

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



**EFFECTO DE LA CAFEÍNA Y LA RHUS TRILOBATA SOBRE EL
DESARROLLO DE COMPETENCIA DE OVOCITOS BOVINOS
MADURADOS IN VITRO**

POR:

M. V. Z. ADRIANA RODRÍGUEZ BORBÓN

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS CON ÁREA MAYOR EN NUTRICIÓN ANIMAL

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

AGOSTO DE 2017



Efecto de la cafeína y la *Rhus trilobata* sobre el desarrollo de competencia de ovocitos bovinos madurados *In vitro*. Tesis presentada por Adriana Rodríguez Borbón como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias, ha sido aprobada y aceptada por:

Ph. D. Carlos Ortega Ochoa
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología

Ph. D. Alma Delia Alarcón Rojo
Secretario de Investigación y Posgrado

D. Ph. Agustín Corral Luna
Coordinador Académico de Posgrado

D. Ph. María Eduvigis Burrola Barraza
Presidente

10 de Agosto de 2017
Fecha

Comité:

D. Ph. María Eduvigis Burrola Barraza
M. C. Beatriz Elena Castro Valenzuela
Ph. D. Juan Alberto Grado Ahuir
Ph. D. Iván Adrián García Galicia

© Derechos Reservados
ADRIANA RODRÍGUEZ BORBÓN
DIRECCIÓN: PERIFÉRICO FRANCISCO R.
ALMADA KM. 1, CHIHUAHUA, CHIH.,
MÉXICO C.P. 31453
AGOSTO DE 2017

CURRICULUM VITAE

La autora nació el 12 de Septiembre de 1991 en Ciudad Obregón, Sonora, México.

Mayo 2010 – Junio 2015 Estudió la licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia en el Instituto Tecnológico de Sonora. Cd. Obregón, Sonora.

Agosto 2015 – Junio 2017 Estudiante del programa de Maestría en Ciencias y Producción Animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Univerisidad Autónoma de Chihuahua. Cd. Chihuahua, Chih.

Octubre 2015 Médica certificada como técnica de la raza Brangus.

Miembro de:

Asociación Mexicana de Tecnología de Embriones

RESUMEN

EFFECTO DE LA CAFEÍNA Y LA *Rhus trilobata* SOBRE EL DESARROLLO DE
COMPETENCIA DE OVOCITOS BOVINOS MADURADOS *In vitro*

POR:

M. V. Z. ADRIANA RODRÍGUEZ BORBÓN

Maestría en Ciencias en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: D. Ph. María Eduviges Burrola Barraza

El objetivo fue evaluar el efecto de la cafeína (CAFN) y *Rhus trilobata* (RT) sobre la maduración de ovocitos. Complejos ovocito – células cumulares (COC's) aspirados de ovarios provenientes del rastro y cultivados por 23 h fueron distribuidos en cuatro grupos: CONTROL, CAFN 10 mM, RT 3 µg / mL y CAFN+RT. Se evaluó compactación de los COC's, extrusión del cuerpo polar (CP), niveles de ROS – GSH, desarrollo de ovocitos después de la partenogénesis y tasa de fertilización *In vitro*. La CAFN mantuvo los COC's compactos (64.30 %) e inhibió la reanudación meiótica, sólo un bajo porcentaje (5.77 %) extruyó el CP al término de la maduración. La RT mejoró la maduración nuclear (CP; 42.81 %) en comparación con el resto de los grupos y mantuvo los COC's compactos. La CAFN aumentó ($P < 0.05$) el contenido de ROS (1.6539 UAF) en comparación con la RT (1.1805 UAF) y CAFN+RT (1.0815 UAF). El contenido de GSH fue similar ($P > 0.05$) entre los tratamientos. La división celular de los ovocitos activados artificialmente o fertilizados fue

similar ($P > 0.05$) entre los grupos. Estos resultados sugieren que la RT promueve la habilidad del ovocito para desarrollar competencia, mientras que la CAFN es un potente inhibidor de la meiosis además, disminuye la viabilidad y el desarrollo de competencia de los ovocitos.

ABSTRACT

EFFECT OF CAFFEINE AND *Rhus trilobata* ON THE DEVELOPMENT OF COMPETENCE OF MATURED BOVINE OOCYTES *In vitro*

BY:

ADRIANA RODRÍGUEZ BORBÓN

The objective was to evaluate the effect of caffeine (CAFN) and *Rhus trilobata* (RT) on oocyte maturation. Cumulus oocytes complexes (COC's) were aspirated from cows ovaries provided from a slaughterhouse, cultivated for 23 h, and distributed in four groups: CONTROL, CAFN 10 mM, RT 3 µg / mL, and CAFN+RT. Compaction of COC's, polar body (CP) extrusion, ROS – GSH levels, development of oocytes after parthenogenesis, and *In vitro* fertilization rate were evaluated. The COC's were maintained compacted (64.30 %) and meiotic resumption was kept inhibited by action of CAFN; only just a low percentage extruded CP at the end of the maturation (5.77 %). The RT improved nuclear maturation (CP; 42.81 %) in comparison with the rest of the groups and kept the COC's compacted. The CAFN increased ($P < 0.05$) ROS contents (1.6539 UAF) in comparison with the RT (1.1805 UAF) and CAFN+RT (1.0815 UAF). GSH concentration was similar ($P > 0.05$) among treatments. The cellular division of the oocytes artificially activated or fertilized was similar ($P > 0.05$) among groups. These results suggest that the RT promotes the ability of develop competition of the oocyte whereas the CAFN acted as a potent meiosis inhibitor, besides it decreases oocyte viability and ability to develop competition of the oocyte.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE GRÁFICAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Ovogénesis – Foliculogénesis.....	3
Regulación de Eventos Reproductivos.....	5
Comunicación Bidireccional.....	5
Comunicación mediada por uniones GAP.....	6
Comunicación mediada por proyecciones transzonales.....	6
Comunicación mediada por receptores.....	7
Regulación Molecular del Arresto Meiótico.....	7
Maduración Espontánea.....	11
Especies Reactivas de Oxígeno y Estrés Oxidativo.....	12
Sistema Antioxidante.....	13
Actividad Antioxidante en la Maduración de Ovocitos <i>In vitro</i>	14
Antioxidantes.....	14
Cafeína.....	15
<i>Rhus trilobata</i>	15

MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Maduración <i>In vitro</i> de Ovocitos.....	19
Experimento 1. Expansión de las Células Cumulares.....	19
Experimento 2. Extrusión del Primer Cuerpo Polar.....	20
Experimento 3. Niveles Intracelulares de ROS.....	20
Experimento 4. Niveles Intracelulares de GSH.....	23
Experimento 5. Partenogénesis Activación de Ovocitos.....	26
Experimento 6. Producción de Embriones <i>In vitro</i>	27
Obtención del Extracto de <i>Rhus trilobata</i>	29
Análisis Estadístico.....	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
Experimento 1. Expansión de las Células Cumulares.....	32
Experimento 2. Extrusión del Primer Cuerpo Polar.....	34
Experimento 3. Niveles Intracelulares de ROS.....	37
Experimento 4. Niveles Intracelulares de GSH.....	39
Experimento 5. Partenogénesis Activación de Ovocitos.....	41
Experimento 6. Producción de Embriones <i>In vitro</i>	43
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	46
LITERATURA CITADA.....	47

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Niveles intracelulares de ROS.....	38
2	Niveles intracelulares de GSH.....	40
3	Desarrollo ovocitos activados por partenogénesis.....	42
4	Producción de embriones <i>In vitro</i>	44

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Página
1	Expansión de las células cumulares.....	33
2	Extrusión del primer cuerpo polar.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación esquemática de las señales que regulan la maduración del ovocito.....	8
2	Esquema del control del arresto meiótico.....	16
3	Fotografía de la planta <i>Rhus trilobata</i>	17
4	Complejos cúmulo – ovocito (COC's).....	21
5	Extursión del CP.....	22
6	Imagen representativa de los niveles intracelulares de ROS...	24
7	Imagen representativa de los niveles intracelulares de GSH...	25
8	Ovocitos activados por partenogénesis.....	28
9	Desarrollo de embriones producidos <i>In vitro</i>	30

INTRODUCCIÓN

La producción de embriones *In vitro* se ha incrementado considerablemente los últimos años. De acuerdo con la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, 2015) en los años 2014 y 2015 se produjeron a nivel mundial 546,628 y 671,111 embriones para ser transferidos, respectivamente. En particular, en México se produjeron 4,381 y 5,065 embriones transferibles que equivalen a un 0.8% en el 2014 y un 0.75 % en 2015 de la producción mundial. A pesar que estos datos muestran un aumento en la producción de embriones, la eficiencia de los ovocitos madurados *In vitro* para desarrollar competencia es baja (Barret y Albertini, 2009). Solamente, un 30 a 40 % de ovocitos aspirados después de ser madurados, fertilizados y cultivados *In vitro* logran alcanzar el estadio de blastocitos (Rizos *et al.*, 2008). Esto indica que las actuales condiciones de cultivo *In vitro* no favorecen el potencial de desarrollo de los ovocitos hasta embriones tempranos (Rizos *et al.*, 2002). Una de las causas se debe a que los ovocitos al ser extraídos de los folículos ováricos y cultivados reactivan meiosis espontáneamente independientemente de gonadotropinas (Bilodeau-Goeseels, 2012) comprometiendo la comunicación bidireccional que se da dentro del complejo ovocito – células cumulares (COC's). Lo que conlleva a perder su habilidad para ser madurados, fecundados y por ende desarrollarse hasta blastocitos (Sirard, 2011). Una alternativa para mejorar la competencia del ovocito, es adicionar al medio de cultivo celular componentes que prolongen el arresto meiótico y que al mismo tiempo proporcionen al medio un ambiente antioxidante donde el ovocito permanezca en íntima comunicación bidireccional con las células cumulares

(CC). Es decir, donde la estructura tridimensional de los COC's no se vea afectada y así se aumenten las probabilidades de que el ovocito alcance la competencia. Una sustancia que pudiera ayudar a este fin es la cafeína (CAFN), ya que ha sido probada como un potente inhibidor de la meiosis en protocolos de maduración *In vitro* de ovocitos bovinos (Kren *et al.*, 2004; Bernal-Ulloa *et al.*, 2016) además de poseer actividad antioxidante (Lee, 2000). Asimismo, los compuestos polifenólicos del extracto de la planta *Rhus trilobata* (RT) también poseen capacidad antioxidante (Rodríguez-Palomares *et al.*, 2014). Aunque aún no ha sido probada en protocolos de maduración *In vitro*, debido a su efecto antineoplásico (Híjar-Soto *et al.*, 2016), antiinflamatorio (Guerrero-Salgado *et al.*, 2016) y antioxidante (Rodríguez, 2015), resulta interesante probarla. Se planteo como hipótesis que adicionar extractos polifenólicos de la planta *Rhus trilobata* promueve un mejor desarrollo de ovocitos durante la maduración *In vitro* en comparación con la adición de CAFN. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la CAFN y la *Rhus trilobata* sobre el desarrollo de competencia de ovocitos bovinos madurados *In vitro*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Ovogénesis – Foliculogénesis

En los bovinos durante la vida fetal se originan las gónadas en las crestas gonadales en la línea media del mesonefro alrededor de los días 28 al 36 de la gestación (Mauleon, 1969). Un suceso importante en esta etapa es la migración de células germinales primordiales (PGCS) hacia las crestas germinales y su proliferación (Rüsse y Sinowantz, 1998). Durante el desarrollo del aparato urogenital existe la posibilidad de formar dos conductos: el conducto de Wolff o de Müller, este último para la formación del oviducto, útero y partes de la vagina (Viebahn *et al.*, 1987; Kenngott y Sinowatz, 2007). La migración de PGCS en bovinos ocurre entre los días 30 al 64 de gestación (Rüsse y Sinowatz, 1998). Durante la migración las PGCS se dividen por mitosis y comienza la ovogénesis para dar inicio a la formación de la célula germinal femenina conocida como ovogonia (Wartenberg *et al.*, 1998). Un gran número de PGCS llegan a las gónadas para desarrollarse dentro de los folículos primordiales (Tam y Snow, 1981). Aunque la mayoría de las PGCS continúan la proliferación antes del nacimiento algunas sufren apoptosis; en el bovino, el máximo de PGCS es alrededor de 2,700,000, las cuales son reducidas antes del nacimiento aproximadamente a 68,000 (Erickson, 1996). Después de varias divisiones mitóticas la ovogonia entra a la primera división meiótica deteniéndose en profase I en la etapa de diploteno dando lugar a los ovocitos primarios, los cuales se mantienen arrestados hasta la pubertad (Aerts y Bols, 2010). El ovario es el órgano donde se lleva a cabo el desarrollo y maduración de ovocitos así como liberación del mismo, particularmente es indispensable

para la síntesis y secreción de hormonas involucradas en la reproducción que intervienen en el desarrollo folicular (Gougeon, 2003). Durante la foliculogénesis se sucede la transición de folículos inactivos a folículos activos, este es un proceso gradual que toma lugar poco después de la formación de los folículos primordiales y continúa a lo largo de vida reproductiva (Fortune *et al.*, 1998). Por lo tanto, se puede definir a la foliculogénesis como una serie de eventos ordenados y consecutivos sobre la diferenciación de PCGS y las etapas de maduración de las células somáticas y germinales (Zhang *et al.*, 2010). Durante la foliculogénesis comienza la formación de folículos primordiales localizados en la corteza ovárica (Nilsson *et al.*, 2001; Yang y Fortune, 2007), continuando con el crecimiento y transición hacia folículos primordiales, primarios, secundarios hasta llegar a un folículo terciario o maduro el cual contiene un ovocito maduro, rodeado de varias capas de células de la granulosa cuboidales, células de la teca interna así como externa (Fair *et al.*, 1997 Silva *et al.*, 2009). La adquisición de la competencia meiótica se da durante la foliculogénesis (Sánchez y Smitz, 2012), resultando un ovocito competente capaz de ser fertilizado y soportar las primeras divisiones embrionarias, durante esta etapa el ovocito obtiene la maquinaria necesaria para reanudar la meiosis I y posteriormente completarla (McGinnis *et al.*, 2013). Las modificaciones que sufre el ovocito durante esta etapa comprenden la acumulación de proteínas, reorganización de organelos (Fair, 2003) y cambios en la estructura de la cromatina (Luciano y Lodde, 2013).

Regulación de Eventos Reproductivos

El eje hipotálamo-hipófisis-gonadal se encarga de las regulaciones neuroendocrinas reproductivas como la síntesis y secreción de hormonas esteroideas (Prieto-Gómez y Velázquez-Paniagua, 2002). Los eventos reproductivos son controlados por el hipotálamo, el cual, estimula la producción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) causando la estimulación de la hipófisis para liberar las hormonas gonadotróficas (Hormona Folículo Estimulante; FSH y Hormona Luteinizante; LH). Las gonadotropinas tienen como órgano diana los ovarios y responden al aumento de la síntesis de hormonas esteroideas como estrógeno y progesterona (Tanriverdi *et al.*, 2003). La FSH estimula el crecimiento y maduración del folículo; además, estimula a las células de la granulosa para la síntesis de estradiol. Por otra parte, la LH permite la reanudación meiótica, estimula la ovulación y la esteroidogénesis en las células de la teca (Potau y Carreño de Puig, 2007). Los ovocitos arrestados en profase I reinician meiosis al llegar a la pubertad cuando los ovocitos en sus folículos comienzan a ser receptivos a las gonadotropinas, volviendo a hacer arrestados en metafase II, esta segunda meiosis sólo finaliza si el ovocito es fertilizado (Tripathi *et al.*, 2010)

Comunicación Bidireccional

Durante la foliculogénesis las CG se diferencian en dos tipos, las más cercanas al ovocito se denominan células cumulares (CC) y las más externas células de la granulosa murales (CM). El conjunto celular del ovocito rodeado por las CC, dan lugar a los COC's (Li y Albertini, 2013). La comunicación entre el ovocito y las células que lo rodean es bidireccional (Gilchrist *et al.*, 2008). Bajo esta comunicación sucede el desarrollo de ambos tipos celulares,

gobernado por una interacción compleja de factores reguladores, donde ambos tipos celulares se benefician, permitiendo la diferenciación y el desarrollo folicular así como la adquisición de competencia del ovocito (Eppig, 2001).

Comunicación mediada por uniones GAP. La foliculogénesis y la producción de ovocitos maduros dependen de la comunicación intracelular por medio de uniones GAP. Dichas uniones están compuestas por canales de conexiones intracelulares formados por proteínas transmembranales llamadas “conexinas” que permiten el paso de moléculas pequeñas de <1 kDa (Kidder y Mhawi, 2002). La conexina 43 (Cx43) se encuentra presente en las uniones GAP que conectan las CG con otras CG, mientras que la conexina 37 (Cx37) conecta las CC con el ovocito (Beyer *et al.*, 1989; Simon *et al.*, 1997). Por medio de uniones GAP el ovocito y las CC pueden transferirse moléculas como adenosín monofosfato cíclico (AMPc), guanosín monofosfato cíclico (GMPc), aminoácidos y metabolitos (Eppig, 1991). La presencia de canales de uniones GAP entre las propias CG y con el ovocito mantienen la funcionalidad del folículo (Monniaux, 2016). Las Cx43 y Cx37 son necesarias para la foliculogénesis, la ausencia de estas conexinas es suficiente para comprometer el desarrollo del ovocito y el folículo (Gittens y Kidder, 2005).

Comunicación mediada por proyecciones transzonales. Las proyecciones transzonales (TZP) son originadas en las CC y se extienden hasta la membrana plasmática del ovocito atravesando la zona pelúcida (ZP). En los folículos preantrales estas estructuras son numerosas y tienen contacto con el oolema o citoplasma del ovocito (Albertini y Rider, 1994). Durante el crecimiento del ovocito se forman invaginaciones profundas de TZP alcanzando la vesícula

germinal. Mientras que en los folículos con antro estas estructuras son menormente predominantes. Las TZP apoyan la secreción o absorción de factores secretados por el ovocito (Albertini *et al.*, 2001). Estas proyecciones pueden ser solitarias o múltiples, siendo densas extensiones que perforan la ZP (Adams *et al.*, 1996). El citoesqueleto, fibras u orgánulos ocupan las TZP. Sin embargo, en etapas tempranas del desarrollo pueden alcanzar la corteza del ovocito (Albertini y Barrett, 2004).

Comunicación mediada por receptores. El ovocito secreta moléculas que establecen la comunicación bidireccional. Los factores secretados por el ovocito (OSFs) activan las vías de señalización que permiten regular la diferenciación y mantener el fenotipo de las CC. Algunos de los factores son: el factor de diferenciación del crecimiento 9 (GDF-9) y la proteína morfogenética de hueso 15 (BMP-15; Gilchrist *et al.*, 2008). Los factores GDF-9 y BMP-15 juegan un papel importante en desarrollo folicular y en la maduración del ovocito, debido a que promueven que el ovocito pueda activar vías de señalización dentro de las CC para que se expresen genes implicados con síntesis de moléculas (Li *et al.*, 2014).

Regulación Molecular del Arresto Meiótico

Un paso importante en el proceso de maduración del ovocito es el arresto meiótico en profase I (Figura 1). El cual está controlado por la alta concentración de AMPc, que se difunde por medio de uniones GAP entre las CC y el ovocito (Dekel y Sherizly, 1988). El AMPc es el resultado de la activación de la adenilato ciclasa, debido a un estímulo mediado por un receptor transmembranal tipo proteína G (GPR3 ó GPR2). Tanto el ovocito como las CG

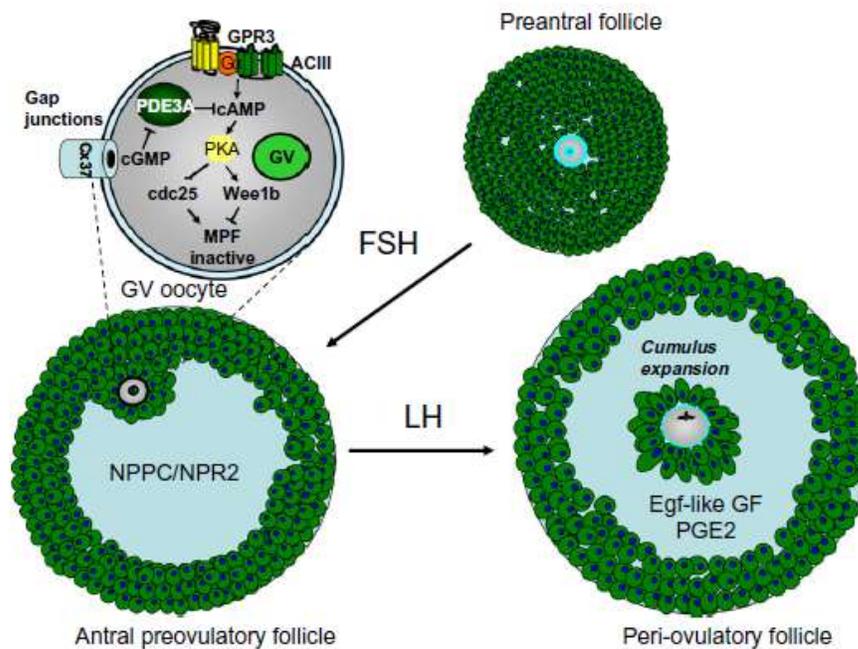


Figura 1. Representación esquemática de las señales que regulan la maduración del ovocito

FSH: Hormona Foliculo Estimulante; LH: Hormona Luteinizante; EGF: Factor de crecimiento epidérmico; PGE2: Prostaglandina; NPPC/NPR2: ligando NPPC y receptor NPR2; GV: Vesícula Germinal; MPF: Factor Promotor de la Maduración; cdc25: cd25 Fosfatasa; PKA; Proteína Quinasa A; cAMP: Adenosín Monofosfato Cíclico; cGMP: Guanosín Monofosfato Cíclico; PDE3A: Fosfodiesterasa 3A; GPR3: Receptor Transmembranal GPR3; Cx37: Conexina 37. Conti *et al.*, 2012

que lo rodean, son capaces de producir AMPc, aunque las cantidades producidas en las CG son mucho menores que las producidas en el ovocito. Gracias al estímulo de las proteínas GDF9 y BMP15, las CG expresan el RNAm del gen *Nppc*, el cual una vez que se traduce origina el péptido natriurético tipo-C (CNP) que se secreta al espacio extrafolicular, es decir, al espacio extracelular que existe entre las CM y CC.

Posterior a esto, el CNP es reconocido por el receptor péptido natriurético 2 (NPR2), el cual está presente en la membrana plasmática tanto en las CM como en las CC. La unión de CNP con NPR2 desencadena una producción de GMPc, el cual se acumula en el espacio intracelular de las CG. Este GMPc logra difundirse de las CM a las CC, a través de la Cx43, y de las células cumulares al ovocito por medio de la Cx37.

Una vez en el ovocito el GMPc es reconocido por la enzima fosfodiesterasa 3A (PDE3A) e inhibe la capacidad de la enzima para hidrolizar el AMPc, permitiendo así que el AMPc se acumule. El AMPc activa a la proteína cinasa A (PKA), la cual fosforila a la enzima Wee1, quien a su vez fosforila a la proteína CDK1. La CDK1 junto con la ciclina-B, conforman el complejo denominado factor promotor de maduración (MPF), al estar presente la proteína CDK1 provoca que el complejo MPF esté inhibido y con esto la meiosis se mantenga arrestada (Conti *et al.*, 2012; Sánchez y Smitz 2012; Zhang *et al.*, 2008).

El término del arresto meiótico es mediado por la hormona LH, la cual llega al ovario procedente de la pituitaria a través de la vía sanguínea. Una vez en el ovario, la LH es reconocida por su receptor denominado (LHR), que se

encuentra en la membrana de las células de la teca y CM. El receptor LHR es una proteína tipo G, que una vez que se une a la LH provoca que se active la vía de la adenilato ciclasa con la posterior producción de AMPc, el cual se acumula en citosol de la CM. El AMPc entonces a través de la vía de señalización de PKA, activa la expresión de los factores parecidos a EGF (anfiregulina, epiregulina y α -regulina), los cuales son secretados al espacio interfolicular donde son reconocidos por el receptor de crecimiento epidermal (EGFR) en las CC. Una vez que se da este reconocimiento, EGFR desencadena la vía señalización de las MAPK / ERK, que fosforila a la Cx43 provocando que ésta se cierre e impida el transporte de GMPc. Por otro lado el estímulo de EGFR provoca que se suprima la expresión de *Npr2*, por lo que ya no hay producción de GMPc en el citosol de la CC. Con lo anterior, los niveles de GMPc decrecen considerablemente en el interior del ovocito, lo que provoca que la PDE3A se active y empiece a hidrolizar el AMPc acumulado en el ovocito; esta acción ocasiona que se bloquee la vía PKA y se pierda el estado fosforilado de Wee1B y Cdc25. Wee1B en su estado desfosforilado no tiene acción sobre CDK1 y una vez que Cdc25 esta desforilada a su vez desforila a CDK1. Cuando CDK1 ésta desfosforilada se activa y se une a la ciclina-B, activándose el complejo MPF; el cual posteriormente fosforila las lamininas de la membrana nuclear, lo que desencadena que el núcleo empiece a desintegrarse. Con esto la meiosis se reactiva y continua hasta la metafase II, donde de nuevo se arresta (Conti *et al.*, 2012; Sánchez y Smitz 2012; Zhang *et al.*, 2008).

Maduración Espontánea

La maduración del ovocito implica lograr la capacidad para soportar la meiosis, desarrollar competencia para ser fertilizado y por último soportar las primeras divisiones embrionarias (Suikkari y Soderstrom-Anttila, 2007). Una limitante de la maduración *In vitro*, es que inmediatamente después de realizar la aspiración folicular, sin un estímulo previo al pico de LH, los ovocitos reanudan meiosis. Este suceso es conocido como maduración espontánea e impide la adecuada capacitación del ovocito, lo cual es esencial para desarrollar competencia (Pincus y Enzmann, 1935; Luciano *et al.*, 2011). Durante la segunda mitad de la maduración *In vitro*, las CC se expanden perdiendo la comunicación bidireccional entre las CC y el ovocito (Mattioli y Barboni, 2010). Al perder la interacción celular se reanuda la meiosis (Isobe *et al.*, 1988). Los ovocitos madurados *In vivo* se mantienen compactos durante la meiosis I y el progreso hacia la meiosis II; mientras que, los ovocitos madurados *In vitro* pierden progresivamente el contacto con las CC (Motilk *et al.*, 1986). Los sistemas de cultivo *In vitro* carecen de las condiciones adecuadas para mantener esta interacción (Araújo *et al.*, 2014), debido a que, los procesos biológicos implicados en el desarrollo *In vivo* son sólo parcialmente sustituidos en los cultivos de producción *In vitro* (Talevi y Gualtieri, 2009). La expansión de las CC está regulada por dos eventos: 1) estimulación por gonadotropinas ó por el factor del crecimiento y 2) factores secretados por el ovocito que actúan en las CC permitiendo responder a los estímulos de gonadotropinas / EGF para sintetizar ácido hialurónico (Gilchrist *et al.*, 2008). En respuesta al pico de LH las CC forman una matriz que envuelve a los COC's, este proceso se encuentra

regulado por señales intracelulares (Russell y Salustri, 2006). Las CC comienzan a producir ácido hialurónico, el cual es unido a las células por proteínas de unión. La presencia del ácido hialurónico provoca el desacoplamiento de las CC, mientras que estas células son embebidas en una matriz mucificante (Eppig, 2002). El mantener la estructura tridimensional de los COC's favorece la comunicación entre el ovocito y las CC, lo que permite la correcta maduración del ovocito (Pangas *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009).

Especies Reactivas de Oxígeno y Estrés Oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se forman cuando los electrones libres se escapan de la cadena transportadora de electrones. La generación de ROS por la donación de electrones resulta en moléculas muy reactivas e inestables (Agarwal *et al.*, 2008). Principalmente son generados como producto de la respiración y el metabolismo celular. Los ROS participan en procesos moleculares (Al-Gulbory *et al.*, 2010). Dentro sus funciones encontramos que actúan como segundos mensajeros (Khan y Wilson, 1995), intervienen en las vías de transducción de señales de varios eventos como la embriogénesis foliculogénesis, maduración del ovocito, (Cetica *et al.*, 2001; Agarwal *et al.*, 2008), transcripción, crecimiento y diferenciación celular (Finkel, 1998). Además, actúan en contra de los microorganismos (Khan y Wilson, 1995). Sin embargo, cuando exceden los niveles celulares adecuados producen efectos adversos que pueden incluso conducir a la muerte celular (Al-gulbory *et al.*, 2010). Dentro de los ROS producidos durante la respiración y el metabolismo celular se encuentran el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de

hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot). La formación de O_2^\cdot da lugar a la formación y propagación de ROS dentro y fuera de la célula (Agarwal *et al.*, 2008). La mayor fuente generadora de O_2^\cdot bajo condiciones naturales es la mitocondria (Cadenas y Davies, 2010). El O_2^\cdot puede atravesar la membrana celular y modificar moléculas como lípidos, proteínas y aminoácidos (Guerin *et al.*, 2001). Por otra parte, el H_2O_2 es químicamente estable y tiene la capacidad de traspasar membranas. Los ROS son necesarios en cierta medida para mantener la homeostasis. Un estado provocado por un desbalance entre la presencia de ROS y la capacidad antioxidante celular es el estrés oxidativo (Finkel y Holbrook, 2000). El estrés oxidativo puede intervenir de manera directa en la expresión genética o bien, indirectamente sobre el efecto que ejercen la oxidación de lípidos y proteínas (Luo *et al.*, 2006). Dentro de los sistemas de cultivo *In vitro*, se encuentran factores que inducen un aumento en el estrés oxidativo brindando condiciones subóptimas para el desarrollo. Además, el ambiente externo puede ser una fuente de estrés oxidativo (Agarwal *et al.*, 2006).

Sistema Antioxidante

El mantenimiento de la homeostasis del estado de óxido-reducción (redox) intracelular es dependiente de una compleja red de moléculas antioxidantes (Finkel, 2011). Una de ellas es la molécula glutatión (GSH) que actúa resguardando a la célula del daño oxidativo, es un tripéptido que representa el mayor sulfhidrilo no proteico en las células de los mamíferos (De Matos *et al.*, 2002). Esta molécula se puede presentar de manera reducida como la forma activa como GSH o bien de manera oxidada como glutatión disulfuro (GSSG).

Asimismo, el sistema antioxidante es ayudado por otras enzimas para proteger a la célula contra los ROS (Luberda, 2005). Por otra parte, la molécula GSH requiere de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como fuente de energía para proveer a la célula de GSH (Go y Jones, 2008). Otra enzima que participa en la defensa antioxidante de la célula es la superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la dismutación de O_2^- produciendo H_2O_2 (McCord y Fridovich, 1969). Además, cabe mencionar que las enzimas catalasa y varias peroxidasas como glutatión peroxidasa (GPX), tienen un importante papel como antioxidante, ya que pueden convertir el H_2O_2 en H_2O evitando el daño celular (Devine *et al.*, 2012).

Actividad Antioxidante en la Maduración de Ovocitos *In vitro*

Los COC's presentan enzimas antioxidantes para defenderse del estrés oxidativo. A pesar de que la mayor cantidad de enzimas antioxidantes se encuentran en los COC's, los ovocitos cuentan con su propio mecanismo de defensa para evitar el deterioro provocado por los ROS (Cetica *et al.*, 2001). Sin embargo, el desarrollo de embriones *In vitro* se muestra afectado por las condiciones de cultivo, la presencia de ROS y por el balance intracelular redox. El adicionar antioxidantes al medio de cultivo mejora el desarrollo de embriones (Takahashi, 2012) y protege a los ovocitos contra los ROS y el estrés oxidativo (Devine *et al.*, 2012). La molécula GSH se encuentra implicada en la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito además de proteger al ovocito contra los ROS (Luberda, 2005).

Antioxidantes

Un antioxidante puede ser descrito como una sustancia que en concentraciones menores en comparación con la de un sustrato oxidable puede retrasar o impedir el estrés oxidativo (Halliwell, 1996). Algunos compuestos naturales como los extractos herbales o los tés poseen actividad antioxidante (Aoshima *et al.*, 2007).

Cafeína

La CAFN se encuentra de manera natural en ciertos alimentos pero existe también de forma química (1,3,7-trimetilxantina). La CAFN posee actividad antioxidante (Lee, 2000) actuando como un eliminador de OH^\cdot en concentraciones milimolares (Shi *et al.*, 1991). Además, actúa como antagonista uniéndose a los receptores de adenosina (Riobó y González, 2008), inhibe la PDE3 y aumenta los niveles de calcio intracelular (Rojo-Martínez *et al.*, 2005). Por otra parte, la CAFN en la maduración de ovocitos actúa prolongando el arresto meiótico ya que aumenta los niveles de AMPc (Kren *et al.*, 2004). Kikuchi *et al.*, (2002) mencionan que la CAFN regula la actividad de MPF mediante el complejo Cdc2 y Wee 1 (Figura 2). Por su parte, Bernal-Ulloa *et al.* (2016) afirman que la adición de CAFN previamente a la maduración *In vitro* retrasa la maduración meiótica y mejora el porcentaje de sobrevivencia de embriones bovinos vitrificados. También, mencionan que el efecto inhibitor de la CAFN depende de las concentraciones adicionadas durante las primeras 9 h de cultivo, en cambio 20 h después pierde su efecto inhibitor.

Rhus trilobata

La *Rhus trilobata* (RT) es una planta endémica del Estado de Chihuahua localizado en el Norte de México (Figura 3; Guerrero-Salgado *et al.*, 2016), que

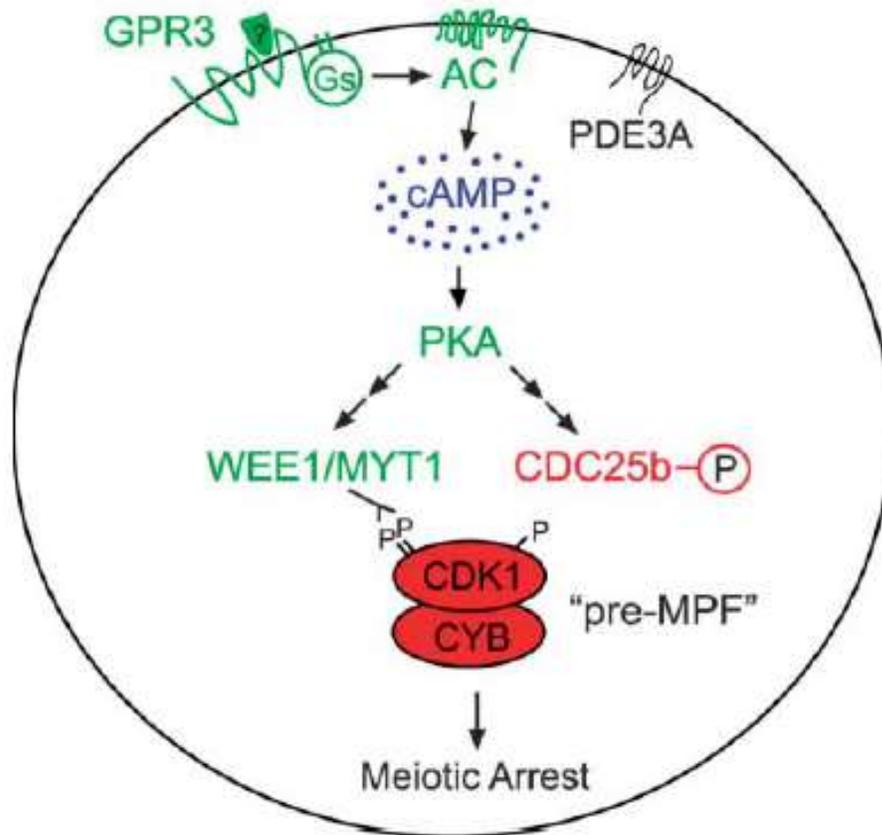


Figura 2. Esquema del control del arresto meiótico

GPR3: Receptor Transmembranal; Gs: Proteína Gs; AC: adenil ciclasa; camp: Adenosín Monofosfato Cíclico; PKA: Proteína quinasa A; cdc25: cd25 Fosfatasa; WEE1 / MYT1: Quinasa WEE1 / MYT1; CDK2 y CYB: Complejo Regulador del Ciclo Celular Mehlmann, 2005



Figura 3. Fotografía de la planta *Rhus trilobata*

Rose, 2015

tradicionalmente se ha utilizado como tratamiento alternativo en forma de infusión en enfermedades estomacales (Jacobó-Herrera *et al.*, 2016) como el cáncer de colón y otros tipos de cáncer como leucemia (Híjar-Soto *et al.*, 2014). La RT es rica en polifenoles, que le brindan un potente efecto antioxidante y anti-inflamatorio (Guerrero-Salgado *et al.*, 2016). Estudios previos realizados por el grupo de investigación de la Dra. Blanca Sánchez-Ramírez han demostrado que esta planta es rica en polifenoles con una gran capacidad antioxidante y proapóptica (Varela, 2013). Este grupo de investigación ha demostrado que el uso de de esta planta como componente de cultivo celular provoca una acción antineoplásica en líneas de células CaCo2 y en macrófagos promueve una acción anti-inflamatoria inhibiendo la expresión de COX-2, iNOs, IL-1, IL-6 y TNF- α (Guerrero-Salgado *et al.*, 2016).

MATERIALES Y MÉTODOS

Maduración *In vitro* de Ovocitos

Ovarios bovinos fueron recolectados del rastro TIF Corrales de San Ignacio S. P. R. de R. L. de C. V., Chihuahua, Chih. Estos fueron transportados en solución salina estéril al 0.15 M a una temperatura ambiente (25 - 35 °C) al laboratorio de Fertilización *In vitro* ubicado en la Facultad de Zootecnia y Ecología de la UACH. En un período no mayor a 3 horas. Una vez en el laboratorio se enjuagaron los ovarios con solución salina estéril a la misma concentración para eliminar residuos hematológicos que pudieran contener, además empleando unas tijeras se retiró el tejido excedente. Se realizó la obtención de los COC's aspirando los folículos con diámetro de 2 - 10 mm apoyados de una aguja BD Precision Glide 18G x 1½" conectada a una bomba (WOB-L® Dry Vacuum Pumps, Standard-Duty, Welch®) con presión de ~5 mmHg. Durante la selección los COC's fueron manejados en medio H-CDM-M. La evaluación y selección se realizó bajo un estereoscopio (Leica MS5), eligiéndose los COC's que tuvieran por lo menos 3 capas de CC compactas. Los ovocitos fueron cultivados en platos de cuatro pozos (Thermo Scientific) con 1000 µl de medio de maduración (IVM) suplementado con el tratamiento correspondiente (CONTROL, CAFN 10 mM, RT 3 µg / ml y CAFN+RT 10 mM + RT 3 µg / ml). La concentración de la CAFN fue la utilizada por Kren *et al.* (2004) mientras que la dosis utilizada para RT fue determinada en un experimento previo. Finalmente, los ovocitos fueron madurados durante 23 h a 38 °C en una atmósfera al 5 % de CO₂ en aire y saturado de humedad.

Experimento 1. Expansión de las Células Cumulares

La expansión de las CC fue evaluada 23 h después al inicio de la maduración *In vitro*. Se clasificó el grado de expansión con ayuda de un microscopio Axiovert CFL40 (Zeiss) de manera subjetiva según lo descrito por Kobayashi *et al.* (1994) en tres categorías (Figura 4): A) compacto, si el COC no se presenta separación entre CC, B) semicompacto, si existe una expansión heterogénea con regiones de células sin expandir y C) expandido, si hay una separación homogénea sin grupos de células compactas.

Experimento 2. Extrusión del Primer Cuerpo Polar

Los ovocitos fueron examinados al término de la maduración para observar la presencia del primer cuerpo polar. Los ovocitos se fueron desprovistos de las CC por medio de remoción mecánica (agitación vigorosa) y con pipeteo gentil en solución amortiguadora fosfato salina (PBS) para facilitar la observación de la presencia del primer cuerpo polar. La evaluación se realizó con ayuda del microscopio Axiovert CFL40 (Zeiss) a un aumento de 10x (Figura 5).

Experimento 3. Niveles Intracelulares de ROS

La medición del nivel intracelular de ROS se realizó 23 h posteriores al inicio de la IVM. El procedimiento utilizado para la determinación del nivel intracelular de ROS fue una combinación de lo descrito por Park *et al.* (2014), Rocha-Frigoni *et al.* (2015) y Rocha-Frigoni *et al.* (2016) con ciertas modificaciones. Se desnudaron los ovocitos por agitación vigorosa y con pipeteo gentil en PBS. Una vez limpios se colocaron en PBS adicionado con alcohol polivinílico (PBS 1X – PVA 1 %) suplementado con 5 μ M 2',7'-

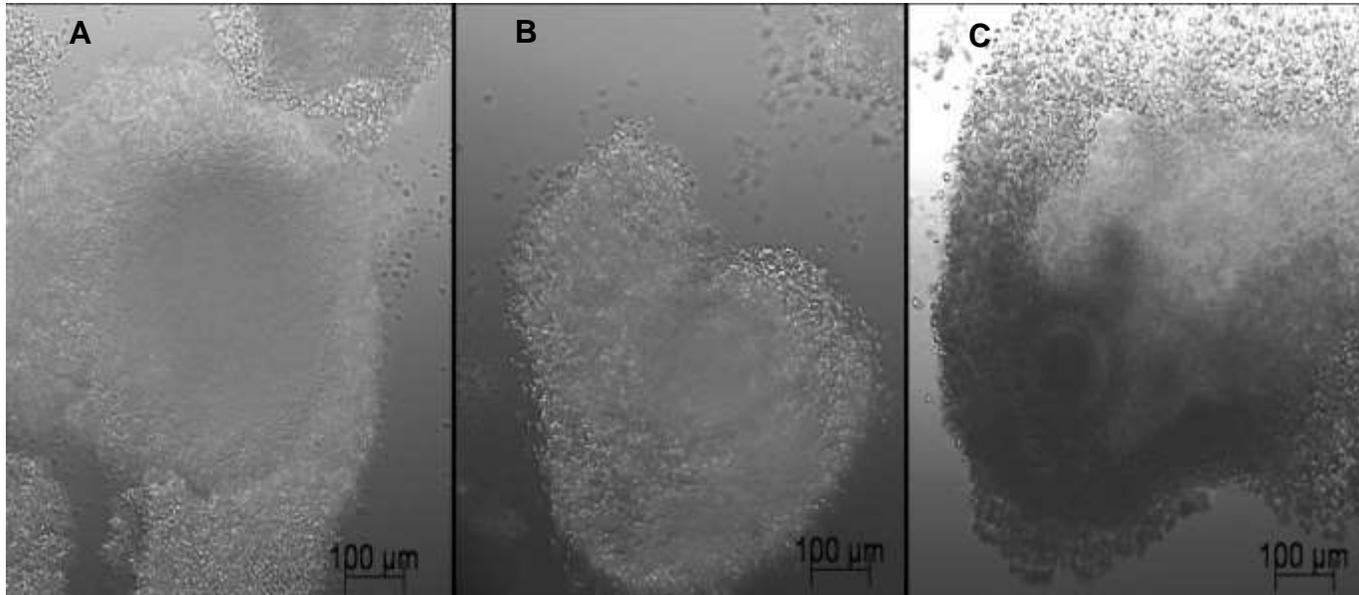


Figura 4. Complejos cúmulo-ovocito (COC's) bovinos exhibiendo tres grados de expansión cumular: **(A)** COC compacto; **(B)** COC semi-compacto y **(C)** COC expandido. Imagen en campo claro 10x tomada con el microscopio Axiovert CFL40 (Zeiss).

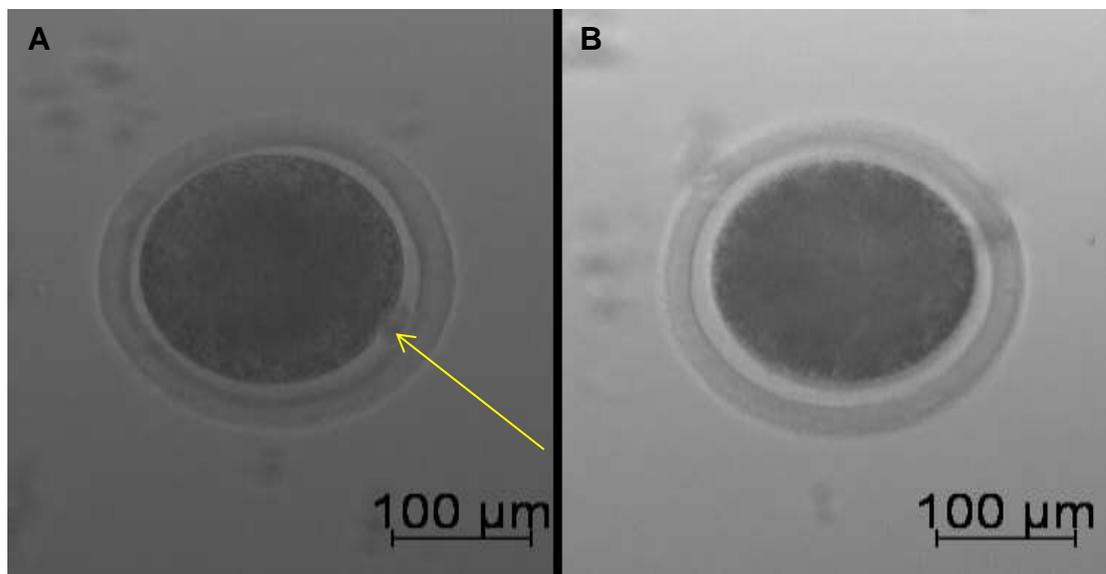


Figura 5. Extursión del CP **A**: Ovocito con extrusión del primer cuerpo polar y **B**: Ovocito sin extrusión del primer cuerpo polar. La flecha indica el cuerpo polar. Imagen en campo claro a 20x tomada con el microscopio Axiovert CFL40 (Zeiss).

Diclorofluorescina diacetato (DCHFDA, sigma Aldrich). Se incubaron durante 30 min a 38.5 °C en una atmósfera al 5 % de CO₂ en aire y saturado de Los ovocitos teñidos fueron lavados dos veces en PBS e inmediatamente se observó la intensidad de fluorescencia en el microscopio invertido Axiovert CFL40 (Zeiss) bajo un filtro de excitación de 450 - 490 nm y de emisión 510 - 515 nm (Figura 6). Para determinar la señal de intensidad de fluorescencia las imágenes observadas en el programa computacional imaging software Zen 2 Pro. Dichas señales fueron normalizadas mediante la siguiente técnica: la señal de intensidad del fondo se le resta a cada valor de intensidad de fluorescencia (píxeles). La muestra experimental del grupo control fue elegida como calibrador y las medias de cada uno de los tratamientos (RT, CAFN y CAFN+RT) fue dividida por la media del grupo calibrador para obtener el valor de ROS en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF).

Experimento 4. Niveles Intracelulares de GSH

El protocolo empleado para la determinación del nivel intracelular de GSH fue una combinación de lo descrito por Park *et al.* (2014), Rocha-Frigoni *et al.* (2015) y Rocha-Frigoni *et al.* (2016) con ciertas modificaciones. Se desnudaron los ovocitos por agitación vigorosa y con pipeteo gentil en PBS, una vez limpios se colocaron en PBS-PVA suplementado con 20 µM de ThiolTracker (Glutathione Detection Reagent; Molecular probes, Invitrogen). Se incubaron durante 30 min a 38.5 °C en una atmósfera al 5 % de CO₂ en aire y saturado de humedad bajo condiciones de oscuridad. Los ovocitos teñidos fueron lavados dos veces con PBS. Enseguida se observó (Figura 7) la intensidad de fluorescencia con el microscopio invertido Axiovert CFL40 (Zeiss)

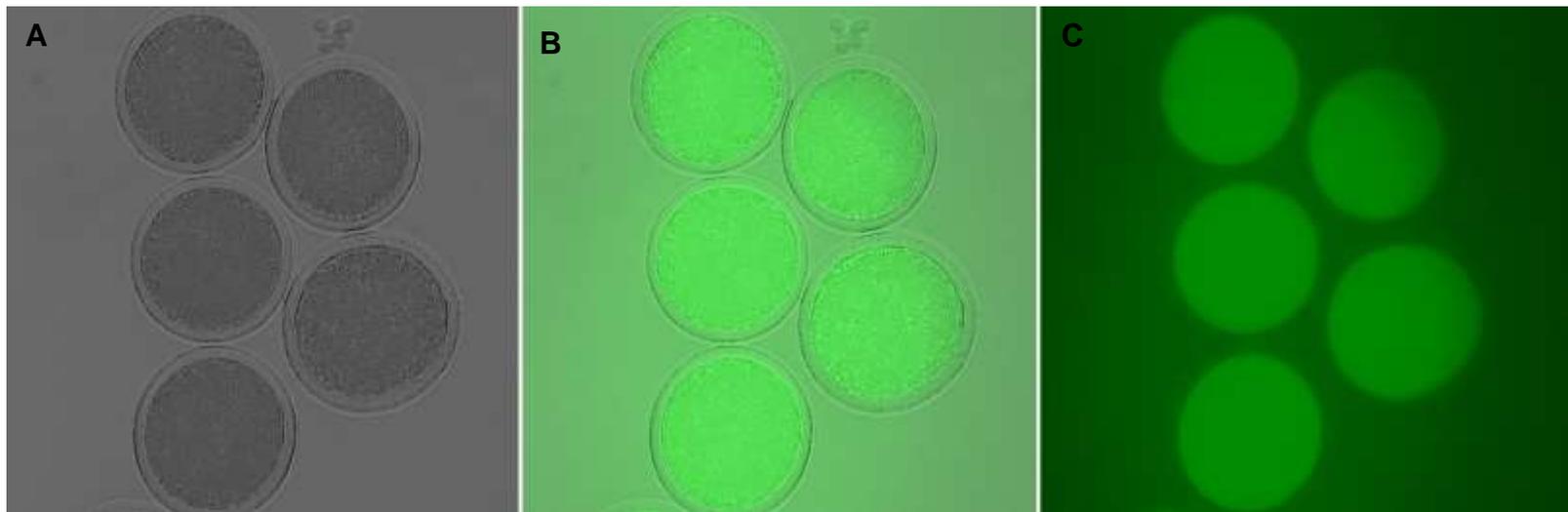


Figura 6. Imagen representativa de los niveles intracelulares de ROS en ovocitos madurados *In vitro*. **A**: campo claro, **B**: sobreposición panel **A** y **C**, y **C**: fluorescencia a 524 nm. Imagen observada en 10x tomada con el microscopio Axiovert CFL40 (Zeiss).

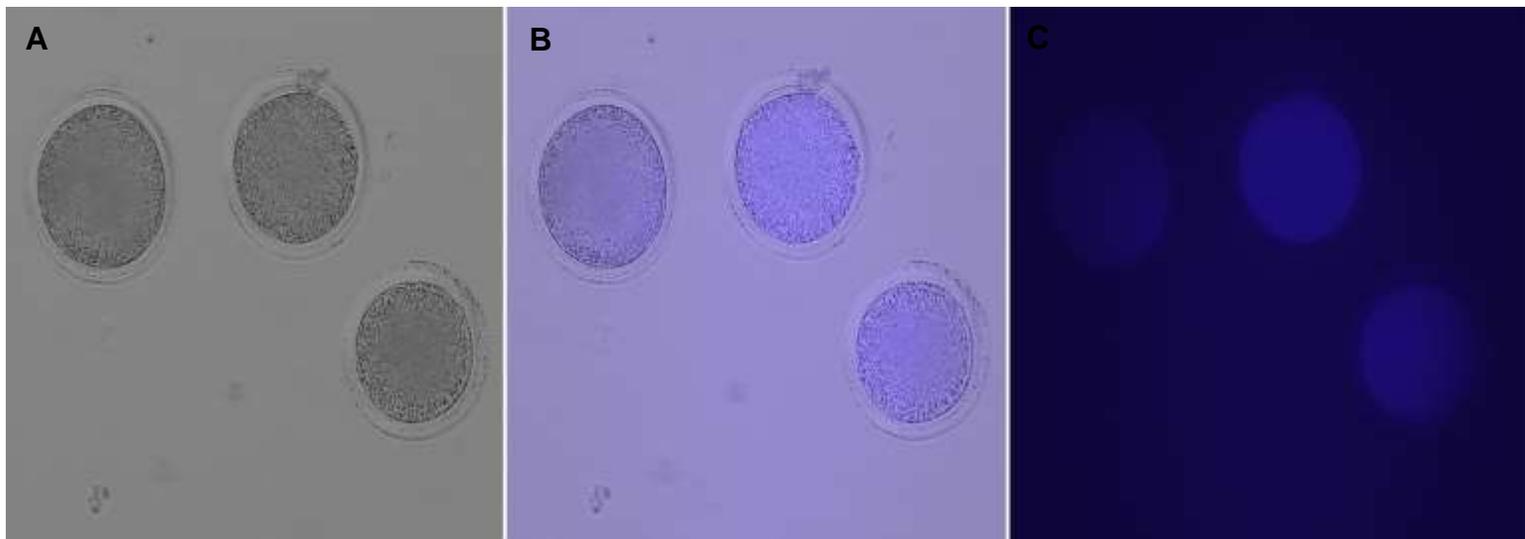


Figura 7. Imagen representativa de los niveles intracelulares de GSH en ovocitos madurados *In vitro*. **A**: campo claro, **B**: sobreposición panel **A** y **C**, y **C**: fluorescencia a 525 nm. Imagen observada en 10x tomada con el microscopio Axiovert CFL40 (Zeiss).

con un filtro de excitación 390 - 420 nm y emisión de 425 - 450 nm. La señal de intensidad de fluorescencia fue analizada en el programa computacional imaging software Zen 2 Pro. Dichas señales fueron normalizadas mediante la siguiente técnica: la muestra experimental del grupo control fue elegida como calibrador y las medias de cada uno de los tratamientos (RT, CAFN y CAFN+RT) fue dividida por la media del grupo calibrador para obtener el valor de GSH en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF).

Experimento 5. Partenogénesis Activación de Ovocitos

Los ovocitos se maduraron durante un lapso de 40 h de acuerdo con Presicce y Yang (1994). La activación se realizó conforme a lo descrito por Kren *et al.* (2004) con algunas modificaciones. Los ovocitos fueron desnudados con agitación vigorosa durante 30 seg suspendidos en medio de manejo H-CDM-1 y con ayuda de pipeteo gentil. Se preparó un plato de cuatro pozos con 500 µl de medio de cultivo CDM-1 por pozo y 1 ml de agua destilada filtrada en el centro. Se adicionaron 5 µM de ionomicina (Sigma Aldrich) a cada pozo y se incubaron durante 5 min a 38.5 °C en una atmósfera al 5 % de CO₂ en aire y saturado de humedad. Enseguida, se preparó un segundo plato de cuatro pozos con 500 µl de medio de cultivo CDM-1 por pozo y 1 ml de agua destilada filtrada en el centro. Se adicionó 4 µM de 6-dimetilalilamino purina (6-DMAP, Sigma Aldrich) para incubar los ovocitos durante 4 h en un ambiente a 38.5 °C en una atmósfera al 5 % de CO₂ en aire y saturado de humedad. Posteriormente, se enjuagaron los ovocitos en un medio químicamente definido para el manejo de embriones tardíos H-CDM-2. Se prepararon platos de cuatro pozos con 500 µl de CDM-2 por pozo y 1 ml de agua destilada filtrada en el centro. Los ovocitos

fueron incubados a 38.5 °C en una atmósfera al 5 % de CO₂ en aire y saturado de humedad. La evaluación embrionaria se llevó a cabo con ayuda del estereoscopio (Leica MS5) 7 d después de la activación química (Figura 8).

Experimento 6. Producción de Embriones *In vitro*

Después de las 23 h de maduración se procedió con la fertilización *In vitro*. Se prepararon platos de cuatro pozos con 430 µl de medio F-CDM por pozo y 1 ml de agua destilada pura en el centro. Se descongelaron pajillas de 0.5 mL en baño maría a 35 °C por 35 segundos. Posteriormente se centrifugó en una solución de percoll con diferentes gradientes de concentración (45 y 90 %) a 1300 rpm por 20 min. Enseguida, se retiró el sobrenadante dejando sólo la pastilla y nuevamente se centrifugó en 4.5 ml de F-CDM a 1300 rpm por 5 min. Enseguida, se retiró el sobrenadante dejando solo la pastilla. Se ajustó el volumen de la pastilla a 1x10⁶ espermatozoides por mililitro. Finalmente, se adicionaron 50 µl de esta dilución a cada pozo para obtener una concentración final de 250, 000 espermatozoides por pozo. Los supuestos cigotos se incubaron a 38.5 °C en una atmósfera al 5 % de CO₂ en aire y saturado de humedad.

A las 18 h post-FIV, los supuestos embriones fueron desprovistos de las células cumulares por agitación vigorosa suspendidos en H-CDM-1 durante 30 seg. Se prepararon platos de cuatro pozos con 500 µl de CDM-1 por pozo y 1 ml de agua destilada filtrada en el centro. Los supuestos embriones fueron incubados en un ambiente con 5 % CO₂, 5 % O₂ y 90 % N₂ a 39 °C en aire y saturado de humedad por lapso de 60 h. Transcurridas las 60 h se observó la segmentación embrionaria. Los embriones que segmentaron fueron cultivados

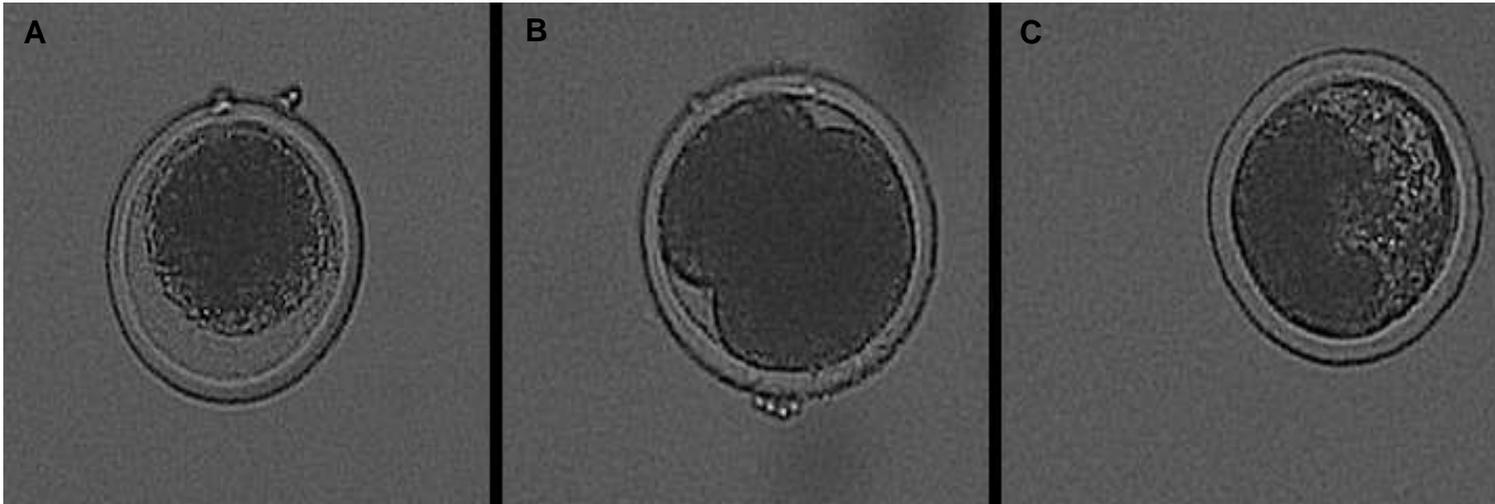


Figura 8. Ovocitos activados por partenogénesis **A**: ovocito sin fertilizar, **B**: embrión de dos células y **C**: Partenote. Imagen en campo claro a 10x tomada con el microscopio Axiovert CFL40 (Zeiss).

en platos de cuatro pozos con 400 μ l de medio CDM-2 bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas durante un lapso de 96 h (Figura 9).

Obtención del Extracto de *Rhus trilobata*

El extracto de *Rhus trilobata* (600 mg / ml) fue brindado por la Dra. Blanca Estela Sánchez Ramírez. Dicho extracto se procesa en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH). A grandes rasgos, se recolectan tallos de la planta *Rhus trilobata* los cuales se lavan y secan. Posteriormente, se procede a la liofilización de la materia vegetal. Una vez liofilizados los tallos se toman 25 g y se añaden 500 ml de solvente (acuoso o metanólico). Posteriormente se centrifuga a 3, 500 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Se obtienen distintas fracciones de este proceso, cada fracción se esteriliza con membranas de 0.22 μ m y se almacenan como soluciones madre a -20 °C (Rodríguez, 2015).

Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos para todos los experimentos fueron realizados con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.0 (SAS Inst. Inc). Para el análisis de la variable expansión de células cumulares se consideraron 278 ovocitos provenientes de tres réplicas. Los datos fueron analizados con el procedimiento CATMOD. Para las variables extrusión del primer cuerpo polar, activación del ovocito y producción de embriones los datos fueron analizados con el procedimiento MIXED ajustando un modelo que incluyó el tratamiento como efecto fijo y la repetición como efecto aleatorio. Las diferencias entre medias se determinaron mediante la sentencia LSMEANS.

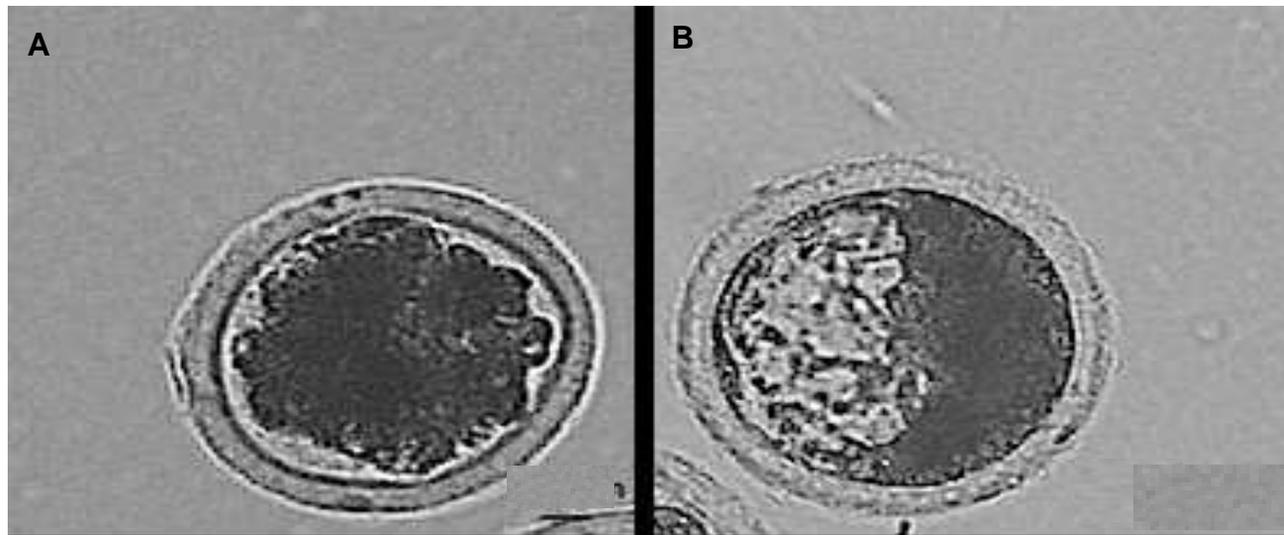


Figura 9. Embriones producidos *In vitro* **A**: mórula y **B**: Blastocito. Imagen en campo claro a 10x tomada con el microscopio Axiovert CFL40 (Zeiss).

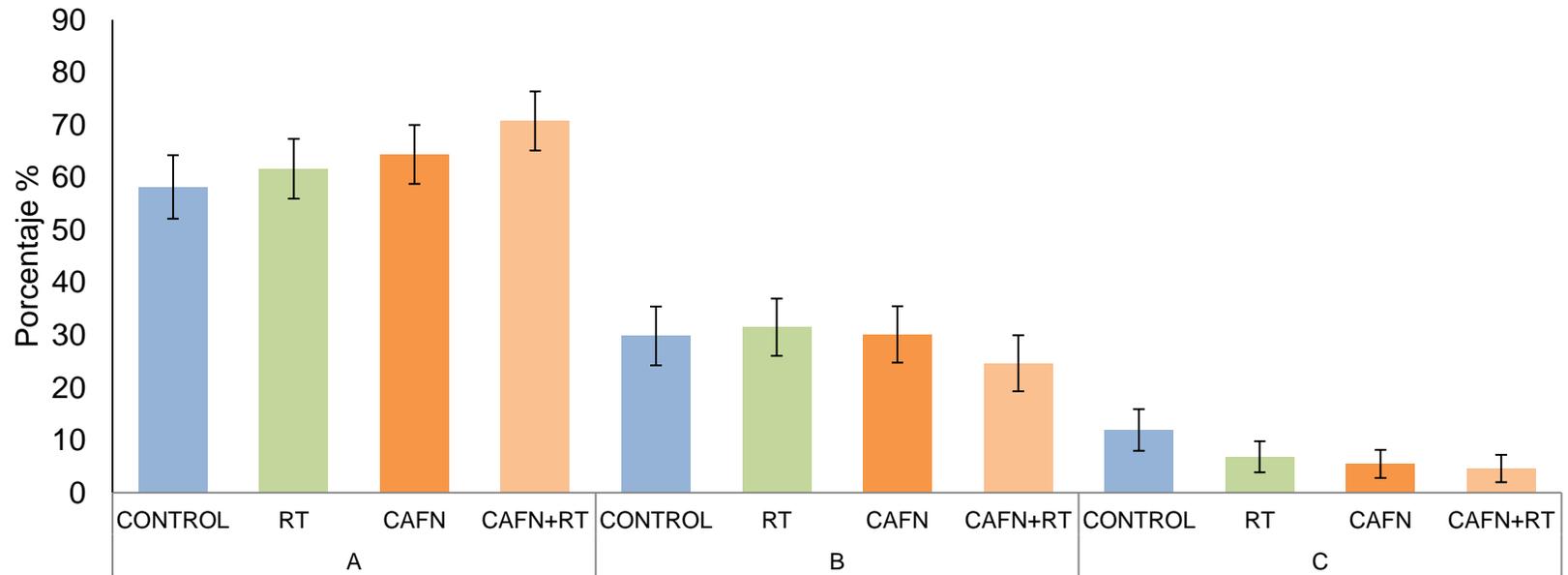
Para variables anteriormente mencionadas se consideraron 512 ovocitos provenientes de cuatro replicas, 361 ovocitos de tres réplicas y 478 respectivamente para cada uno de los experimentos. En cuanto a los niveles intracelulares ROS y GSH fueron considerados 188 y 237 ovocitos, respectivamente derivados de tres réplicas. Se utilizó el procedimiento GLM y al observarse diferencia estadística ($P < 0.05$) las medias fueron comparadas por una prueba de Tukey. Para todos los experimentos se fijó un valor mínimo de alfa en 0.05.

Se debe considerar que: el estado fisiológico de los ovarios para cada experimento fue bastante heterogéneo en cada una de las réplicas. Cada experimento se llevó a cabo de manera independiente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1. Expansión de las Células Cumulares

No se observaron cambios en el grado de expansión de las CC con la exposición a CAFN, RT o CAFN+RT durante la maduración *In vitro*. El porcentaje de COC's en las categorías A, B y C fue similar ($P > 0.05$) para todos los tratamientos (Gráfica 1). Después de las 23 h de maduración la mayoría de los COC's permanecieron dentro de la categoría A (compactos), sólo un bajo porcentaje de ovocitos expandieron. A pesar que no hubo diferencia estadística para ninguna de las categorías entre los tratamientos se observó que la CAFN y CAFN+RT presentaron un mayor efecto inhibitor sobre la expansión CC. Las CC que rodean al ovocito participan en el arresto meiótico mediante uniones GAP (Appeltant *et al.*, 2015), además de ayudar a soportar la maduración citoplasmática (Tanghe *et al.*, 2002). Al expandirse las CC ocasiona una disociación entre las células del cúmulo resultando en una disminución de la comunicación. La reducción de la comunicación intracelular entre el ovocito y las CC induce a la reanudación meiótica (Isobe y Terada, 2001). La CAFN es un inhibidor de la PDE3A (Müller y Jacobson, 2011) que actúa manteniendo altos niveles de AMPc provocando el retraso de la maduración meiótica (Miao *et al.*, 2007). Nogueira *et al.* (2003) suplementaron ovocitos durante la IVM con un inhibidor selectivo de la PDE3 observando que la expansión de COC's no fue modificada por la presencia del inhibidor aunque observaron una tendencia a retener la expansión celular. Chaube *et al.* (2000) proponen que las CC participan en el arresto meiótico mediante el aumento de los niveles AMPc que

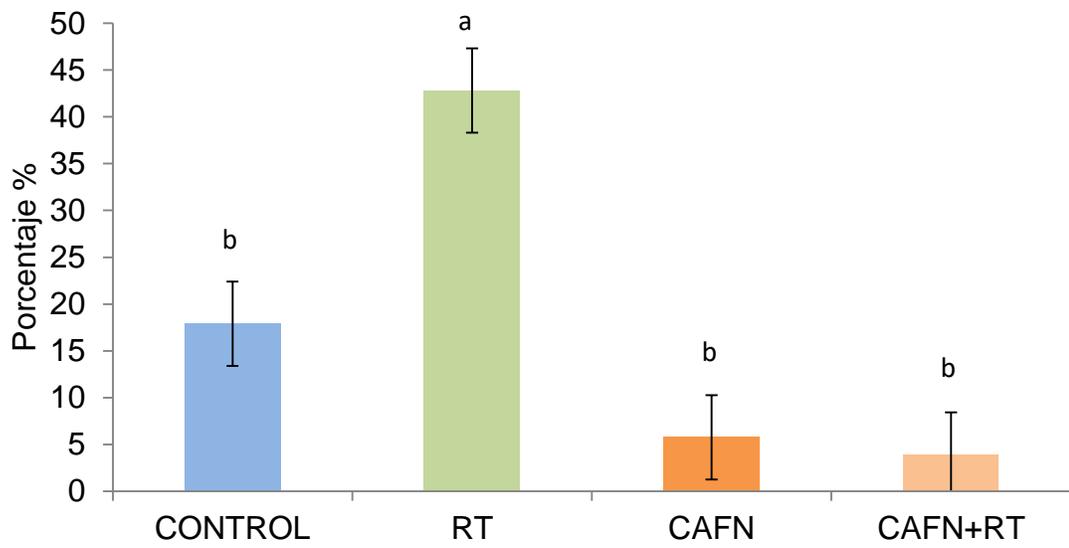


Gráfica 1. Efecto de la Cafeína (CAFN) y *Rhus trilobata* (RT) sobre la organización tridimensional de los COCs. Los COCs fueron madurados y evaluados de acuerdo a su estructura tridimensional en **A**: compactos, **B**: semi-compactos y **C**: expandidos. No hubo diferencias entre los tratamientos ($P > 0.5$). Los datos son expresados en porcentajes \pm E.E.

transfieren al ovocito. Posiblemente, la CAFN actúa aumentando los niveles de AMPc en los COC's provocando que las uniones GAP permanezcan intactas impidiendo la expansión de las CC. Un aumento moderado de los niveles de AMPc durante la maduración podría actuar mejorando la capacidad de desarrollo del ovocito a través de la comunicación bidireccional entre las células de cúmulo y el ovocito (Luciano *et al.*, 2004). Por otra parte, los COC's tratados con RT tenían una mejor apariencia es decir, una distribución más homogénea de las CC que el resto de los grupos. Aunque no hubo diferencia estadística, el efecto favorable de las RT sobre las morfología de los COC's podría deberse a su alto contenido en polifenoles que le permite una mejor comunicación bidireccional. Tal vez, la RT actúa aumentando los niveles de AMPc en las CC de forma moderada durante un lapso más corto que el de la CAFN, favoreciendo a la interacción y permitiendo la maduración. Es importante resaltar que, la CAFN y la RT no habían sido anteriormente utilizadas ni evaluados sobre el grado de expansión de las CC.

Experimento 2. Extrusión del Primer Cuerpo Polar

La RT mejoró ($P < 0.05$) la maduración nuclear del ovocito en comparación con los demás tratamientos. Se observó que la extrusión del primer cuerpo polar se ve beneficiada por la RT (Gráfica 2) durante la maduración *In vitro*. La reactivación meiótica del ovocito es caracterizada por la ruptura de la vesícula germinal hasta completar la primera división meiótica continuando con la segunda división manifestada por la extrusión del primer cuerpo polar. El ovocito vuelve a ser arrestado en metafase II hasta la fertilización (Tripathi *et al.*, 2010). Adicionalmente, la configuración meiótica esta



Gráfica 2. Efecto de la Cafeina (CAFN) y *Rhus trilobata* (RT) sobre la extrusión del primer cuerpo polar. Valores con literales diferentes indican diferencia estadística. ($P < 0.05$). Los datos son expresados en porcentajes \pm E.E.

relacionada con la morfología de los COC's.

Torner *et al.* (1998) encontraron que el 89 % de los COC's compactos se encuentran en la fase de diploteno mientras que 53.8 % de los COC's expandidos se encuentran en metafase de la meiosis II. Por otra parte, la CAFN mostró un potente efecto inhibitor (96.1 % ovocitos inmaduros) sobre la maduración nuclear e impidió el efecto benéfico de la RT.

Estos resultados coinciden con los reportados por Kren *et al.* (2004) donde obtuvieron 95.5 % arrestados en MI después de 24 h de cultivo con CAFN 2.5 mM. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el arresto meiótico depende de la integridad de las CC y comunicación con el ovocito a través de uniones GAP. Altas concentraciones de CAFN (5 mM – 10 mM) favorecen el arresto meiótico de ovocitos madurados *In vitro* (Miao *et al.*, 2007). Adicionalmente, en ovocitos bovinos el tratamiento con CAFN 10 mM 24 ó 30 h posteriores al inicio de la maduración, previene la disminución de MPF y MAPK, además de inhibir la adquisición de competencia (Lee y Campbell, 2006).

A pesar que se desconoce como interviene la RT sobre la maduración, cabe la posibilidad que intervenga directamente en el ovocito. La planta *Rhus verniciflua* induce el arresto meiótico en células cancerígenas a través de la regulación de ciclinas y disminuyendo la actividad de ciclina dependiente de cinasas (CDK2, Kim *et al.*, 2006). La activación de MPF en el ovocito depende de la desfosforilación de un complejo de Cdc2 y ciclina B (Peter *et al.*, 2002). La Cdc2 y las ciclinas participan en el control del ciclo celular (Dorée y Hunt, 2002). Quizás la RT actúo disminuyendo la actividad de PKA en ovocito así como la actividad de Cdc25 manteniendo MPF inactivo por un periodo de tiempo

reducido, permitiéndole al ovocito alcanzar la maduración nuclear durante la maduración *In vitro*.

Experimento 3. Niveles Intracelulares de ROS

Los niveles intracelulares de ROS expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia se muestran en el Cuadro 1. El nivel de ROS incrementó significativamente ($P < 0.05$) en el grupo CAFN comparado con los demás grupos.

La CAFN en concentraciones milimolares (0.4 – 4 mM) exhibe un potente efecto antioxidante actuando específicamente en contra de los radicales O_2^- y OH^- y protegiendo a la célula del daño oxidativo (Devasagayam *et al.*, 1996). Estos resultados sugieren que la CAFN a una concentración de 10 mM pierde su efecto antioxidante. Si bien, no hubo diferencia estadística entre el resto de los tratamientos se observa que la combinación de CAFN+RT disminuye los niveles de ROS en contraste con el grupo CAFN. Por su parte, la RT no mostró tener un efecto significativo en los niveles intracelulares de ROS. Rodríguez (2015) menciona que la RT posee alta capacidad antioxidante en células de cáncer de colon CaCo-2 sugiriendo su uso como posible tratamiento contra enfermedades provocadas por el estrés oxidativo. En un estudio realizado por Rajabi-Toustani *et al.* (2013) utilizaron el extracto de la planta *Papaver rhoeas* obteniendo resultados favorables durante la maduración, lo que demuestra un efecto benéfico dependiente de la concentración administrada. Posiblemente, para observar un efecto significativo de la RT sobre los niveles ROS en el ovocito es necesario probar diferentes concentraciones.

Experimento 4. Niveles Intracelulares de GSH

Cuadro 1. Niveles Intracelulares de ROS

Grupo	No. de Ovocitos	UAF
CONTROL	50	0.9996 ^a
RT	45	1.1805 ^a
CAFN	44	1.6539 ^b
CAFN+RT	49	1.0815 ^a

Diferentes literales indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$).
Los datos son expresados como medias.

Los niveles intracelulares de GSH expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia se presentan en el (Cuadro 2). El nivel de GSH no fue diferente ($P > 0.05$) entre los grupos. La GSH es la principal defensa antioxidante interviniendo en algunas funciones biológicas como: proteger al ovocito contra el estrés oxidativo, participa en la maduración (Curnow *et al.*, 2008), participa en el metabolismo de nutrientes aundado a esto, regula eventos celulares como: la expresión de genes, la síntesis de proteínas, la proliferación celular y en la transducción de señales (Wu *et al.*, 2004). Además está relacionada con la fertilización y con la posterior capacidad de desarrollo (Brad *et al.*, 2003). Contrariamente, Russell y Robker (2007) no encontraron relación entre el contenido de GSH y la capacidad del ovocito para desarrollar competencia.

A pesar que no hubo diferencia estadística entre los grupos se muestra que los grupos CAFN y CAFN+RT incrementaron ligeramente el contenido de GSH. De acuerdo con lo mencionado por Aoyama *et al.* (2011) el tratamiento con CAFN incrementa la concentración de GSH. En nuestro estudio no está claro qué provoca el incremento de GSH. Esto puede deberse a la adición de CAFN o bien a una respuesta del ovocito para tratar de contrarrestar el aumento de ROS debido que el grupo CAFN mostró tener mayor contenido de ROS. Por otra parte, las CC intervienen en la síntesis de GSH (Bing *et al.*, 2002). Esto también podría ser una explicación del aumento de GSH en los grupos CAFN y CAFN+RT debido a que estos grupos presentaron el mayor porcentaje de COC's compactos (64.30 % y 70.77 %). Las plantas contienen gran cantidad de polifenoles que poseen actividad antioxidante (Moskaug *et al.*,

Cuadro 2. Niveles intracelulares de GSH

Grupo	No. de Ovocitos	UAF
CONTROL	61	1.182 ^a
RT	58	1.2716 ^a
CAFN	59	1.6086 ^a
CAFN+RT	59	1.4138 ^a

Literales iguales indican que no hubo diferencia estadística ($P > 0.05$).
Los datos son expresados como medias.

2005), participan contra el estrés oxidativo (Ahmad *et al.*, 2000) y mejoran la concentración de GSH en los ovocitos bovinos madurados *In vitro* (Wang *et al.*, 2007). A pesar de ello, los ovocitos tratados con RT no aumentaron la concentración de GSH.

Experimento 5. Partenogénesis Activación de Ovocitos

En el Cuadro 3, se muestran los resultados de la partenogénesis, donde no hubo diferencias ($P > 0.05$) entre tratamientos. El ovocito para culminar la fertilización requiere forzosamente ser fertilizado por un espermatozoide, esto en si ya involucra entonces una variable más. Para poder saber si tanto CAFN como RT o ambas, eran capaces de mejorar la maduración del ovocito, se requería de un sistema que permitiera evaluar solamente este tipo celular sin incluir la variable espermatozoide.

La partenogénesis es el proceso donde un ovocito sin ser fertilizado y sin reducciones meióticas del cromosoma puede desarrollarse a embriones en etapas tempranas, este tipo de ensayos se utiliza para probar la capacidad del ovocito de ser fertilizado sin necesidad de incluir la variable de espermatozoide (Paffoni *et al.*, 2008). La activación por partenogénesis es útil para investigar las condiciones del medio del cultivo (Kharche y Birade, 2013).

En este estudio, utilizamos la activación del ovocito para determinar el efecto de CAFN, RT ó CAFN+RT sobre la maduración a pesar de que no hubo diferencia estadística ($P > 0.05$) para la división celular entre los grupos, se encontró una mayor cantidad de ovocitos inactivos en el grupo CAFN. La tasa de activación es variada entre especies, mientras que depende la viabilidad del ovocito y método activación (Kharche *et al.*, 2013). En un estudio realizado por

Cuadro 3. Desarrollo ovocitos activados por partenogénesis

División celular	Grupo	Porcentaje \pm E.E.
Una célula	CONTROL	48.60 \pm 11.64 ^a
	RT	29.72 \pm 11.64 ^a
	CAFN	61.41 \pm 11.64 ^a
	CAFN+RT	64.73 \pm 11.64 ^a
Embriones \geq 2 células	CONTROL	51.40 \pm 11.64 ^a
	RT	70.28 \pm 11.64 ^a
	CAFN	38.59 \pm 11.64 ^a
	CAFN+RT	35.27 \pm 11.64 ^a

Literales iguales indican que no hubo diferencias estadísticas ($P > 0.05$). Los datos son expresados en porcentajes \pm E.E.

Nagai (1987) afirma que la tasa de activación para ovocitos envejecidos y activados con etanol es alrededor de 60-68 %.

Kikuchi *et al.* (2000) argumentan que al tratar ovocitos con CAFN reduce la tasa de partenogénesis. Por su parte, Lee y Campbell (2006) activaron ovocitos de ovejas tratados con 10 mM de CAFN observando una reducción significativa en la división celular en comparación con ovocitos tratados con 5 mM. Nuestros resultados sugieren que el tratar ovocitos con 10 mM de CAFN repercute la activación, lo mismo sucede en el grupo CAFN+RT. En cambio, después de la partenogénesis los ovocitos tratados con RT 3 µg / ml incrementaron la activación.

Experimento 6. Producción de Embriones *In vitro*

La adición de RT de los antioxidantes redujo el porcentaje de ovocitos sin fertilizar ($P < 0.05$), a un nivel similar al grupo control, los resultados se muestran en el Cuadro 4. Para los embriones de dos o más células no hubo diferencia ($P > 0.05$) entre los tratamientos. El porcentaje de desarrollo de embriones de 16 ó más células no fue estadísticamente diferente entre los grupos. Sin embargo, se observa una tendencia del grupo RT a incrementar la segmentación (13.31 %) en comparación con el resto de los tratamientos.

Los resultados obtenidos sugieren que adicionar la CAFN al medio de cultivo de maduración de los ovocitos, perjudica el desarrollo embrionario, lo que coincide con lo encontrado con Iwamoto *et al.* (2005) donde obtuvieron un bajo porcentaje de blastocitos suplementando ovocitos porcinos con CAFN 5 mM. Por su parte, Lee y Campbell (2006) no obtuvieron efecto alguno sobre el desarrollo embrionario tratando COC's envejecidos con CAFN. Contrariamente,

Cuadro 4. Producción de embriones *In vitro*

División celular	Grupo	Porcentaje ± E.E.
Una célula	CONTROL	49.44 ± 7.17 ^b
	RT	36.46 ± 7.17 ^b
	CAFN	77.47 ± 7.17 ^a
	CAFN+RT	77.46 ± 7.17 ^a
Embriones ≥ 2 células	CONTROL	38.36 ± 14.92 ^a
	RT	35.38 ± 14.92 ^a
	CAFN	2.66 ± 14.92 ^a
	CAFN+RT	4.80 ± 14.92 ^a
Embriones ≥ 16 células	CONTROL	4.64 ± 3.99 ^a
	RT	13.31 ± 3.99 ^a
	CAFN	1.33 ± 3.99 ^a
	CAFN+RT	1.11 ± 3.99 ^a

Literales diferentes indican diferencia estadística (P < 0.05).
 Los datos son expresados en porcentajes ± E.E.

Fathi *et al.* (2014) reportaron que el adicionar 10 mM de CAFN mejora el porcentaje de fertilización de ovocitos de camellos. El porcentaje de ovocitos fertilizados fue mejorado con la adición de la RT, efecto que podría deberse a su capacidad antioxidante y el efecto que ejerce sobre el control molecular. Es posible, que la RT actúe ayudando al ovocito a adquirir competencia de forma gradual y progresiva. Cabe mencionar que los embriones tratados con RT presentaban mejor aspecto morfológico que el resto de los grupos. Retomando los resultados obtenidos en los demás experimentos, podríamos decir que la RT promueve la maduración de ovocito; tal vez, bajo la regulación de ciclinas y quinasas.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se concluye que la RT ejerce un efecto positivo favoreciendo el desarrollo de competencia de ovocitos bovinos madurados *In vitro* en comparación con la CAFN. Por otra parte, la CAFN es potente inhibidor de la meiosis pero disminuye la viabilidad y la capacidad del ovocito para desarrollar competencia. La combinación CAFN+RT no ejerce un efecto significativo sobre el desarrollo de competencia.

Debido al efecto positivo de la RT sobre la adquisición de competencia se recomienda realizar un estudio a nivel molecular para determinar el mecanismo de acción de RT. Es decir, determinar si la RT actúa sobre las CC y sobre el ovocito. Además, se recomienda utilizar ovarios de vaquillas castradas para obtener menor variación debido a la calidad de la materia prima.

En cuanto al efecto antioxidante tanto de la CAFN como de la RT, se recomienda realizar un estudio probando diferentes concentraciones para determinar su capacidad antioxidante.

LITERATURA CITADA

- Adams E. C., A. T. Hertig y S. Foster. 1996. Studies on guinea pig oocytes. II. Histochemical observations on some phosphatases and lipid in developing and in atretic oocytes and follicles. *Am. J. Anat.* 119:303–39
- Aerts, J. M. J. y P. E. J. Bols. 2010. Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reprod. Dom. Anim.* 45:171-179
- Agarwal, A., S. Gupta, L. Sekhon y R. Shah. 2008. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid. Redox Signal.* 10:1375-1404
- Agarwal, A., T. M. Said, M. A. Bedaiwy, J. Banerjee y J. G. Alvarez. 2006. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil. Steril.* 86: 503-512
- Ahmad, N., S. Gupta y H. Mukhtar. 2000. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor κ B in cancer cells versus normal cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 376:338-346
- Albertini, D. F. y S. L. Barrett. 2004. The developmental origins of mammalian oocyte polarity. In *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press 15: 599-606
- Albertini, D. F. y V. Rider. 1994. Patterns of intercellular connectivity in the mammalian cumulus-oocyte complex. *Microsc. Res. Tech.* 27:125-133
- Albertini, D. F., C. M. Combelles, E. Benecchi y M. J. Carabatsos. 2001. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 121: 647-653
- Al-Gubory, K. H., P. A. Fowler y C. Garrel. 2010. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42:1634-1650
- Aoshima, H., S. Hirata y S. Ayabe. 2007. Antioxidative and anti-hydrogen peroxide activities of various herbal teas. *Food Chem.* 103:617-622
- Aoyama, K., N. Matsumura, M. Watabe, F. Wang, K. Kikuchi-Utsumi y T. Nakaki. 2011. Caffeine and uric acid mediate glutathione synthesis for neuroprotection. *Neuroscience* 181:206-215
- Appeltant, R., T. Somfai, M. Nakai, S. Bodó, D. Maes, K. Kikuchi y A. Van Soom. 2015. Interactions between oocytes and cumulus cells during In vitro maturation of porcine cumulus-oocyte complexes in a chemically

defined medium: effect of denuded oocytes on cumulus expansion and oocyte maturation. *Theriogenology* 83:567-576

Araújo, V. R., M. O. Gastal, J. R. Figueiredo y E. L. Gastal. 2014. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12:78

Bernal-Ulloa, S. M., A. Lucas-Hahn, D. Herrmann, K. G. Hadelers, P. Aldag, U. Baulain y H. Niemann. 2016. Oocyte pre-IVM with caffeine improves bovine embryo survival after vitrification. *Theriogenology* 86:1222-1230

Beyer, E.C., J. Kistler, D. L. Paul y D. A. Goodenough. 1989. Antisera directed against connexin43 peptides react with a 43-kD protein localized to gap junctions in myocardium and other tissues. *J. Cell Biol.* 108:595–605

Bilodeau-Goeseels, S. 2012. Bovine oocyte meiotic inhibition before In vitro maturation and its value to In vitro embryo production: does it improve developmental competence?. *Reprod. Domest. Anim.* 47:687-693

Bing, Y. Z., Y. Hirao, K. Iga, L. M. Che, N. Takenouchi, M. Kuwayama y T. Nagai. 2002. In vitro maturation and glutathione synthesis of porcine oocytes in the presence or absence of cysteamine under different oxygen tensions: role of cumulus cells. *Reprod. Fertil. Dev.* 14: 125-131

Brad, A. M., C. L. Bormann, J. E. Swain, R. E. Durkin, A. E. Johnson, A. L. Clifford y R. L. Krisner. 2003. Glutathione and adenosine triphosphate content of in vivo and In vitro matured porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 64:492-498

Cadenas, E. y K. J. Davies. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29:222-230

Cetica, P. D., L. N. Pintos, G. C. Dalvit y M. T. Beconi. 2001. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte In vitro maturation. *IUBMB life* 51:57-64

Chaube, S. K., S. P. Chaki y M. M Misro. 2000. Effects of pentoxifylline and caffeine on spontaneous maturation of rat oocytes. *Health and Population* 23:177-189

Conti, M., M. Hsieh, A. M. Zamah y J. S. Oh. 2012. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 356:65-73

Curnow, E. C., J. Ryan, D. Saunders y E. S. Hayes. 2008. Bovine In vitro oocyte maturation as a model for manipulation of the γ -glutamyl cycle and intraoocyte glutathione. *Reprod. Fertil. Dev.* 20: 579-588

- De Matos, D. G., B.Gasparrini, S. R. Pasqualini y J. G. Thompson. 2002. Effect of glutathione synthesis stimulation during In vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* 57:1443-1451
- Dekel, N. y I.Sherizly. 1985. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. *Endocrinology* 116:406–409
- Devasagayam, T. P. A., J. P. Kamat, H. Mohan y P. C. Kesavan. 1996. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. *BBA BIOMEMB* 1282:63-70
- Devine, P. J., S. D. Perreault y U. Luderer. 2012. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. *Biol. Reprod.* 86:1-10
- Dorée, M. y T. Hunt. 2002. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner?. *J. Cell. Sci.* 115:2461-2464
- Eppig, J. J. 1991. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays* 13:569-574
- Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122:829-838
- Eppig, J. J., K. Wigglesworth y F. L. Pendola. 2002. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci.* 99:2890–2894
- Erickson, B. H. 1966. Development and radio respons of the prenatal bovine ovary. *J Reprod. Fertil.* 11: 91–105
- Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim. Reprod. Sci.* 78:203–216
- Fair, T., S. C. J. Hulshof, P. Hyttel, T. Greve y M. Boland. 1997. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat. Embryol.* 4:327-336
- Fathi, M., A. A. Seida, R. R. Sobhy, G. M Darwish, M. R Badr y A. R. Moawad. 2014. Caffeine supplementation during IVM improves frequencies of nuclear maturation and preimplantation development of dromedary camel oocytes following IVF. *Theriogenology* 81:1286-1292
- Finkel, T. 1998. Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:248-253
- Finkel, T. 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell. Biol.* 194:7-15

- Finkel, T. y N. J. Holbrook. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-24
- Fortune J. E., S. Kito, S. A. Wandji y V. Srsen. 1998: Activation of bovine and baboon primordial follicles In vitro. *Theriogenology* 49:441–449
- Gilchrist, R. B., M. Lane y J. G. Thompson. 2008. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum. Reprod.* 14: 159-177
- Gittens, J. E. y G. M. Kidder. 2005. Differential contributions of connexin37 and connexin43 to oogenesis revealed in chimeric reaggregated mouse ovaries. *J. Cell Sci.* 118:5071-5078
- Go, Y. M. y D. P. Jones. 2008. Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1780: 1273-1290
- Gougeon, A. 2003. The early stages of follicular growth. In *Biology and pathology of the oocyte*. Edited by Trounson AO, Gosden RG. Cambridge
- Guerin, P., S. El Mouatassim y Y. Menezo. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod.* 7:175-189
- Guerrero-Salgado, F., A. J. Rodríguez-Castillo, R. Infante-Ramírez, M. C. González-Horta, P. Talamás-Rohana y B. Sánchez-Ramírez. 2016. Anti-inflammatory effect of *Rhus trilobata* extracts in lipopolysaccharides-stimulated J774 macrophages. *Toxicology Letters* 259: S194
- Halliwell, B. 1996. Commentary: Vitamin C: Antioxidant or Pro-Oxidant In Vivo?. *ree Radic. Res.* 25: 439-454
- Híjar-Soto, L. E., C. González-Horta, D. Chávez-Flores y B. Sánchez-Ramírez .2016. Apoptotic and cytotoxic effect of bioactive fractions of *Rhus trilobata* on colon cancer cells CaCo-2. *Toxicology Letters* 259:S193-S194.
- Híjar-Soto, L. E., C. González-Horta, D. Chávez-Flores, J. V. Torres-Muñoz y B. Sánchez-Ramírez. 2014. Antineoplastic potential of bioactive fractions of *Rhus trilobata* on colon cancer cells CaCo-2. Páginas 2-6. *Biotechnology Summit 2014*. Santa María Huatulco, Oaxaca, México
- IETS. 2015. 2015 STATISTICS OF EMBRYO COLLECTION AND TRANSFER IN DOMESTIC FARM ANIMALS. En: <http://www.iets.org/index.asp?autotry=true&ULnotkn=true> Consultado 26 de Junio 2017

- Isobe, N. y T. Terada. 2001. Effect of the factor inhibiting germinal vesicle breakdown on the disruption of gap junctions and cumulus expansion of pig cumulus–oocyte complexes cultured In vitro. *Reproduction* 121:249–257
- Isobe, N., T. Maeda y T. Terada. 1998. Involvement of meiotic resumption in the disruption of gap junctions between cumulus cells attached to pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 113:167–172
- Iwamoto, M., A. Onishi, D. I. Fuchimoto, T. Somfai, S. I. Suzuki, S. Yazaki y J. Noguchi. 2005. Effects of caffeine treatment on aged porcine oocytes: parthenogenetic activation ability, chromosome condensation and development to the blastocyst stage after somatic cell nuclear transfer. *Zygote* 13: 335-345
- Kenngott, R. M. y F. Sinowatz. 2007. Prenatal development of the bovine oviduct. *Anat. Histo. Embryol.* 36:272-283
- Khan, A. U. y T. Wilson. 1995. Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chemistry & biology* 2:437-445
- Kharche, S. D y H. S. Birade. 2013. Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for In vitro embryo production: A review. *Adv Biosci Biotechnol.* 4:170
- Kidder, G. M. y A. A. Mhawi. 2002. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction* 123: 613-620
- Kikuchi, K., K. Naito, J. Noguchi, H. Kaneko y H. Tojo. 2002. Maturation/M-phase promoting factor regulates aging of porcine oocytes matured In vitro. *Cloning Stem Cells.* 4: 211-222
- Kikuchi, K., K. Naito, J. Noguchi, A. Shimada, H. Kaneko, M. Yamashita y Y. Toyoda. .2000. Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. *Biol Reprod.* 63: 715-722
- Kim, J. H., H. P Kim, C. H. Jung, M. H Hong, M. C. Hong, H. S. Bae y S. G. Ko. 2006. Inhibition of cell cycle progression via p27Kip1 upregulation and apoptosis induction by an ethanol extract of *Rhus verniciflua* Stokes in AGS gastric cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* 18: 201-208
- Kobayashi K., S. Yamashita y H. Hoshi. 1994. Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- α on In vitro maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocyte in a defined médium. *J. Reprod. Fertil.* 100: 439-446

- Kren, R., S. Ogushi, y T. Miyano. 2004. Effect of caffeine on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote* 12:31-38
- Lee, C. 2000. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clin. Chim. Acta.* 295:141-154
- Lee, J. H y K. H. Campbell. 2006. Effects of enucleation and caffeine on maturation-promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activities in ovine oocytes used as recipient cytoplasts for nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 74:691-698
- Li, R. y D. F. Albertini. 2013. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature reviews. Mol. Cell. Biol.* 14:141
- Li, Y., Li, R. Q., S. B. Ou, N. F. Zhang, L. Ren, N. Wei y D. Z. Yang. 2014. Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12:81
- Luberda, Z. 2005. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol.* 5: 5-17
- Luciano A. M. y V. Lodde. 2013. Changes of large-scale chromatin configuration during mammalian oocyte differentiation. In: Coticchio G, Albertini DF, De Santis L (eds.), *Oogenesis*. London
- Luciano, A. M., F. Franciosi, S. C. Modena y V.Lodde. 2011. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism (s). *Biol. Reprod.* 85:1252-1259
- Luciano, A. M., S. Modena, R. Vassena, E. Milanesi, A. Lauria y Gandolfi. 2004. Role of intracellular cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during In vitro maturation of bovine oocyte. *Biol. Reprod.* 70:465-472
- Luo, Z. C., W. D. Fraser, P. Julien, C. L. Deal, F. Audibert, G. N. Smith y M. Walker. 2006. Tracing the origins Int. J. Biochem. Cell Biol. "fetal origins" of adult diseases: programming by oxidative stress?. *Medical hypotheses* 66: 38-44
- Mattioli, M. y B. Barboni. 2000. Signal transduction mechanism for LH in the cumulus-oocyte complex. *Mol. Cell. Endocrinol.* 161:19-23

- Mauleon, P. 1969. Oogenesis and folliculogenesis. In *Reproduction in Domestic Animals* (H. H. Cole and P. T. Cupps, Eds.), pp. 187-215. Academic Press, New York
- McCord, J. M. y I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055
- McGinnis, L. K., S. D. Limback y D. F. Albertini. 2013. Signaling modalities during oogenesis in mammals. *Curr Top Dev Biol.* 102:227–242
- Mehlmann, L. M. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 130:791-799
- Miao, Y. L., L. H. Shi, Z. L. Lei, J. C., Huang, J. W. Yang, Y. C. OuYang, Y. D. Y. Chen. 2007. Effects of caffeine on in vivo and In vitro oocyte maturation in mice. *Theriogenology* 68:40-645
- Monniaux, D. 2016. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: lessons from genetic models. *Theriogenology* 86:41-53
- Moskaug, J. Ø., H. Carlsen, M. C. Myhrstad y R. Blomhoff. 2005. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am. J. Clin. Nutr.* 81:277S-283S
- Motlik, J., J. Fulka y J. E. Fléchon. 1986. Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation in vivo and In vitro. *J. Reprod. Fertil.* 76: 31-37
- Müller, C. E. y K. A. Jacobson. 2011. Xanthines as adenosine receptor antagonists. In *Methylxanthines* (pp. 151-199). Springer Berlin Heidelberg
- Nagai, T. 1987. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes In vitro with ethanol. *Mol. Reprod. Dev.* 16:243-249
- Nagai, T., J. Ding y R. M. Moor. 1993. Effect of follicle cells and steroidogenesis on maturation and fertilization In vitro of pig oocytes. *J Exp Zool. A Ecol Genet Physiol.* 266:146-151
- Nilsson E., y M. K. Skinner. 2001. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *J Soc Gynecol Investig.* 8:S17–S20
- Nogueira, D., C. Albano, T. Adriaenssens, R. Cortvrindt, C. Bourgain, P. Devroey y J. Smits. 2003. Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor In vitro. *Biol. Reprod* 69:1042-1052

- Paffoni, A., T. A. L. Brevini, F. Gandolfi y G. Ragni. 2008. Parthenogenetic activation: biology and applications in the ART laboratory. *Placenta* 29:121-125
- Pangas S. A., H. Saudye, L. D. Shea y T. K. Woodruff. 2003. Novel approach for the three-dimensional culture of granulosa cell-oocyte complexes. *Tissue Eng.* 9:1013–1021
- Park, S-H., H-S. Cho e I-J. Yu. 2014. Effect of Bovine Follicular Fluid on Reactive Oxygen Species and Glutathione in Oocytes, Apoptosis and Apoptosis-related Gene Expression of In vitro-Produced Blastocysts. *Reprod Domest Anim.*49: 370-377
- Peter, M., C. Le Peuch, J. C. Labbé, A. N. Meyer, D. J. Donoghue y M. Dorée. 2002. Initial activation of cyclin-B1–cdc2 kinase requires phosphorylation of cyclin B1. *EMBO reports* 3:551-556
- Pincus, G. y E. V. Enzmann. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and In vitro: I. The activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.* 62:665–675
- Potau, V. N. y A. Carreño de Puig.2007. Gonadotropinas (LH y FSH) y corticotropina (ACTH). *Endocrinol Nutr.* 54: 109-17
- Presicce, G. A. y X. Yang. 1994. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured In vitro for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. *Mol. Reprod. Dev.*37:61-68
- Prieto-Gómez B. y M Velázquez-Paniagua. 2002. Fisiología de la Reproducción: hormona liberadora de gonadotropinas. *Rev Fac Med.* 45: 252-7
- Rajabi-Toustani, R., R. Motamedi-Mojdehi, M. R. A Mehr y R. Motamedi-Mojdehi. 2013. Effect of *Papaver rhoeas* L. extract on In vitro maturation of sheep oocytes. *Small Rumin. Res.* 114: 146-151
- Riobó, P., y E. González. 2008. Café y diabetes mellitus. *Medicina clínica,* 131:670-675
- Rizos, D., F. Ward P. Duffy, M. P. Boland y P. Lonergan. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development In vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev,* 61:234-248
- Rizos, D., M. Clemente, P. Bermejo-Alvarez, J. de La Fuente, P .Lonergan y A. Gutiérrez-Adán. 2008. Consequences of In vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Domest Anim.* 43:44-50

- Rocha-Frigoni N. A. S., B. C. S. Leão, É. Nogueira y G. Z. Mingoti. 2015. Effect of gaseous atmosphere and antioxidants on the development and cryotolerance of bovine embryos at different periods of In vitro culture. *Zygote* 23:159–68
- Rocha-Frigoni, N. A., B. C. Leão, P. C. Dall'Acqua, y G. Z. Mingoti. 2016. Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured In vitro with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development. *Theriogenology* 86:1897-1905
- Rodríguez-Palomares, I. A., S. B. Pérez-Vega, C. González-Horta, A. García-Triana, E. Salas-Muñoz y B. E. Sánchez-Ramírez. 2014. Antioxidant activity of *Rhus trilobata* plant extracts. *Biotechnology Summit 2014*. Santa María Huatulco, Oaxaca, México
- Rodríguez A. 2015. Evaluación del potencial antioxidante y antineoplásico de los extractos de *Rhus trilobata* en la línea de cáncer de colon caco-2. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua
- Rojo-Martínez, G., S. Morcillo, M. C. Almaraz y F. Soriguer. 2005. Consumo de café y diabetes mellitus. *Endocrinología y Nutrición*, 52:556-563
- Rose, N. 2005. *Rhus trilobata*: Worthy Plant Seeks Worthy Name. *Arnoldia*, 63:23–25.
- Rüsse I. y F. Sinowatz. 1998. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Parey
- Russell, D. L. y A. Salustri. 2006. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. In *Seminars in reproductive medicine* 24:217-227
- Russell, D. L. y R. L. Robker. 2007. Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update*. 13:289-312
- Sánchez F. y J. Smitz. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1822:1896–1912
- SAS versión 9.0. 2002. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Shi, X., N. S. Dalal y A. C. Jain. 1991. Antioxidant behaviour of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food Chem. Toxicol.* 29: 1-6
- Silva, J. R. V., J. R. Figueiredo y R. Van den Hurk. 2009. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology* 71:1193-1208

- Simon, A. M., D. A. Goodenough, E. Li y D. L. Paul. 1997. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*, 385:525
- Sirard, M. A. 2011. Follicle environment and quality of In vitro matured oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 28:483-488
- Suikkari A. M., y V. Soderstrom-Anttila. 2007: In-vitro maturation of eggs: is it really useful? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 21:145–155
- Takahashi, M. 2012. Oxidative stress and redox regulation on In vitro development of mammalian embryos. *J Reprod Dev.* 58:1-9
- Talevi, R. y R.Gualtieri. 2004. In vivo versus In vitro fertilization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 115:S68–71
- Tam P. P. y M. H. Snow. 1981: Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol.* 64:133–147
- Tanghe, S., A. Van Soom, H. Nauwynck, M. Coryn y A. De Kruif. 2002. Minireview: function of cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* 61:414–424
- Tanriverdi F., L. F. Silveira, G. S. MacColl y P. M. Bouloux. 2003. The hypothalamicpituitary- gonadal axis: immune function and autoimmunity. *J. Endocrinol.* 176: 293-304
- Torner, H., K. P. Brüssow, H. Alm, J. Ratky y W. Kanitz. 1998. Morphology of porcine cumulus-oocyte-complexes depends on the stage of preovulatory maturation. *Theriogenology* 50: 39-48
- Tripathi, A., K. V. Kumar y S. K. Chaube. 2010. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. *J Cell Physiol* 223:592-600
- Varela L. R. 2013. Actividad citotóxica de extractos acuoso y en metanol de la planta regional rhus trilobata en la línea celular de cáncer de colon CaCo-2. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih. México.
- Viebahn, C., E. B. Lane y F. C. Ramaekers. 1987. The mesonephric (Wolffian) and paramesonephric (Müllerian) ducts of golden hamsters express different intermediate-filament proteins during developmen. *Differentiation* 34:175-188

- Wang, Z. G., S. D. Yu y Z. R. Xu. 2007. Improvement in bovine embryo production In vitro by treatment with green tea polyphenols during In vitro maturation of oocytes. *Anim Reprod Sci.* 100:22-31
- Wartenberg, H., B. Hilscher y W. Hilscher. 1998. Germ cell kinetics during early ovarian differentiation: an analysis of the oogonial cell cycle and the subsequent changes in oocyte development during the onset of meiosis in the rat. *Microsc. Res. Tech.* 40:377-397
- Wu, G., Y. Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton y N. D. Turner. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 134:489-492
- Xu, M., E. West, L. D. Shea y T. K. Woodruff. 2006. Identification of a stage-specific permissive In vitro culture environment for follicle growth and oocyte development. *Biol Reprod.* 75:916–923
- Xu, M., S. L. Barrett, E. West-Farrell, L. A. Kondapalli, S. E. Kieseewetter, L. D. Shea y T. K. Woodruff. 2009. In vitro grown human ovarian follicles from cáncer patients support oocyte growth. *Hum Reprod.* 24:2531–2540
- Yang M. Y., y J. E. Fortune. 2007. Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles In vitro. *Mol Reprod Dev.* 74:1095–1104
- Zhang, P., H. Chao, X. Sun, L. Li, Q. Shi y W. Shen. 2010. Murine folliculogenesis In vitro is stage-specifically regulated by insulin via the Akt signaling pathway. *Histochem. Cell Biol.* 134:75-82
- Zhang, Y., Z. Zhang, X. Y., Xu, X. S. Li, M. Yu, A. M. Yu, Z. H. Zong, y B. Z. Yu, B.Z. 2008. Protein kinase A modulates Cdc25B activity during meiotic resumption of mouse oocytes. *Dev. Dyn.* 237:3777–3786