equina (Felix et al., 2022). Este trabajo, junto con los resultados obtenidos en nuestros ensayos de FIV sugieren que la inducción de la *PY* en la cola del espermatozoide no es un parámetro que debe ser utilizado para determinar una capacitación efectiva en el espermatozoide equino.

Para terminar, cabe destacar que en la presente Tesis Doctoral se ha conseguido avanzar en el conocimiento de la composición del ambiente reproductivo de la yegua, completando la caracterización metabolómica del fluido folicular y proteómica del fluido oviductal. El conocimiento aportado en esta Tesis Doctoral servirá para plantear nuevos trabajos, con el fin de mejorar la eficiencia de los procesos de fecundación *in vitro* en la especie equina.

Conclusiones

1. La composición metabólica del fluido folicular pre-ovulatorio equino difiere de la formulación actual de los medios comerciales de maduración *in vitro* equino. De los 22 metabolitos identificados en el fluido folicular, 9 no están presentes en los medios comerciales.
2. Existen diferencias significativas en la composición proteómica del fluido oviductal equino antes y después de la ovulación: 15 proteínas son menos abundantes y 156 son más abundantes en el fluido oviductal post-ovulatorio.
3. El análisis proteómico del fluido oviductal mostró que el 54,3% pertenecen a la categoría de exosomas extracelulares.
4. Los metabolitos presentes en el fluido oviductal post-ovulatorio: lactato, mioinositol, glicina, β -alanina e histamina no ejercen ningún efecto en los parámetros relacionados con la capacitación en los espermatozoides equinos descongelados.
5. La adición de 0,125% (v/v) de fluido oviductal post-ovulatorio al semen equino descongelado induce un aumento de fosforilación en residuos de tirosina no asociado a una fecundación exitosa.

Conclusions

1. The metabolic composition of equine pre-ovulatory follicular fluid differs from the current formulation of commercial equine *in vitro* maturation media. Among the 22 metabolites identified in follicular fluid, nine were not present in commercial media.
2. There are significant differences in the proteomic composition of equine oviductal fluid before and after ovulation: 15 proteins are downregulated and 156 are upregulated in post-ovulatory oviductal fluid.
3. The proteomic analysis of the oviductal fluid showed that 54.3% of the identified proteins belong to the category of extracellular exosomes.
4. The metabolites found in oviductal fluid: lactate, myoinositol, glycine, β -alanine and histamine exert no effect on capacitation-related parameters in thawed equine spermatozoa.
5. The addition of 0.125% (v/v) post-ovulatory equine oviductal fluid to thawed semen induces an increase in protein tyrosine phosphorylation not associated with successful fertilization.

Agradecimientos

Agradecer al matadero de INCARSA (Burgos) por las facilidades para la recogida de ovarios, fluido oviductal y folicular. Muchas gracias a todo el personal por el trato recibido y la amabilidad y sobre todo a los veterinarios Gerardo y Jesús, por estar siempre pendientes y facilitar de manera inmejorables nuestro trabajo en cada visita al matadero.

Agradecer a todo el Departamento Medicina Animal y al Hospital Clínico Veterinario por la oportunidad de poder trabajar, desarrollar mi tesis y seguir aprendiendo de clínica equina. Gracias a todo el equipo por la acogida a mi llegada y por la ayuda personal, profesional, y material desde el primer día.

Dar las gracias a todo el Grupo SINTREP, por facilitar el acceso al laboratorio, por la gran acogida dentro del grupo y por el continuo apoyo demostrado por todos sus integrantes desde mi llegada.

Gracias al CENSYRA de Badajoz por facilitar y poner a nuestra disposición con todas las facilidades posibles muestras de semen utilizado en los experimentos de estas Tesis.

A la Agencia Estatal de Investigación (AGL2017-84681-R y PID2020-112723RB-I00), el Banco Santander (Acción II Plan Propio de Investigación de la UEx) y la Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital de la Junta de Extremadura (Ref. IB20005) por haber facilitado la financiación para el desarrollo de la presente Tesis.



**Cofinanciado por
la Unión Europea**

JUNTA DE EXTREMADURA

Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital



Bibliografía

- Abdelrazik, H., Sharma, R., Mahfouz, R., & Agarwal, A. (2009). L-Carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertility and Sterility*, *91*(2), 589-596. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.11.067>
- Abels, E. R., & Breakefield, X. O. (2016). Introduction to extracellular vesicles: Biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *36*(3), 301-312. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>
- Affonso, F. J., Carvalho, H. F., Lançon, R., Lemes, K. M., Leite, T. G., Oliveira, L. Z., Celeghini, E. C. C., & de Arruda, R. P. (2017). Addition of antioxidants myoinositol, ferulic acid, and melatonin and their effects on sperm motility, membrane integrity, and reactive oxygen species production in cooled equine semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, *59*, 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.09.006>
- Aitken, R. J., & Drevet, J. R. (2020). The importance of oxidative stress in determining the functionality of mammalian spermatozoa: A two-edged sword. *Antioxidants*, *9*(2), 111. <https://doi.org/10.3390/antiox9020111>
- Alcântara-Neto, A. S., Fernandez-Rufete, M., Corbin, E., Tsikis, G., Uzbekov, R., Garanina, A. S., Coy, P., Almiñana, C., & Mermillod, P. (2020). Oviduct fluid extracellular vesicles regulate polyspermy during porcine in vitro fertilisation. *Reproduction, Fertility and Development*, *32*(4), 409. <https://doi.org/10.1071/RD19058>
- Aller, J. F., Callejas, S. S., & Alberio, R. H. (2013). Biochemical and steroid concentrations in follicular fluid and blood plasma in different follicular waves of the estrous cycle from normal and superovulated beef cows. *Animal Reproduction Science*, *142*(3-4), 113-120. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.09.009>
- Alm, H., Torner, H., Blottner, S., Nürnberg, G., & Kanitz, W. (2001). Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro

fertilization of horse oocytes. *Theriogenology*, 56(5), 817-829.

[https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00610-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00610-0)

Almiñana, C., Tsikis, G., Labas, V., Uzbekov, R., da Silveira, J. C., Bauersachs, S., & Mermillod, P.

(2018). Deciphering the oviductal extracellular vesicles content across the estrous cycle: Implications for the gametes-oviduct interactions and the environment of the potential embryo. *BMC Genomics*, 19(1), 622. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4982-5>

Alvarenga, M. A., Papa, F. O., & Ramires Neto, C. (2016). Advances in stallion semen

cryopreservation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 32(3), 521-530.

<https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.003>

Arduini, A., Mancinelli, G., Radatti, G. L., Dottori, S., Molajoni, F., & Ramsay, R. R. (1992). Role

of carnitine and carnitine palmitoyltransferase as integral components of the pathway for membrane phospholipid fatty acid turnover in intact human erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(18), 12673-12681.

Asaadi, A., Dolatabad, N. A., Atashi, H., Raes, A., Van Damme, P., Hoelker, M., Hendrix, A.,

Pascottini, O. B., Van Soom, A., Kafi, M., & Pavani, K. C. (2021). Extracellular vesicles from follicular and ampullary fluid isolated by density gradient ultracentrifugation improve bovine embryo development and quality. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 578. <https://doi.org/10.3390/ijms22020578>

Austin, C. R. (1952). The 'capacitation' of the mammalian sperm. *Nature*, 170(4321), 326-326.

<https://doi.org/10.1038/170326a0>

Avilés, M., Gutiérrez-Adán, A., & Coy, P. (2010). Oviductal secretions: Will they be key factors

for the future ARTs? *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 16(12), 896-906.

<https://doi.org/10.1093/molehr/gaq056>

Ballester, L., Romero-Aguirregomezcorta, J., Soriano-Úbeda, C., Matás, C., Romar, R., & Coy, P.

(2014). Timing of oviductal fluid collection, steroid concentrations, and sperm

- preservation method affect porcine in vitro fertilization efficiency. *Fertility and Sterility*, 102(6), 1762-1768.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.08.009>
- Barbagallo, F., La Vignera, S., Cannarella, R., Aversa, A., Calogero, A. E., & Condorelli, R. A. (2020). Evaluation of sperm mitochondrial function: A key organelle for sperm motility. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), 363. <https://doi.org/10.3390/jcm9020363>
- Barton, B. E., Herrera, G. G., Anamthathmakula, P., Rock, J. K., Willie, A. M., Harris, E. A., Takemaru, K.-I., & Winuthayanon, W. (2020). Roles of steroid hormones in oviductal function. *Reproduction*, 159(3), R125-R137. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0189>
- Bastos, N. M., Ferst, J. G., Goulart, R. S., & Coelho da Silveira, J. (2022). The role of the oviduct and extracellular vesicles during early embryo development in bovine. *Animal Reproduction*, 19(1), e20220015. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2022-0015>
- Batista, R. I. T. P., Moro, L. N., Corbin, E., Alminana, C., Souza-Fabjan, J. M. G., Freitas, V. J. de F., & Mermillod, P. (2021). Porcine oocyte preincubation in oviductal fluid flush before in vitro fertilization in the presence of oviductal epithelial cells improves monospermic zygote production. *Zygote*, 29(5), 350-357. <https://doi.org/10.1017/S0967199421000046>
- Bauersachs, S., Blum, H., Mallok, S., Wenigerkind, H., Rief, S., Prella, K., & Wolf, E. (2003). Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the postovulation Period: A transcriptomics approach. *Biology of Reproduction*, 68(4), 1170-1177. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010660>
- Baumber, J., Ball, B. A., Gravance, C. G., Medina, V., & Davies-Morel, M. C. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology*, 21(6), 895-902.

- Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J., & Meyers, S. A. (2003). Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*, 24(4), 621-628. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02714.x>
- Beg, M. A., & Bergfelt, D. R. (2011). Folliculogenesis. En A. O. McKinnon (Ed.), *Equine reproduction: Vol. Part III. The Mare* (2nd ed, pp. 2009-2018). Wiley-Blackwell.
- Belin, F., Goudet, G., Duchamp, G., & Gérard, N. (2000). Intrafollicular concentrations of steroids and steroidogenic enzymes in relation to follicular development in the mare. *Biology of Reproduction*, 62(5), 1335-1343. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.5.1335>
- Bernabò, N., Ordinelli, A., Di Agostino, R., Mattioli, M., & Barboni, B. (2014). Network analyses of sperm–egg recognition and binding: Ready to rethink fertility mechanisms? *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 18(12), 740-753. <https://doi.org/10.1089/omi.2014.0128>
- Binelli, M., Gonella-Diaza, A., Mesquita, F., & Membrive, C. (2018). Sex steroid-mediated control of oviductal function in cattle. *Biology*, 7(1), 15. <https://doi.org/10.3390/biology7010015>
- Blondin, P. (2015). *Status of embryo production in the world*. 12(3), 356-358.
- Boni, R., Gallo, A., & Cecchini, S. (2017). Kinetic activity, membrane mitochondrial potential, lipid peroxidation, intracellular pH and calcium of frozen/thawed bovine spermatozoa treated with metabolic enhancers. *Andrology*, 5(1), 133-145. <https://doi.org/10.1111/andr.12259>
- Breitbart, H., Cohen, G., & Rubinstein, S. (2005). Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction*, 129(3), 263-268. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00269>
- Bridges, T. S., Davidson, T. R., Chamberlain, C. S., Geisert, R. D., & Spicer, L. J. (2002). Changes in follicular fluid steroids, insulin-like growth factors (IGF) and IGF-binding protein

- concentration, and proteolytic activity during equine follicular development². *Journal of Animal Science*, 80(1), 179-190. <https://doi.org/10.2527/2002.801179x>
- Brinsko, S. P., & Blanchard, T. L. (Eds.). (2011). Reproductive anatomy of the mare. En *Manual of equine reproduction* (3rd ed, pp. 1-9). Mosby/Elsevier.
- Brom-de-Luna, J. G., Salgado, R. M., Felix, M. R., Canesin, H. S., Stefanovski, D., Diaw, M., & Hinrichs, K. (2021). Culture protocols for horse embryos after ICSI: Effect of myo-inositol and time of media change. *Animal Reproduction Science*, 233, 106819. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106819>
- Bromfield, E. G., & Nixon, B. (2013). The function of chaperone proteins in the assemblage of protein complexes involved in gamete adhesion and fusion processes. *Reproduction*, 145(2), R31-R42. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0316>
- Brück, I., Raun, K., Synnestvedt, B., & Greve, T. (1992). Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. *Equine Veterinary Journal*, 24(1), 58-59. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1992.tb02780.x>
- Bruemmer, J. E. (2011). Freezing epididymal spermatozoa. En A. O. McKinnon (Ed.), *Equine reproduction: Vol. Part IV. Assisted Reproductive Technologies (ART)* (2nd ed, pp. 2983-2986). Wiley-Blackwell.
- Budna, J., Celichowski, P., Knap, S., Jankowski, M., Magas, M., Nawrocki, M. J., Ramlau, P., Nowicki, A., Rojewska, M., Chermuła, B., Jeseta, M., Antosik, P., Bukowska, D., Bruska, M., Zabel, M., Nowicki, M., & Kempisty, B. (2018). Fatty acids related genes expression undergo substantial changes in porcine oviductal epithelial cells during long-term primary culture. *Medical Journal of Cell Biology*, 6(2), 39-47. <https://doi.org/10.2478/acb-2018-0008>
- Campbell, D. L., Douglas, L. W., & Ramge, J. C. (1979). Cannulation of the equine oviduct and chemical analysis of oviduct fluid. *Theriogenology*, 12(2), 47-59. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(79\)90009-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(79)90009-8)

- Carnevale, E. M., Coutinho da Silva, M. A., Panzani, D., Stokes, J. E., & Squires, E. L. (2005). Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. *Theriogenology*, *64*(3), 519-527.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.008>
- Chang, M. C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, *168*(4277), 697-698. <https://doi.org/10.1038/168697b0>
- Choi, Y.-H., & Hinrichs, K. (2011). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI). En A. O. McKinnon (Ed.), *Equine reproduction: Vol. Part III. The Mare*. (2nd ed, pp. 2948-2951). Wiley-Blackwell.
- Choi, Y.-H., Velez, I. C., Macías-García, B., Riera, F. L., Ballard, C. S., & Hinrichs, K. (2016). Effect of clinically-related factors on in vitro blastocyst development after equine ICSI. *Theriogenology*, *85*(7), 1289-1296.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.015>
- Claes, A., & Stout, T. A. E. (2022). Success rate in a clinical equine in vitro embryo production program. *Theriogenology*, *187*, 215-218.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.04.019>
- Collado-Fernandez, E., Picton, H. M., & Dumollard, R. (2012). Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *The International Journal of Developmental Biology*, *56*(10-11-12), 799-808. <https://doi.org/10.1387/ijdb.120140ec>
- Condorelli, R. A., La Vignera, S., Mongioì, L. M., Vitale, S. G., Laganà, A. S., Cimino, L., & Calogero, A. E. (2017). Myo-inositol as a male fertility molecule: Speed them up! *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *21*(2 Suppl), 30-35.
- Costermans, N. G. J., Soede, N. M., Blokland, M., Tricht, F., Keijer, J., Kemp, B., & Teerds, K. J. (2019). Steroid profile of porcine follicular fluid and blood serum: Relation with follicular development. *Physiological Reports*, *7*(24).
<https://doi.org/10.14814/phy2.14320>

- Coy, P., García-Vázquez, F. A., Visconti, P. E., & Avilés, M. (2012). Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction*, *144*(6), 649-660. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0279>
- Coy, P., & Yanagimachi, R. (2015). The common and species-specific roles of oviductal proteins in mammalian fertilization and embryo development. *BioScience*, *65*(10), 973-984. <https://doi.org/10.1093/biosci/biv119>
- Cuervo-Arango, J., Claes, A. N., & Stout, T. A. E. (2019). Mare and stallion effects on blastocyst production in a commercial equine ovum pick-up–intracytoplasmic sperm injection program. *Reproduction, Fertility and Development*, *31*(12), 1894. <https://doi.org/10.1071/RD19201>
- Curran, S., Urven, L., & Ginther, O. J. (1997). Distribution of putative primordial germ cells in equine embryos. *Equine Veterinary Journal*, *29*(S25), 72-76. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1997.tb05105.x>
- da Silveira, J. C., Veeramachaneni, D. N. R., Winger, Q. A., Carnevale, E. M., & Bouma, G. J. (2012). Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: A possible new form of cell communication within the ovarian follicle. *Biology of Reproduction*, *86*(3), 71. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.093252>
- Dalbies-Tran, R., Cadoret, V., Desmarchais, A., Elis, S., Maillard, V., Monget, P., Monniaux, D., Reynaud, K., Saint-Dizier, M., & Uzbekova, S. (2020). A comparative analysis of oocyte development in mammals. *Cells*, *9*(4), E1002. <https://doi.org/10.3390/cells9041002>
- Darr, C. R., Varner, D. D., Teague, S., Cortopassi, G. A., Datta, S., & Meyers, S. A. (2016). Lactate and pyruvate are major sources of energy for stallion sperm with dose effects on mitochondrial function, motility and ROS production. *Biology of Reproduction*, *95*(2), 34. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.140707>
- Davies Morel, M. C. G., Newcombe, J. R., & Hayward, K. (2010). Factors affecting pre-ovulatory follicle diameter in the mare: The effect of mare age, season and presence of other

ovulatory follicles (multiple ovulation). *Theriogenology*, 74(7), 1241-1247.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.05.027>

de Andrade, A. F. C., Arruda, R. P., Torres, M. A., Pieri, N. C. G., Leite, T. G., Celeghini, E. C. C.,

Oliveira, L. Z., Gardés, T. P., Bussiere, M. C. C., & Silva, D. F. (2018). Nitric oxide in frozen-thawed equine sperm: Effects on motility, membrane integrity and sperm capacitation. *Animal Reproduction Science*, 195, 176-184.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.05.022>

del Collado, M., da Silveira, J. C., Sangalli, J. R., Andrade, G. M., Sousa, L. R. da S., Silva, L. A.,

Meirelles, F. V., & Perecin, F. (2017). Fatty acid binding protein 3 And transzonal projections are involved in lipid accumulation during in vitro maturation of bovine oocytes. *Scientific Reports*, 7(1), 2645. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02467-9>

Dell'Aquila, M. E., Cho, Y. S., Minoia, P., Traina, V., Lacalandra, G. M., & Maritato, F. (1997).

Effects of follicular fluid supplementation of in-vitro maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 12(12), 2766-2772. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.12.2766>

Demarco, I. A., Espinosa, F., Edwards, J., Sosnik, J., de la Vega-Beltrán, J. L., Hockensmith, J. W.,

Kopf, G. S., Darszon, A., & Visconti, P. E. (2003). Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 7001-7009. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206284200>

Douet, C., Parodi, O., Martino, N. A., Lacalandra, G. M., Nicassio, M., Reigner, F., Deleuze, S.,

Dell'Aquila, M. E., & Goudet, G. (2017). Exposure to follicular fluid during oocyte maturation and oviductal fluid during post-maturation does not improve *in vitro* embryo production in the horse. *Zygote*, 25(5), 612-630.

<https://doi.org/10.1017/S096719941700048X>

- Dutra, G. A., Ishak, G. M., Pechanova, O., Pechan, T., Peterson, D. G., Jacob, J. C. F., Willard, S. T., Ryan, P. L., Gastal, E. L., & Feugang, J. M. (2019). Seasonal variation in equine follicular fluid proteome. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *17*(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0473-z>
- Engle, C. C., & Foley, C. W. (1975). Certain physiochemical properties of uterine tubal fluid, follicular fluid, and blood plasma in the mare. *American Journal of Veterinary Research*, *36*(2), 149-154.
- Eppig, J. J., Wigglesworth, K., & Pendola, F. L. (2002). The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(5), 2890-2894. <https://doi.org/10.1073/pnas.052658699>
- Ezzati, M., Djahanbakhch, O., Arian, S., & Carr, B. R. (2014). Tubal transport of gametes and embryos: A review of physiology and pathophysiology. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *31*(10), 1337-1347. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0309-x>
- Fahiminiya, S., Labas, V., Roche, S., Dacheux, J.-L., & Gérard, N. (2011). Proteomic analysis of mare follicular fluid during late follicle development. *Proteome Science*, *9*(1), 54. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-9-54>
- Felix, M. R., Turner, R. M., Dobbie, T., & Hinrichs, K. (2022). Successful in vitro fertilization in the horse: Production of blastocysts and birth of foals after prolonged sperm incubation for capacitation. *Biology of Reproduction*, ioac172. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioac172>
- Ferraz, M. de A. M. M., Carothers, A., Dahal, R., Noonan, M. J., & Songsasen, N. (2019). Oviductal extracellular vesicles interact with the spermatozoon's head and mid-piece and improves its motility and fertilizing ability in the domestic cat. *Scientific Reports*, *9*(1), 9484. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45857-x>

- Ferrazza, R. de A., Garcia, H. D. M., Schmidt, E. M. dos S., Mihm Carmichael, M., Souza, F. F. de, Burchmore, R., Sartori, R., Eckersall, P. D., & Ferreira, J. C. P. (2017). Quantitative proteomic profiling of bovine follicular fluid during follicle development. *Biology of Reproduction*, *97*(6), 835-849. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox148>
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, *14*(5), 991-1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
- Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., & Navarro, P. A. A. S. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, *71*(5), 836-848. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.023>
- Foss, R., Ortis, H., & Hinrichs, K. (2013). Effect of potential oocyte transport protocols on blastocyst rates after intracytoplasmic sperm injection in the horse: Transport of equine oocytes for ICSI. *Equine Veterinary Journal*, *45*, 39-43. <https://doi.org/10.1111/evj.12159>
- Fu, Q., Huang, Y., Wang, Z., Chen, F., Huang, D., Lu, Y., Liang, X., & Zhang, M. (2016). Proteome profile and quantitative proteomic analysis of buffalo (*Bubalus bubalis*) follicular fluid during follicle development. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(5), 618. <https://doi.org/10.3390/ijms17050618>
- Fulka, J., & Okolski, A. (1981). Culture of horse oocytes in vitro. *Reproduction*, *61*(1), 213-215. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0610213>
- Gabryś, J., Kij-Mitka, B., Sawicki, S., Kochan, J., Nowak, A., Łojko, J., Karnas, E., & Bugno-Poniewierska, M. (2022). Extracellular vesicles from follicular fluid may improve the nuclear maturation rate of in vitro matured mare oocytes. *Theriogenology*, *188*, 116-124. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.05.022>

- Gadella, B. M., & Harrison, R. A. P. (2002). Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biology of Reproduction*, *67*(1), 340-350. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.1.340>
- Gadella, B. M., Rathi, R., Brouwers, J. F. H. M., Stout, T. A. E., & Colenbrander, B. (2001). Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*, *68*(3-4), 249-265. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00161-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00161-0)
- Gadella, B. M., & van Gestel, R. A. (2004). Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Animal Reproduction Science*, *82-83*, 307-319. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.030>
- Galli, C., Colleoni, S., Duchi, R., Lagutina, I., & Lazzari, G. (2007). Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science*, *98*(1-2), 39-55. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.011>
- Galli, C., Colleoni, S., Lagutina, I., & Lazzari, G. (2013). Equine assisted reproduction and embryo technologies. *Animal Reproduction*, *10*, 334-343.
- Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R., & Lazzari, G. (2001). Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, *55*(6), 1341-1357. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00486-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00486-1)
- Gardner, D. K., & Wale, P. L. (2013). Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertility and Sterility*, *99*(4), 1062-1072. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.12.004>
- Gastal, E. L., Aguiar, F. L. N., Gastal, G. D. A., Alves, K. A., Alves, B. G., & Figueiredo, J. R. (2020). Harvesting, processing, and evaluation of in vitro-manipulated equine preantral

- follicles: A review. *Theriogenology*, *156*, 283-295.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.044>
- Gatien, J., Mermillod, P., Tsikis, G., Bernardi, O., Janati Idrissi, S., Uzbekov, R., Le Bourhis, D., Salvetti, P., Almiñana, C., & Saint-Dizier, M. (2019). Metabolomic profile of oviductal extracellular vesicles across the estrous cycle in cattle. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(24), 6339. <https://doi.org/10.3390/ijms20246339>
- Gérard, N., Fahiminiya, S., Grupen, C. G., & Nadal-Desbarats, L. (2015). Reproductive physiology and ovarian folliculogenesis examined via H-NMR metabolomics signatures: A comparative study of large and small follicles in three mammalian species (*Bos taurus*, *Sus scrofa domestica* and *Equus ferus caballus*). *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, *19*(1), 31-40. <https://doi.org/10.1089/omi.2014.0097>
- Gerard, N., Loiseau, S., Duchamp, G., & Seguin, F. (2002). Analysis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in the mare using proton nuclear magnetic resonance (1H NMR). *Reproduction*, 241-248.
<https://doi.org/10.1530/rep.0.1240241>
- Gerard, N., Pradres, I., Couty, M., Labberté, M., Daels, P., & Duchamp, G. (2000). *Concentrations of glucose, pyruvate and lactate in relation to follicular growth, preovulatory maturation and oocyte nuclear maturation stage in the mare*. *53*, 372.
- Gervasi, M. G., & Visconti, P. E. (2016). Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective. *Molecular Reproduction and Development*, *83*(10), 860-874.
<https://doi.org/10.1002/mrd.22663>
- Gibb, Z., Lambourne, S. R., & Aitken, R. J. (2014). The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. *Biology of Reproduction*, *91*(3).
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.118539>
- Gimeno, B. F., Bariani, M. V., Laiz-Quiroga, L., Martínez-León, E., Von-Meyeren, M., Rey, O., Mutto, A. Á., & Osycka-Salut, C. E. (2021). Effects of in vitro interactions of oviduct

- epithelial cells with frozen–thawed stallion spermatozoa on their motility, viability and capacitation status. *Animals*, *11*(1), 74. <https://doi.org/10.3390/ani11010074>
- Ginther, O. J. (1988). Ultrasonic imaging of equine ovarian follicles and corpora lutea. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, *4*(2), 197-213. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30636-3](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30636-3)
- Gonzalez-Castro, R. A., & Carnevale, E. M. (2018). Association of equine sperm population parameters with outcome of intracytoplasmic sperm injections. *Theriogenology*, *119*, 114-120. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.06.027>
- González-Fernández, L., Macedo, S., Lopes, J., Rocha, A., & Macías-García, B. (2015). Effect of different media and protein source on equine gametes: Potential impact during in vitro fertilization. *Reproduction in Domestic Animals*, *50*(6), 1039-1046. <https://doi.org/10.1111/rda.12634>
- Gonzalez-Fernandez, L., Macias-Garcia, B., Loux, S. C., Varner, D. D., & Hinrichs, K. (2013). Focal adhesion kinases and calcium/calmodulin-dependent protein kinases regulate protein tyrosine phosphorylation in stallion sperm. *Biology of Reproduction*, *88*(6), 138-138. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.107078>
- González-Fernández, L., Macías-García, B., Velez, I. C., Varner, D. D., & Hinrichs, K. (2012). Calcium–calmodulin and pH regulate protein tyrosine phosphorylation in stallion sperm. *Reproduction*, *144*(4), 411-422. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0067>
- González-Fernández, L., Sánchez-Calabuig, M. J., Alves, M. G., Oliveira, P. F., Macedo, S., Gutiérrez-Adán, A., Rocha, A., & Macías-García, B. (2018). Expanded equine cumulus–oocyte complexes exhibit higher meiotic competence and lower glucose consumption than compact cumulus–oocyte complexes. *Reproduction, Fertility and Development*, *30*(2), 297. <https://doi.org/10.1071/RD16441>
- González-Fernández, L., Sánchez-Calabuig, M. J., Calle-Guisado, V., García-Marín, L. J., Bragado, M. J., Fernández-Hernández, P., Gutiérrez-Adán, A., & Macías-García, B. (2020). Stage-

specific metabolomic changes in equine oviductal fluid: New insights into the equine fertilization environment. *Theriogenology*, 143, 35-43.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.035>

Governini, L., Ponchia, R., Artini, P. G., Casarosa, E., Marzi, I., Capaldo, A., Luddi, A., & Piomboni, P. (2020). Respiratory mitochondrial efficiency and DNA oxidation in human sperm after in vitro myo-inositol treatment. *Journal of Clinical Medicine*, 9(6), 1638.

<https://doi.org/10.3390/jcm9061638>

Graham, J. K. (1996). Methods for induction of capacitation and the acrosome reaction of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 12(1), 111-117. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30298-5](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30298-5)

Grøndahl, C. (2008). Oocyte maturation. Basic and clinical aspects of in vitro maturation (IVM) with special emphasis of the role of FF-MAS. *Danish Medical Bulletin*, 55(1), 1-16.

Gu, L., Liu, H., Gu, X., Boots, C., Moley, K. H., & Wang, Q. (2015). Metabolic control of oocyte development: Linking maternal nutrition and reproductive outcomes. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 72(2), 251-271. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1739-4>

Gupta A, Khosla R, Gupta S, & Tiwary AK. (2004). Influence of histamine and H1- receptor antagonists on ejaculated human spermatozoa: Role of intrasperm Ca²⁺. *Indian J Exp Biol*, 42, 481-485.

Hamel, M., Dufort, I., Robert, C., Gravel, C., Leveille, M.-C., Leader, A., & Sirard, M.-A. (2008). Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 23(5), 1118-1127.

<https://doi.org/10.1093/humrep/den048>

Harper, C. V., Barratt, C. L. R., Publicover, S. J., & Kirkman-Brown, J. C. (2006). Kinetics of the progesterone-induced acrosome reaction and its relation to intracellular calcium

- responses in individual human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 75(6), 933-939.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.054627>
- Harris, E. A., Stephens, K. K., & Winuthayanon, W. (2020). Extracellular vesicles and the oviduct function. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8280.
<https://doi.org/10.3390/ijms21218280>
- Harrison, R. (1996). Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reproduction, Fertility and Development*, 8(4), 581.
<https://doi.org/10.1071/RD9960581>
- Hawley, L. R., Enders, A. C., & Hinrichs, K. (1995). Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. *Biology of Reproduction*, 52(monograph_series1), 243-252.
https://doi.org/10.1093/biolreprod/52.monograph_series1.243
- Hemachand, T., Gopalakrishnan, B., Salunke, D. M., Totey, S. M., & Shaha, C. (2002). Sperm plasma-membrane-associated glutathione S-transferases as gamete recognition molecules. *Journal of Cell Science*, 115(10), 2053-2065.
<https://doi.org/10.1242/jcs.115.10.2053>
- Hemmings, K. E., Maruthini, D., Vyjayanthi, S., Hogg, J. E., Balen, A. H., Campbell, B. K., Leese, H. J., & Picton, H. M. (2013). Amino acid turnover by human oocytes is influenced by gamete developmental competence, patient characteristics and gonadotrophin treatment. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 28(4), 1031-1044.
<https://doi.org/10.1093/humrep/des458>
- Hernández-Avilés, C., Ramírez-Agámez, L., Love, C. C., Friedrich, M., Pearson, M., Kelley, D. E., Beckham, A. M. N., Teague, S. R., LaCaze, K. A., Brinsko, S. P., & Varner, D. D. (2021). The effects of metabolic substrates glucose, pyruvate, and lactate added to a skim milk-based semen extender for cooled storage of stallion sperm. *Theriogenology*, 161, 83-97. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.11.017>

- Hess, A. P., Talbi, S., Hamilton, A. E., Baston-Buest, D. M., Nyegaard, M., Irwin, J. C., Barragan, F., Kruessel, J. S., Germeyer, A., & Giudice, L. C. (2013). The human oviduct transcriptome reveals an anti-inflammatory, anti-angiogenic, secretory and matrix-stable environment during embryo transit. *Reproductive BioMedicine Online*, 27(4), 423-435. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.06.013>
- Hinrichs, K. (2010). The equine oocyte: Factors affecting meiotic and developmental competence. *Molecular Reproduction and Development*, 77(8), 651-661. <https://doi.org/10.1002/mrd.21186>
- Hinrichs, K. (2013). Assisted reproduction techniques in the horse. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(1), 80. <https://doi.org/10.1071/RD12263>
- Hinrichs, K. (2018). Assisted reproductive techniques in mares. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 53 Suppl 2, 4-13. <https://doi.org/10.1111/rda.13259>
- Hinrichs, K. (2020). Advances in holding and cryopreservation of equine oocytes and embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, 89, 102990. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.102990>
- Hinrichs, K., & Loux, S. C. (2012). Hyperactivated sperm motility: Are equine sperm different? *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(8), 441-444. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.05.070>
- Hinrichs, K., Love, C. C., Brinsko, S. P., Choi, Y. H., & Varner, D. D. (2002). In Vitro fertilization of in vitro-matured equine oocytes: Effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment and comparison with rates of fertilization in vivo after oviductal transfer. *Biology of Reproduction*, 67(1), 256-262. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.1.256>
- Hotamisligil, G. S., & Bernlohr, D. A. (2015). Metabolic functions of FABPs—Mechanisms and therapeutic implications. *Nature Reviews. Endocrinology*, 11(10), 592-605. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.122>

- Hugentobler, S. A., Diskin, M. G., Leese, H. J., Humpherson, P. G., Watson, T., Sreenan, J. M., & Morris, D. G. (2007). Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine. *Molecular Reproduction and Development*, *74*(4), 445-454. <https://doi.org/10.1002/mrd.20607>
- Hugentobler, S. A., Morris, D. G., Sreenan, J. M., & Diskin, M. G. (2007). Ion concentrations in oviduct and uterine fluid and blood serum during the estrous cycle in the bovine. *Theriogenology*, *68*(4), 538-548. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.049>
- Hugentobler, S. A., Sreenan, J. M., Humpherson, P. G., Leese, H. J., Diskin, M. G., & Morris, D. G. (2010). Effects of changes in the concentration of systemic progesterone on ions, amino acids and energy substrates in cattle oviduct and uterine fluid and blood. *Reproduction, Fertility and Development*, *22*(4), 684. <https://doi.org/10.1071/RD09129>
- Hugentobler, S., Morris, D. G., Kane, M. T., & Sreenan, J. M. (2004). In situ oviduct and uterine pH in cattle. *Theriogenology*, *61*(7-8), 1419-1427. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.08.008>
- Hunter, R. H. F. (2012). Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *87*(1), 244-255. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2011.00196.x>
- Ireland, J. J., & Roche, J. F. (1983). Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: Changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. *Journal of Animal Science*, *57*(1), 157-167. <https://doi.org/10.2527/jas1983.571157x>
- Jacobson, C. C., Choi, Y.-H., Hayden, S. S., & Hinrichs, K. (2010). Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, *73*(8), 1116-1126. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.01.013>

- Jaiswal, B. S., & Conti, M. (2003). Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(19), 10676-10681. <https://doi.org/10.1073/pnas.1831008100>
- Joncquel-Chevalier Curt, M., Voicu, P.-M., Fontaine, M., Dessein, A.-F., Porchet, N., Mention-Mulliez, K., Dobbelaere, D., Soto-Ares, G., Cheillan, D., & Vamecq, J. (2015). Creatine biosynthesis and transport in health and disease. *Biochimie*, *119*, 146-165. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.10.022>
- Killian, G. J. (2004). Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Animal Reproduction Science*, *82-83*, 141-153. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.028>
- La Spina, F. A., Puga Molina, L. C., Romarowski, A., Vitale, A. M., Falzone, T. L., Krapf, D., Hirohashi, N., & Buffone, M. G. (2016). Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Developmental Biology*, *411*(2), 172-182. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.02.006>
- Lamirande, E. de, Eiley, D., & Gagnon, C. (1993). Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. *International Journal of Andrology*, *16*(4), 258-266. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1993.tb01189.x>
- Lamy, J., Gatien, J., Dubuisson, F., Nadal-Desbarats, L., Salvetti, P., Mermillod, P., & Saint-Dizier, M. (2018). Metabolomic profiling of bovine oviductal fluid across the oestrous cycle using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Reproduction, Fertility and Development*, *30*(7), 1021. <https://doi.org/10.1071/RD17389>
- Lamy, J., Labas, V., Harichaux, G., Tsikis, G., Mermillod, P., & Saint-Dizier, M. (2016). Regulation of the bovine oviductal fluid proteome. *Reproduction*, *152*(6), 629-644. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0397>

- Lamy, J., Nogues, P., Combes-Soia, L., Tsikis, G., Labas, V., Mermillod, P., Druart, X., & Saint-Dizier, M. (2018). Identification by proteomics of oviductal sperm-interacting proteins. *Reproduction*, *155*(5), 457-466. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0712>
- Lange-Consiglio, A., Capra, E., Giuliani, D., Canesi, S., Funghi, F., Bosi, G., Cretich, M., Frigerio, R., Galbiati, V., & Cremonesi, F. (2022). Endometrial and oviduct extra-cellular vesicles for in vitro equine sperm hyperactivation and oocyte fertilization. *Theriogenology*, *194*, 35-45. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.09.023>
- Lange-Consiglio, A., Corradetti, B., Perrini, C., Bizzaro, D., & Cremonesi, F. (2016). Leptin and leptin receptor are detectable in equine spermatozoa but are not involved in in vitro fertilisation. *Reproduction, Fertility and Development*, *28*(5), 574. <https://doi.org/10.1071/RD14130>
- Lazzari, G., Colleoni, S., Crotti, G., Turini, P., Fiorini, G., Barandalla, M., Landriscina, L., Dolci, G., Benedetti, M., Duchi, R., & Galli, C. (2020). Laboratory production of equine embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, *89*, 103097. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103097>
- Leemans, B., Gadella, B. M., Sostaric, E., Nelis, H., Stout, T. A. E., Hoogewijs, M., & Van Soom, A. (2014). Oviduct binding and elevated environmental pH induce protein tyrosine phosphorylation in stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction*, *91*(1). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.116418>
- Leemans, B., Gadella, B. M., Stout, T. A. E., De Schauwer, C., Nelis, H., Hoogewijs, M., & Van Soom, A. (2016). Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization. *Reproduction*, *152*(6), R233-R245. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0420>
- Leemans, B., Gadella, B. M., Stout, T. A. E., Heras, S., Smits, K., Ferrer-Buitrago, M., Claes, E., Heindryckx, B., De Vos, W. H., Nelis, H., Hoogewijs, M., & Van Soom, A. (2015).

- Procaine induces cytokinesis in horse oocytes via a pH-dependent mechanism. *Biology of Reproduction*, 93(1). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.127423>
- Leemans, B., Gadella, B. M., Stout, T. A. E., Nelis, H., Hoogewijs, M., & Van Soom, A. (2015). An alkaline follicular fluid fraction induces capacitation and limited release of oviduct epithelium-bound stallion sperm. *Reproduction*, 150(3), 193-208. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0178>
- Leemans, B., Stout, T. A. E., De Schauwer, C., Heras, S., Nelis, H., Hoogewijs, M., Van Soom, A., & Gadella, B. M. (2019). Update on mammalian sperm capacitation: How much does the horse differ from other species? *Reproduction*, 157(5), R181-R197. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0541>
- Leese, H. J., Hugentobler, S. A., Gray, S. M., Morris, D. G., Sturmey, R. G., Whitear, S.-L., & Sreenan, J. M. (2008). Female reproductive tract fluids: Composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(1), 1. <https://doi.org/10.1071/RD07153>
- Leese, H., Tay, J., Reischl, J., & Downing, S. (2001). Formation of fallopian tubal fluid: Role of a neglected epithelium. *Reproduction*, 339-346. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210339>
- Leroy, J. L. M. R., Vanholder, T., Delanghe, J. R., Opsomer, G., Van Soom, A., Bols, P. E. J., & de Kruif, A. (2004). Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 80(3-4), 201-211. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00173-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00173-8)
- Lewis, N., Hinrichs, K., Leese, H. J., McG. Argo, C., Brison, D. R., & Sturmey, R. (2020). Energy metabolism of the equine cumulus oocyte complex during in vitro maturation. *Scientific Reports*, 10(1), 3493. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60624-z>
- Lewis, N., Hinrichs, K., Leese, H. J., McGregor Argo, C., Brison, D. R., & Sturmey, R. G. (2020). Glucose concentration during equine in vitro maturation alters mitochondrial function.

- Reproduction (Cambridge, England)*, 160(2), 227-237. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0032>
- Li, J., Liu, L., Weng, J., Yin, T., Yang, J., & Feng, H. L. (2021). Biological roles of L-carnitine in oocyte and early embryo development. *Molecular Reproduction and Development*, 88(10), 673-685. <https://doi.org/10.1002/mrd.23542>
- Liang, X., Jin, Y., Wang, H., Meng, X., Tan, Z., Huang, T., & Fan, S. (2019). Transgelin 2 is required for embryo implantation by promoting actin polymerization. *The FASEB Journal*, 33(4), 5667-5675. <https://doi.org/10.1096/fj.201802158RRR>
- Lim, K. T., Jang, G., Ko, K. H., Lee, W. W., Park, H. J., Kim, J. J., Lee, S. H., Hwang, W. S., Lee, B. C., & Kang, S. K. (2007). Improved in vitro bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology*, 67(2), 293-302. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.011>
- Lindemann, C. B., & Lesich, K. A. (2010). Flagellar and ciliary beating: The proven and the possible. *Journal of Cell Science*, 123(4), 519-528. <https://doi.org/10.1242/jcs.051326>
- Llanos, M. N., Ronco, A. M., Aguirre, M. C., & Meizel, S. (2001). Hamster sperm glycine receptor: Evidence for its presence and involvement in the acrosome reaction. *Molecular Reproduction and Development*, 58(2), 205-215. [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200102\)58:2<205::AID-MRD10>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200102)58:2<205::AID-MRD10>3.0.CO;2-J)
- Loomis, P. R., & Graham, J. K. (2008). Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, 105(1-2), 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.010>
- López Tremoleda, J. (2003). *In vitro production of horse embryos: Fundamental aspects*. s.n.
- Loux, S. C., Crawford, K. R., Ing, N. H., González-Fernández, L., Macías-García, B., Love, C. C., Varner, D. D., Velez, I. C., Choi, Y. H., & Hinrichs, K. (2013). CatSper and the relationship

- of hyperactivated motility to intracellular calcium and pH kinetics in equine sperm. *Biology of Reproduction*, 89(5), 123. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.111708>
- Love, C. C. (1992). Semen collection techniques. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 8(1), 111-128. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30470-4](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30470-4)
- Machtinger, R., Laurent, L. C., & Baccarelli, A. A. (2015). Extracellular vesicles: Roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Human Reproduction Update*, dmv055. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv055>
- Macías-García, B., González-Fernández, L., Loux, S. C., Rocha, A. M., Guimarães, T., Peña, F. J., Varner, D. D., & Hinrichs, K. (2015). Effect of calcium, bicarbonate, and albumin on capacitation-related events in equine sperm. *Reproduction*, 149(1), 87-99. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0457>
- Mahé, C., Lavigne, R., Com, E., Pineau, C., Locatelli, Y., Zlotkowska, A. M., Almiñana, C., Tsikis, G., Mermillod, P., Schoen, J., & Saint-Dizier, M. (2022). Spatiotemporal profiling of the bovine oviduct fluid proteome around the time of ovulation. *Scientific Reports*, 12(1), 4135. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07929-3>
- Mahé, C., Zlotkowska, A. M., Reynaud, K., Tsikis, G., Mermillod, P., Druart, X., Schoen, J., & Saint-Dizier, M. (2021). Sperm migration, selection, survival, and fertilizing ability in the mammalian oviduct. *Biology of Reproduction*, 105(2), 317-331. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab105>
- Maillo, V., de Frutos, C., O'Gaora, P., Forde, N., Burns, G. W., Spencer, T. E., Gutierrez-Adan, A., Lonergan, P., & Rizos, D. (2016). Spatial differences in gene expression in the bovine oviduct. *Reproduction*, 152(1), 37-46. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0074>
- Maitan, P., Bromfield, E. G., Hoogendijk, R., Leung, M. R., Zeev-Ben-Mordehai, T., van de Lest, C. H., Jansen, J. W. A., Leemans, B., Guimarães, J. D., Stout, T. A. E., Gadella, B. M., & Henning, H. (2021). Bicarbonate-stimulated membrane reorganization in stallion

spermatozoa. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 772254.

<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.772254>

Maitan, P., Bromfield, E. G., Stout, T. A. E., Gadella, B. M., & Leemans, B. (2021). A stallion spermatozoon's journey through the mare's genital tract: In vivo and in vitro aspects of sperm capacitation. *Animal Reproduction Science*, 106848.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106848>

McCauley, T. C., Buhi, W. C., Wu, G. M., Mao, J., Caamaño, J. N., Didion, B. A., & Day, B. N. (2003). Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*, 69(3), 828-834.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.016444>

McPartlin, L. A., Littell, J., Mark, E., Nelson, J. L., Travis, A. J., & Bedford-Guaus, S. J. (2008). A defined medium supports changes consistent with capacitation in stallion sperm, as evidenced by increases in protein tyrosine phosphorylation and high rates of acrosomal exocytosis. *Theriogenology*, 69(5), 639-650.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.11.016>

McPartlin, L. A., Suarez, S. S., Czaya, C. A., Hinrichs, K., & Bedford-Guaus, S. J. (2009). Hyperactivation of stallion sperm is required for successful in vitro fertilization of equine oocytes. *Biology of Reproduction*, 81(1), 199-206.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.074880>

Ménézo, Y., Guérin, P., & Elder, K. (2015). The oviduct: A neglected organ due for re-assessment in IVF. *Reproductive BioMedicine Online*, 30(3), 233-240.

<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.11.011>

Meyers, S., Bulkeley, E., & Foutouhi, A. (2019). Sperm mitochondrial regulation in motility and fertility in horses. *Reproduction in Domestic Animals*, 54, 22-28.

<https://doi.org/10.1111/rda.13461>

- Mislej, B., Bucci, D., Malama, E., Bollwein, H., & Mari, G. (2020). Seasonal changes in ROS concentrations and sperm quality in unfrozen and frozen-thawed stallion semen. *Theriogenology*, *144*, 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.12.016>
- Moawad, A. R., Salama, A., Badr, M. R., & Fathi, M. (2021). Beneficial effects of L-carnitine supplementation during IVM of canine oocytes on their nuclear maturation and development in vitro. *Animals*, *11*(2), 581. <https://doi.org/10.3390/ani11020581>
- Montjean, D., Entezami, F., Lichtblau, I., Belloc, S., Gurgan, T., & Menezo, Y. (2012). Carnitine content in the follicular fluid and expression of the enzymes involved in beta oxidation in oocytes and cumulus cells. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *29*(11), 1221-1225. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9855-2>
- Moros-Nicolás, C., Douet, C., Reigner, F., & Goudet, G. (2019). Effect of cumulus cell removal and sperm pre-incubation with progesterone on in vitro fertilization of equine gametes in the presence of oviductal fluid or cells. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, *54*(8), 1095-1103. <https://doi.org/10.1111/rda.13479>
- Morris, L. H. A. (2018). The development of in vitro embryo production in the horse. *Equine Veterinary Journal*, *50*(6), 712-720. <https://doi.org/10.1111/evj.12839>
- Mugnier, S., Kervella, M., Douet, C., Canepa, S., Pascal, G., Deleuze, S., Duchamp, G., Monget, P., & Goudet, G. (2009). The secretions of oviduct epithelial cells increase the equine in vitro fertilization rate: Are osteopontin, atrial natriuretic peptide A and oviductin involved? *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, *7*, 129. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-129>
- Naito, K., Fukuda, Y., & Ishibashi, I. (1989). Developmental ability of porcine ova matured in porcine follicular fluid in vitro and fertilized in vitro. *Theriogenology*, *31*(5), 1049-1057. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(89\)90488-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(89)90488-3)
- Nandi, S., Girish Kumar, V., Manjunatha, B. M., Ramesh, H. S., & Gupta, P. S. P. (2008). Follicular fluid concentrations of glucose, lactate and pyruvate in buffalo and sheep,

- and their effects on cultured oocytes, granulosa and cumulus cells. *Theriogenology*, *69*(2), 186-196. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.036>
- Naz, R. K., & Rajesh, P. B. (2004). Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *2*(1), 75. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-75>
- Nelis, H., Vanden Bussche, J., Wojciechowicz, B., Franczak, A., Vanhaecke, L., Leemans, B., Cornillie, P., Peelman, L., Van Soom, A., & Smits, K. (2016). Steroids in the equine oviduct: Synthesis, local concentrations and receptor expression. *Reproduction, Fertility and Development*, *28*(9), 1390. <https://doi.org/10.1071/RD14483>
- Niederberger, C., Pellicer, A., Cohen, J., Gardner, D. K., Palermo, G. D., O'Neill, C. L., Chow, S., Rosenwaks, Z., Cobo, A., Swain, J. E., Schoolcraft, W. B., Frydman, R., Bishop, L. A., Aharon, D., Gordon, C., New, E., Decherney, A., Tan, S. L., Paulson, R. J., ... LaBarbera, A. R. (2018). Forty years of IVF. *Fertility and Sterility*, *110*(2), 185-324.e5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.06.005>
- Onken, J., Moeckel, S., Leukel, P., Leidgens, V., Baumann, F., Bogdahn, U., Vollmann-Zwerenz, A., & Hau, P. (2014). Versican isoform V1 regulates proliferation and migration in high-grade gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, *120*(1), 73-83. <https://doi.org/10.1007/s11060-014-1545-8>
- Orsi, N. M., Gopichandran, N., Leese, H. J., Picton, H. M., & Harris, S. E. (2005). Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. *Reproduction*, *129*(2), 219-228. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00460>
- Otani, T., Maruo, T., Yukimura, N., & Mochizuki, M. (1985). Effect of insulin on porcine granulosa cells: Implications of a possible receptor mediated action. *Acta Endocrinologica*, *108*(1), 104-110. <https://doi.org/10.1530/acta.0.1080104>
- Paes, V. M., Liao, S. F., Figueiredo, J. R., Willard, S. T., Ryan, P. L., & Feugang, J. M. (2019). Proteome changes of porcine follicular fluid during follicle development. *Journal of*

- Animal Science and Biotechnology*, 10(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0400-3>
- Palmer, E., Bézard, J., Magistrini, M., & Duchamp, G. (1991). In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 44, 375-384.
- Papp, S. M., Fröhlich, T., Radefeld, K., Havlicek, V., Kösters, M., Yu, H., Mayrhofer, C., Brem, G., Arnold, G. J., & Besenfelder, U. (2019). A novel approach to study the bovine oviductal fluid proteome using transvaginal endoscopy. *Theriogenology*, 132, 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.04.009>
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., & First, N. L. (1989). Capacitation of bovine sperm by heparin: Inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biology of Reproduction*, 41(4), 683-699. <https://doi.org/10.1095/biolreprod41.4.683>
- Peña, F. J., Macías García, B., Samper, J. C., Aparicio, I. M., Tapia, J. A., & Ortega Ferrusola, C. (2011). Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology*, 76(7), 1177-1186. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.023>
- Pereira, G. R., Lorenzo, P. L., Carneiro, G. F., Ball, B. A., Gonçalves, P. B. D., Pegoraro, L. M. C., Bilodeau-Goeseels, S., Kastelic, J. P., Casey, P. J., & Liu, I. K. M. (2012). The effect of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on in vitro maturation of equine oocytes. *Zygote*, 20(4), 353-360. <https://doi.org/10.1017/S0967199411000335>
- Pérez-Cerezales, S., Ramos-Ibeas, P., Acuña, O. S., Avilés, M., Coy, P., Rizos, D., & Gutiérrez-Adán, A. (2018). The oviduct: From sperm selection to the epigenetic landscape of the embryo. *Biology of Reproduction*, 98(3), 262-276. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox173>
- Petrucci, B. P. L., Wolf, C. A., Arlas, T. R., Santos, G. O., Estanislau, J. F., Fiala, S. M., Jobim, M. I. M., & Mattos, R. C. (2014). Proteomics of mare follicular fluid during follicle

- development. *Journal of Equine Veterinary Science*, *34*(1), 115-116.
<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.10.079>
- Piccinni, M.-P., Vicenti, R., Logiodice, F., Fabbri, R., Kullolli, O., Pallecchi, M., Paradisi, R., Danza, G., Macciocca, M., Lombardelli, L., & Seracchioli, R. (2021). Description of the follicular fluid cytokine and hormone profiles in human physiological natural cycles. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *106*(2), e721-e738.
<https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa880>
- Piñero-Sagredo, E., Nunes, S., de los Santos, M. J., Celda, B., & Esteve, V. (2010). NMR metabolic profile of human follicular fluid. *NMR in Biomedicine*, *23*(5), 485-495.
<https://doi.org/10.1002/nbm.1488>
- Pioltine, E. M., Machado, M. F., da Silveira, J. C., Fontes, P. K., Botigelli, R. C., Quaglio, A. E. V., Costa, C. B., & Nogueira, M. F. G. (2020). Can extracellular vesicles from bovine ovarian follicular fluid modulate the in-vitro oocyte meiosis progression similarly to the CNP-NPR2 system? *Theriogenology*, *157*, 210-217.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.031>
- Pocate-Cheriet, K., Santulli, P., Kateb, F., Bourdon, M., Maignien, C., Batteux, F., Chouzenoux, S., Patrat, C., Wolf, J. P., Bertho, G., & Chapron, C. (2020). The follicular fluid metabolome differs according to the endometriosis phenotype. *Reproductive BioMedicine Online*, *41*(6), 1023-1037. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.09.002>
- Pors, S. E., Kristensen, S. G., Nikiforov, D., Mamsen, L. S., Cadenas, J., Greve, V. H., Dueholm, M., & Andersen, C. Y. (2021). Histidine buffered media maintains pH stabile during cooled transportation of human ovarian tissue. *Journal of Ovarian Research*, *14*(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s13048-021-00861-6>
- Poulsen, L. la C., Pla, I., Sanchez, A., Grøndahl, M. L., Marko-Varga, G., Yding Andersen, C., Englund, A. L. M., & Malm, J. (2019). Progressive changes in human follicular fluid

- composition over the course of ovulation: Quantitative proteomic analyses. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 495, 110522. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110522>
- Puts, G. S., Leonard, M. K., Pamidimukkala, N. V., Snyder, D. E., & Kaetzel, D. M. (2018). Nuclear functions of NME proteins. *Laboratory Investigation*, 98(2), 211-218. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.109>
- Rader, K., Choi, Y.-H., & Hinrichs, K. (2016). Intracytoplasmic sperm injection, embryo culture, and transfer of in vitro–produced blastocysts. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 32(3), 401-413. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.07.003>
- Reader, K., Stanton, J.-A., & Juengel, J. (2017). The role of oocyte organelles in determining developmental competence. *Biology*, 6(4), 35. <https://doi.org/10.3390/biology6030035>
- Reed, C. B., Meier, S., Murray, L. A., Burke, C. R., & Pitman, J. L. (2022). The microenvironment of ovarian follicles in fertile dairy cows is associated with high oocyte quality. *Theriogenology*, 177, 195-205. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.10.022>
- Ren, D., & Xia, J. (2010). Calcium signaling through catSper channels in mammalian fertilization. *Physiology*, 25(3), 165-175. <https://doi.org/10.1152/physiol.00049.2009>
- Revelli, A., Piane, L. D., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., & Rinaudo, P. (2009). Follicular fluid content and oocyte quality: From single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-40>
- Ricciardelli, C., Russell, D. L., Ween, M. P., Mayne, K., Suwihat, S., Byers, S., Marshall, V. R., Tilley, W. D., & Horsfall, D. J. (2007). Formation of hyaluronan and versican rich pericellular matrix by prostate cancer cells promotes cell motility. *Journal of Biological Chemistry*, 282(14), 10814-10825. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606991200>
- Richani, D., Dunning, K. R., Thompson, J. G., & Gilchrist, R. B. (2021). Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus cells: Essential role in determining oocyte developmental

- competence. *Human Reproduction Update*, 27(1), 27-47.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa043>
- Rienzi, L., Balaban, B., Ebner, T., & Mandelbaum, J. (2012). The oocyte. *Human Reproduction*, 27(suppl 1), i2-i21. <https://doi.org/10.1093/humrep/des200>
- Rodríguez, M. B., Gambini, A., Clérico, G., Ynsaurralde-Rivolta, A. E., Briski, O., Largel, H., Sansinena, M., & Salamone, D. F. (2019). Time of first polar body extrusion affects the developmental competence of equine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(12), 1805.
<https://doi.org/10.1071/RD19248>
- Rodriguez-Martinez, H., Tienthai, P., Atikuzzaman, M., Vicente-Carrillo, A., Rubér, M., & Alvarez-Rodriguez, M. (2016). The ubiquitous hyaluronan: Functionally implicated in the oviduct? *Theriogenology*, 86(1), 182-186.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.025>
- Roggero, C. M., De Blas, G. A., Dai, H., Tomes, C. N., Rizo, J., & Mayorga, L. S. (2007). Complexin/synaptotagmin interplay controls acrosomal exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(36), 26335-26343. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700854200>
- Romar, R., Funahashi, H., & Coy, P. (2016). In vitro fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years. *Theriogenology*, 85(1), 125-134.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.017>
- Romero-Arredondo, A., & Seidel, G. E. (1994). Effects of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 41(2), 383-394. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90074-S](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90074-S)
- Saewu, A., Kadunganattil, S., Raghupathy, R., Kongmanas, K., Diaz-Astudillo, P., Hermo, L., & Tanphaichitr, N. (2017). Clusterin in the mouse epididymis: Possible roles in sperm maturation and capacitation. *Reproduction*, 154(6), 867-880.
<https://doi.org/10.1530/REP-17-0518>

- Saint-Dizier, M., Marnier, C., Tahir, M. Z., Grimard, B., Thoumire, S., Chastant-Maillard, S., & Reynaud, K. (2014). OVGP1 is expressed in the canine oviduct at the time and place of oocyte maturation and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, *81*(11), 972-982. <https://doi.org/10.1002/mrd.22417>
- Saint-Dizier, M., Schoen, J., Chen, S., Banliat, C., & Mermillod, P. (2019). Composing the early embryonic microenvironment: Physiology and regulation of oviductal secretions. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(1), 223. <https://doi.org/10.3390/ijms21010223>
- Sampaio, B., Ortiz, I., Resende, H., Felix, M., Varner, D., & Hinrichs, K. (2021). Factors affecting intracellular calcium influx in response to calcium ionophore A23187 in equine sperm. *Andrology*, *9*(5), 1631-1651. <https://doi.org/10.1111/andr.13036>
- Sato, Y., Son, J. H., & Meizel, S. (2000). The mouse sperm glycine receptor/chloride channel: Cellular localization and involvement in the acrosome reaction initiated by glycine. *Journal of Andrology*, *21*(1), 99-106. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03281.x>
- Satué, K., Fazio, E., Ferlazzo, A., & Medica, P. (2019). Intrafollicular and systemic serotonin, oestradiol and progesterone concentrations in cycling mares. *Reproduction in Domestic Animals*, *54*(10), 1411-1418. <https://doi.org/10.1111/rda.13545>
- Sen, A. (2013). Oocyte maturation a story of arrest and release. *Frontiers in Bioscience*, *S5*(2), 451-477. <https://doi.org/10.2741/S383>
- Sessions-Bresnahan, D. R., Graham, J. K., & Carnevale, E. M. (2014). Validation of a heterologous fertilization assay and comparison of fertilization rates of equine oocytes using in vitro fertilization, perivitelline, and intracytoplasmic sperm injections. *Theriogenology*, *82*(2), 274-282. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.002>

- Shabpareh, V., Squires, E. L., Seidel, G. E., & Jasko, D. J. (1993). Methods for collecting and maturing equine oocytes in vitro. *Theriogenology*, *40*(6), 1161-1175.
[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90287-F](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90287-F)
- Sinclair, K. D., Lunn, L. A., Kwong, W. Y., Wonnacott, K., Linforth, R. S. T., & Craigon, J. (2008). Amino acid and fatty acid composition of follicular fluid as predictors of in-vitro embryo development. *Reproductive Biomedicine Online*, *16*(6), 859-868.
[https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60153-8](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60153-8)
- Smits, K., Goossens, K., Van Soom, A., Govaere, J., Hoogewijs, M., & Peelman, L. J. (2011). In vivo-derived horse blastocysts show transcriptional upregulation of developmentally important genes compared with in vitro-produced horse blastocysts. *Reproduction, Fertility and Development*, *23*(2), 364. <https://doi.org/10.1071/RD10124>
- Smits, K., Goossens, K., Van Soom, A., Govaere, J., Hoogewijs, M., Vanhaesebrouck, E., Galli, C., Colleoni, S., Vandesompele, J., & Peelman, L. (2009). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in equine in vivo and fresh and frozen-thawed in vitro blastocysts. *BMC Research Notes*, *2*(1), 246. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-246>
- Smits, K., Govaere, J., Peelman, L. J., Goossens, K., de Graaf, D. C., Vercauteren, D., Vandaele, L., Hoogewijs, M., Wydooghe, E., Stout, T., & Van Soom, A. (2012). Influence of the uterine environment on the development of in vitro-produced equine embryos. *Reproduction*, *143*(2), 173-181. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0217>
- Smits, K., Nelis, H., Van Steendam, K., Govaere, J., Roels, K., Ververs, C., Leemans, B., Wydooghe, E., Deforce, D., & Van Soom, A. (2017). Proteome of equine oviducal fluid: Effects of ovulation and pregnancy. *Reproduction, Fertility and Development*, *29*(6), 1085. <https://doi.org/10.1071/RD15481>
- Smits, K., Willems, S., Van Steendam, K., Van De Velde, M., De Lange, V., Ververs, C., Roels, K., Govaere, J., Van Nieuwerburgh, F., Peelman, L., Deforce, D., & Van Soom, A. (2018). Proteins involved in embryo-maternal interaction around the signalling of maternal

recognition of pregnancy in the horse. *Scientific Reports*, 8(1), 5249.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-23537-6>

Soleilhavoup, C., Riou, C., Tsikis, G., Labas, V., Harichaux, G., Kohnke, P., Reynaud, K., de Graaf, S. P., Gerard, N., & Druart, X. (2016). Proteomes of the female genital tract during the oestrous cycle. *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(1), 93-108.

<https://doi.org/10.1074/mcp.M115.052332>

Sommer, A., Christensen, E., Schwenger, S., Seul, R., Haas, D., Olbrich, H., Omran, H., & Sass, J. O. (2011). The molecular basis of aminoacylase 1 deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1812(6), 685-690.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.03.005>

Song, G. X., Shen, Y. H., Liu, Y. Q., Sun, W., Miao, L. P., Zhou, L. J., Liu, H. L., Yang, R., Kong, X. Q., Cao, K. J., Qian, L. M., & Sheng, Y. H. (2012). Overexpression of FABP3 promotes apoptosis through inducing mitochondrial impairment in embryonic cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(12), 3701-3708.

<https://doi.org/10.1002/jcb.24243>

Spindler, R. E., Pukazhenthil, B. S., & Wildt, D. E. (2000). Oocyte metabolism predicts the development of cat embryos to blastocyst in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 56(2), 163-171. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200006\)56:2<163::AID-MRD7>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200006)56:2<163::AID-MRD7>3.0.CO;2-3)

Squires, E. (2020). Current reproductive technologies impacting equine embryo production. *Journal of Equine Veterinary Science*, 89, 102981.

<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.102981>

Squires, E. L. (2019). Perspectives on the development and incorporation of assisted reproduction in the equine industry. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(12), 1753. <https://doi.org/10.1071/RD19365>

- Squires, E. L., Wilson, J. M., Kato, H., & Blaszczyk, A. (1996). A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, *45*(1), 306.
[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)84779-0](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)84779-0)
- Stauss, C. R., Votta, T. J., & Suarez, S. S. (1995). Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biology of Reproduction*, *53*(6), 1280-1285.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod53.6.1280>
- Steeves, C. L., & Baltz, J. M. (2005). Regulation of intracellular glycine as an organic osmolyte in early preimplantation mouse embryos. *Journal of Cellular Physiology*, *204*(1), 273-279.
<https://doi.org/10.1002/jcp.20284>
- Steinberger, B., Yu, H., Brodmann, T., Milovanovic, D., Reichart, U., Besenfelder, U., Artemenko, K., Razzazi-Fazeli, E., Brem, G., & Mayrhofer, C. (2017). Semen modulated secretory activity of oviductal epithelial cells is linked to cellular proteostasis network remodeling: Proteomic insights into the early phase of interaction in the oviduct in vivo. *Journal of Proteomics*, *163*, 14-27. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.05.006>
- Stout, T. A. E. (2020). Clinical application of in vitro embryo production in the horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, *89*, 103011. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103011>
- Suarez, S. S. (2008). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *The International Journal of Developmental Biology*, *52*(5-6), 455-462.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.072527ss>
- Suliman, Y., Becker, F., & Wimmers, K. (2018). Implication of transcriptome profiling of spermatozoa for stallion fertility. *Reproduction, Fertility and Development*, *30*(8), 1087.
<https://doi.org/10.1071/RD17188>
- Swearman, H., Koustas, G., Knight, E., Liperis, G., Grupen, C., & Sjoblom, C. (2018). pH: The silent variable significantly impacting meiotic spindle assembly in mouse oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*, *37*(3), 279-290.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.06.022>

- Tesfaye, D., Menjivar, N., & Gebremedhn, S. (2022). Current knowledge and the future potential of extracellular vesicles in mammalian reproduction. *Reproduction, Fertility and Development*, *34*(2), 174. <https://doi.org/10.1071/RD21277>
- Tews, J. K., Carter, S. H., Roa, P. D., & Stone, W. E. (1963). Free amino acids and related compounds in dog brain: Post-mortem and anoxic changes, effects of ammonium chloride infusion and levels during seizures induced by picrotoxin and pentylenetetrazol. *Journal of Neurochemistry*, *10*, 641-653. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1963.tb08936.x>
- Tremoleda, J. L., Stout, T. A. E., Gadella, B. M., & Colenbrander, B. (2003). Evaluation of sperm-oocyte interaction during in vitro fertilization in the horse. *Reproduction, Fertility and Development*, *16*(2), 263. <https://doi.org/10.1071/RDv16n1Ab286>
- Uzbekova, S., Salhab, M., Perreau, C., Mermillod, P., & Dupont, J. (2009). Glycogen synthase kinase 3B in bovine oocytes and granulosa cells: Possible involvement in meiosis during in vitro maturation. *Reproduction (Cambridge, England)*, *138*(2), 235-246. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0136>
- van der Valk, J. (2022). Fetal bovine serum—A cell culture dilemma. *Science*, *375*(6577), 143-144. <https://doi.org/10.1126/science.abm1317>
- Van Winkle, L. J. (2001). Amino acid transport regulation and early embryo development. *Biology of Reproduction*, *64*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.1.1>
- Velez, I. C., Arnold, C., Jacobson, C. C., Norris, J. D., Choi, Y. H., Edwards, J. F., Hayden, S. S., & Hinrichs, K. (2012). Effects of repeated transvaginal aspiration of immature follicles on mare health and ovarian status: Effect of transvaginal aspiration on health. *Equine Veterinary Journal*, *44*, 78-83. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00606.x>
- Visconti, P. E., & Kopf, G. S. (1998). Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biology of Reproduction*, *59*(1), 1-6. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.1.1>

- Visconti, P. E., Moore, G. D., Bailey, J. L., Leclerc, P., Connors, S. A., Pan, D., Olds-Clarke, P., & Kopf, G. S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*, *121*(4), 1139-1150. <https://doi.org/10.1242/dev.121.4.1139>
- Vredenburg-Wilberg, W. L., & Parrish, J. J. (1995). Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Molecular Reproduction and Development*, *40*(4), 490-502. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080400413>
- Walter, J., Huwiler, F., Fortes, C., Grossmann, J., Roschitzki, B., Hu, J., Naegeli, H., Laczko, E., & Bleul, U. (2019). Analysis of the equine “cumulome” reveals major metabolic aberrations after maturation in vitro. *BMC Genomics*, *20*(1), 588. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5836-5>
- Wang, C., Liu, Y., Chang, C., Wu, S., Gao, J., Zhang, Y., Chen, Y., Zhong, F., & Deng, G. (2016). Human fallopian tube proteome shows high coverage of mesenchymal stem cells associated proteins. *Bioscience Reports*, *36*(1), e00297. <https://doi.org/10.1042/BSR20150220>
- Warzych, E., & Lipinska, P. (2020). Energy metabolism of follicular environment during oocyte growth and maturation. *Journal of Reproduction and Development*, *66*(1), 1-7. <https://doi.org/10.1262/jrd.2019-102>
- Wertheimer, E. V., Salicioni, A. M., Liu, W., Trevino, C. L., Chavez, J., Hernández-González, E. O., Darszon, A., & Visconti, P. E. (2008). Chloride is essential for capacitation and for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(51), 35539-35550. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804586200>
- Willis, P., Caudle, A. B., & Fayer-Hosken, A. (1991). Equine oocyte in vitro maturation: Influences of sera, time, and hormones. *Molecular Reproduction and Development*, *30*(4), 360-368. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080300411>

- Willis, P., Sekhar, K. N., Brooks, P., & Fayrer-Hosken, R. A. (1994). Electrophoretic characterization of equine oviductal fluid. *The Journal of Experimental Zoology*, 268(6), 477-485. <https://doi.org/10.1002/jez.1402680608>
- Wright, R. W., & Bondioli, K. R. (1981). Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animals. *Journal of Animal Science*, 53(3), 702-729. <https://doi.org/10.2527/jas1981.533702x>
- Yanagimachi, R. (1970). The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *Reproduction*, 23(1), 193-196. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0230193>
- Yang, B., Chen, Y., & Shi, J. (2019). Reactive oxygen species (ROS)-Based nanomedicine. *Chemical Reviews*, 119(8), 4881-4985. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00626>
- Yu, H., Hackenbroch, L., Meyer, F. R. L., Reiser, J., Razzazi-Fazeli, E., Nöbauer, K., Besenfelder, U., Vogl, C., Brem, G., & Mayrhofer, C. (2019). Identification of rabbit oviductal fluid proteins involved in pre-fertilization processes by quantitative proteomics. *Proteomics*, 19(5), e1800319. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800319>
- Zachut, M., Sood, P., Levin, Y., & Moallem, U. (2016). Proteomic analysis of preovulatory follicular fluid reveals differentially abundant proteins in less fertile dairy cows. *Journal of Proteomics*, 139, 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.03.027>
- Zakerkish, F., Brännström, M., Carlsohn, E., Sihlbom, C., van der Post, S., & Thoroddsen, A. (2020). Proteomic analysis of follicular fluid during human ovulation. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*, 99(7), 917-924. <https://doi.org/10.1111/aogs.13805>
- Zhang, J. J., Boyle, M. S., Allen, W. R., & Galli, C. (1989). Recent studies on in vivo fertilisation of in vitro matured horse oocytes. *Equine Veterinary Journal*, 21(S8), 101-104. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1989.tb04691.x>
- Zhang, S., Zeng, X., Ren, M., Mao, X., & Qiao, S. (2017). Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: A review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0139-z>

Zhao, Y., Vanderkooi, S., & Kan, F. W. K. (2022). The role of oviduct-specific glycoprotein (OVGP1) in modulating biological functions of gametes and embryos. *Histochemistry and Cell Biology*, 157(3), 371-388. <https://doi.org/10.1007/s00418-021-02065-x>