

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA**

**FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA**

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

---



**IMPACTO DEL PÉPTIDO IMD/ADM<sub>21-47</sub> SOBRE LA MADURACIÓN *IN VITRO*  
DE OVOCITOS BOVINOS**

**POR:**

**M.C. JESÚS GARCÍA HERNÁNDEZ**

**Disertación presentada como requisito parcial para obtener el grado de  
Doctor in Philosophia**

**Área Mayor: Reproducción y Genética Animal**

**Chihuahua, Chih. México**

**Diciembre 2017**



Impacto del péptido IMD/ADM2<sub>1-47</sub> sobre la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos. Disertación presentada por Jesús García Hernández como requisito parcial para obtener el grado de Doctor in Philosophia, ha sido aprobada y aceptada por:

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

Ph. D. Felipe Rodríguez Almeida  
Encargado del Despacho de la Secretaría de Investigación y Posgrado

D. Ph. Agustín Corral Luna  
Coordinador Académico

D. Ph. María Eduvigis Burrola Barraza  
Presidente

Dra. Verónica Moreno Brito  
Co-Director

4-Dic-2017

Fecha

Comité:

D.Ph. María Eduvigis Burrola Barraza  
Dra. Verónica Moreno Brito  
Dr. Everardo González Rodríguez  
D.Ph. Joel Domínguez Viveros  
Ph.D. Alma Delia Alarcón Rojo

© Derechos Reservados  
JESÚS GARCÍA HERNÁNDEZ  
DIRECCIÓN: PERIFÉRICO FRANCISCO  
R. ALMADA KM. 1, CHIHUAHUA,  
CHIH., MÉXICO C.P. 31453  
DICIEMBRE 2017

## AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la Doctora María Eduvigis Burrola Barraza por creer en mí y darme la oportunidad desde un principio para realizar este proyecto.

A mi esposa e hijos por su incondicional apoyo y la confianza depositada en mí y en este proyecto

A mis padres por ser tan grandes ejemplos en mi vida, su incondicional entrega hacia sus hijos, sus noches de desvelo y ese amor tan grande que sólo ellos pueden dar.

A todos mis asesores y docentes de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la UACH, por compartir ese conocimiento invaluable y creer en sus estudiantes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme proporcionado la beca con número de registro 275702; así como el financiamiento al proyecto de ciencia básica (número 168981): "Identificación de factores parácrinos involucrados en el proceso de competencia".

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a Dios que me mostró el camino y la luz en tiempos de oscuridad y que aunque parezca que estamos solos, él siempre estará a nuestro lado enseñándonos inconscientemente la verdad.

## CURRICULUM VITAE

El autor nació el 6 de Agosto de 1981 en la Ciudad de Durango, Durango México

2005-2010 Estudios de Licenciatura en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la ciudad de Durango, Dgo. Méx.

2010-2012 Maestro en ciencias, en el área de reproducción de rumiantes.

2010-2012 Publicación de diversos trabajos sobre diluyentes seminales en revistas indexadas.

## RESUMEN

IMPACTO DE LA PROTEÍNA IMD/ADM2<sub>1-47</sub> SOBRE LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS BOVINOS

POR:

M.C. JESÚS GARCÍA HERNÁNDEZ

Doctorado en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: D.Ph. María Eduvigis Burrola Barraza

Intermedin/Adrenomedulin2 (IMD/ADM2<sub>1-47</sub>) es un péptido de secreción del ovocito que inhibe apoptosis y promueve interacciones en el complejo cumulus-ovocito (COCs) en ratas. El objetivo fue evaluar el impacto de suplementar el medio de cultivo para la maduración *in vitro* de ovocitos con IMD/ADM2<sub>1-47</sub> para considerarlo como un probable promotor de competencia en ovocitos bovinos. Para evaluar el efecto sobre la compactación celular de los COCs, la maduración nuclear y apoptosis de los ovocitos, grupos de 50 COCs fueron madurados con 15, 153 y 510 µg/ml de IMD/ADM2<sub>1-47</sub> durante 24 h. Los COCs cultivados con 510 µg/ml mostraron una estructura más que compacta (88%±16.32 P < 0.05) y los cultivados en 153 µg/ml tuvieron mayor porcentaje de ovocitos maduros (61%±3.8 P < 0.05) y menor apoptosis (2%±2.3, P < 0.05) que el resto de los tratamientos. No hubo efecto sobre la expresión de los genes *bax* y *bcl2*, por lo que el efecto antiapoptótico IMD/ADM2<sub>1-47</sub>

probablemente involucre la vía extrínseca de apoptosis. Para medir el efecto sobre la producción de AMPc, grupos de 50 COCs se maduraron por 0, 3, 6 y 24 h en 153 µg/ml IMD/ADM2<sub>1-47</sub>, 3 µM Forskolin (FSK) como control positivo, e IMD/ADM2<sub>1-47</sub> +FSK. A las 0 h, el AMPc fue mayor en IMD/ADM2<sub>1-47</sub>+FSK (38.37, P < 0.05) que en el resto de los tratamientos. A la 6 h, las concentraciones de AMPc fueron mayores en el tratamiento de IMD/ADM2<sub>1-47</sub> (70.2 fmol/mL ± 2.3, P < 0.05); y a las 24 h en el tratamiento de FSK (48.9 fmol/mL ± 1.05, P < 0.05). En conclusión la suplementación del medio de cultivo con el péptido IMD/ADM2<sub>1-47</sub> para maduración *in vitro* tiene un impacto benéfico, ya que promueve la interacción célula-célula manteniendo la estructura compacta en el COC, lo que favorece la síntesis de AMPc para impulsar la maduración a MII y la inhibición de apoptosis en el ovocito.

## ABSTRACT

### IMPACT OF IMD/ADM21-47 PEPTIDE IN MATURATION IN VITRO OF BOVINE OOCYTE

BY:

M.C. JESÚS GARCÍA HERNÁNDEZ

Intermedin/Adrenomedulin2 (IMD/ADM2<sub>1-47</sub>) is an oocyte secretion peptide that inhibits apoptosis and promotes interactions in the cumulus-oocyte complex (COCs) in rats. The objective was to evaluate the impact of adding the IMD/ADM2<sub>1-47</sub> to the medium culture for bovine oocyte maturation, with the perspective to be considered as a promoter of competition in bovine oocytes. To evaluate the effect on cell compaction of COCs, nuclear maturation and apoptosis into the oocyte, groups of 50 COCs were matured with 15, 153 and 510 µg/ml of IMD/ADM2<sub>1-47</sub> for 24 h. COCs cultivated at 510 µg/ml showed a more compact structure (88% ± 16.32 P <0.05) and those cultivated at 153 µg/ml had a higher percentage of mature oocytes (61% ± 3.8 P <0.05) and less apoptosis (2% ± 2.3, P <0.05) than the rest of the treatments. There was no effect on the expression of the *bax* and *bcl2* genes, so the anti-apoptotic effect of IMD/ADM2<sub>1-47</sub> probably involves the extrinsic pathway of apoptosis. To measure the effect on cAMP production, groups of 50 COCs were matured for 0, 3, 6 and 24 h in 153 µg/ml IMD/ADM2<sub>1-47</sub>, 3 µM Forskolin (FSK) as a positive control, and IMD/ADM21-47+FSK. At 0 h, the cAMP was higher in IMD/ADM2<sub>1-47</sub>+FSK (38.37, P <0.05) than in the rest of the treatments. At 6 h, cAMP

concentrations were higher in the treatment of IMD/ADM2<sub>1-47</sub> (70.2 fmol/mL ± 2.3, P <0.05); and at 24 h in FSK treatment (48.9 fmol/mL ± 1.05, P <0.05). In conclusion, supplementation with the peptide IMD/ADM2<sub>1-47</sub> to the culture medium for in vitro maturation has a beneficial impact, as it promotes cell-cell interaction by maintaining the compact structure in the COCs, which favors the synthesis of cAMP to improve at MII stage and inhibition of apoptosis in the oocytes.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE GRÁFICAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Foliculogénesis-Ovogénesis.....	4
Comunicación Bidireccional.....	7
1. Comunicación vía uniones GAP.....	7
2. Comunicación mediada por receptores.....	9
Rol del AMPc sobre la Maduración del Ovocito.....	14
Apoptosis.....	18
Intermedin/Adrenomedulin 2(IMD/ADM <sub>21-47</sub> ).....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Determinación de la homología entre las secuencias de aminoácidos de IMD/ADM <sub>21-47</sub> de bovino y humano.....	24
Maduración <i>in vitro</i> de Ovocitos.....	24
Evaluación del Grado de Expansión de las Células Cumulares...	25
Evaluación de la Maduración y Apoptosis en el Ovocito.....	25
Determinación de la Concentración Intracelular AMPc en COC...	27

RT-PCR	Cuantitativa	por	Tiempo	28
Real.....				
Análisis Estadístico.....				30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....				35
Resultado del análisis de homología entre IMD/ADM2 de humano y bovino.....				35
Efecto de la adición de IMD/ADM2 <sub>1-47</sub> sobre la compactación de los COCs.....				40
Efecto de la adición de IMD/ADM2 <sub>1-47</sub> sobre la maduración nuclear.....				41
Efecto de la adición de IMD/ADM2 <sub>1-47</sub> sobre la apoptosis.....				41
Efecto de IMD/ADM2 <sub>1-47</sub> sobre la producción de AMPc en COCs durante el tiempo de maduración.....				47
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....				51
LITERATURA CITADA.....				52

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Página
1	Abundancia relativa del RNAm de los genes <i>bax</i> y <i>bcl2</i> en COCs madurados en presencia o ausencia de IMD/ADM2 <sub>1-47</sub> .....	46
2	Concentración intracelular de AMPc en COCs madurados en presencia de IMD/ADM2 <sub>1-47</sub> , Forskolin (FSK) y ambos.....	49

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Proyecciones Trans-zonales.....	8
2	Uniones GAP.....	10
3	Comunicación bidireccional mediada por receptores.....	12
4	Modelo esquemático que resume las vías de señalización involucradas en el arresto y en la reactivación de la meiosis en el ovocito.....	16
5	Diagrama esquemático de la proteína IMD/ADM2.....	20
6	Vías de señalización activada por la acción del péptido IMD/ADM2, asociado al heterodímero CLR:RAMP.....	22
7	Estrategia experimental para la determinación de la expansión celular, apoptosis y maduración en MII de COCs en presencia de IMD/ADM2.....	32
8	Estrategia experimental para la determinación de la concentración intracelular de AMPc durante el tiempo de maduración <i>in vitro</i> (IVM).....	33
9	Estrategia experimental para el análisis de la expresión relativa de los genes <i>bax</i> y <i>bcl2</i> en COCs madurados en ausencia y presencia de IMD/ADM2 <sub>1-47</sub> .....	34
10	Comparación de la secuencia de aminoácidos del péptido IMD/ADM2 <sub>1-47</sub> bovino y de humano.....	36
11	Concentración óptima de IMD/ADM2 <sub>1-47</sub> sobre el grado de expansión cumular.....	39
12	Efecto de la IMD/ADM2 <sub>1-47</sub> sobre la maduración nuclear del ovocito. ....	42
13	Efecto antiapoptótico de la IMD/ADM2 <sub>1-47</sub> en el ovocito....	44

## INTRODUCCIÓN

En la producción *in vitro* de embriones, los ovocitos inmaduros en profase I pueden obtenerse por aspiración folicular de animales vivos o bien por aspiración folicular de ovarios procedentes del rastro. Sea cual fuere la vía de obtención, una vez que se tienen los ovocitos inmaduros, se someten a un cultivo celular de maduración *in vitro* (IVM por sus siglas en inglés), para inducir su progresión hacia metafase II (MII) y desarrollen el primer cuerpo polar. Después de que los ovocitos son madurados, estos se encuentran aptos para ser fertilizados *in vitro*, donde se genera el segundo cuerpo polar (Hall *et al.* 2013). Posterior a la fertilización, los embriones obtenidos se colocan en cultivo celular y al día siete, ya se pueden observar embriones en la etapa de blastocisto temprano, blastocisto y blastocisto expandido, mientras que al día ocho y nueve se encuentran blastocistos eclosionados. En términos de eficiencia, es importante comprender que en la producción *in vitro* de embriones con ovocitos provenientes de rastro, existe una gran variabilidad en el conjunto de ovocitos que son utilizados, esto es debido a que provienen de ovarios de distintas vacas con distinta fase de ciclo estral y diferente fase de onda folicular. Así que, partiendo del 100% de los folículos aspirados, el 90% de ovocitos inmaduros en profase I pueden llegar a MII, de éstos aproximadamente el 80 % se fertilizan (Lonergan *et al.* 2003), de los cuales sólo del 30 a 40% alcanzan el estadio de blastocisto al día 7 post-fecundación y de los que llegan a esta etapa, sólo el 40 a 50% llegan a concebir una preñez tras su transferencia a una hembra receptora (Rizos *et al.* 2002). Aunque en los últimos cuatro años, los esfuerzos se han enfocado en crear nuevos protocolos de cultivo basados

en factores de crecimiento y hormonas (Gilchrist *et al.* 2008) aún no se ha logrado obtener un sistema que produzca ovocitos IVM competentes que alcance un porcentaje cercano al 80% de blastocitos, como se obtiene con los ovocitos que son madurados *in vivo*. Esto sugiere que el medio de cultivo que actualmente se emplea para la IVM no contiene los elementos necesarios que regulan el correcto desarrollo celular y genético para que el ovocito se desarrolle de manera normal, asegurando su adecuada competencia. Lo anterior impacta en gran medida en la sobrevivencia embrionaria temprana, la cual es adquirida durante la foliculogénesis donde el ovocito es capaz de regular su propio microambiente, a través de la comunicación bidireccional que existe entre éste y las células foliculares que lo rodea. Esta comunicación es mediada por el intercambio de moléculas que se conocen como factores parácrinos secretados por el ovocito (OSF por sus siglas en inglés), cuya función principal es mantener una comunicación entre ambos tipos celulares, de manera que el ovocito sea provisto de los metabolitos necesarios para que se realice una reorganización intracelular, y éste alcance la competencia necesaria para ser fertilizado y continúe su desarrollo embrionario como un nuevo individuo (Chaube 2001; Chang *et al.* 2011). De estos OSF sólo unos cuantos han sido identificados en el bovino, como lo son GDF9 y BMP15; los cuales son capaces de mejorar de un 40% a un 60% la capacidad de maduración *in vitro* del ovocito hasta llegar a blastocisto (Su *et al.* 2009; Li *et al.* 2014). Chang *et al.* (2011) identificaron en ratas, un OSF denominado Intermedin/Adrenomedulin-2 (IMD/ADM2) que actúa inhibiendo la apoptosis, promoviendo la maduración y la estructura tridimensional del complejo cumulus-ovocito (COC por sus siglas

en inglés). Un ovocito competente es aquel que además de estar arrestado MII, no presenta apoptosis y es capaz de fertilizarse por un espermatozoide para generar un blastocisto viable que será implantado en una hembra receptora (Suikkari y Soderstrom-Anttila 2007). Dado que este OSF aún no ha sido probado en el modelo bovino y teniendo la necesidad de mejorar los protocolos de maduración de ovocitos en dicha especie para aumentar el número de blastocitos, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de este péptido sobre la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos para considerarlo como un probable promotor de competencia.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Foliculogénesis-Ovogénesis

La foliculogénesis es el proceso mediante el cual la célula germinal femenina se desarrolla rodeada de las células somáticas del folículo y madura en un ovocito fertilizable (Eppig 2001). La complejidad de este proceso implica la integración de señales tanto endócrinas como parácrinas. El crecimiento del ovocito se inicia durante el periodo prenatal (Voronina y Wessel 2003). En esta etapa, las células primordiales germinales (CPGs) tienen su origen fuera de las gónadas, a partir de las células somáticas presentes en la pared del saco vitelino, que tienen el potencial de convertirse en células germinales. Posteriormente las CPGs migran hacia el borde genital, donde se dividen por mitosis, manteniendo esta actividad durante todo el proceso de migración. La división mitótica de las CPGs se observa a partir del día 13 de vida embrionaria y continúa hasta el día 7 después del nacimiento (Oktem y Urman 2010). Una vez establecidas las CPGs en el ovario, se diferencian en ovogonias por sucesivas divisiones mitóticas, dando origen a las células germinales que tienen un mayor tamaño y se sitúan en la periferia del ovario rodeadas por células foliculares de granulosa planas, conformándose el folículo primordial. Durante el desarrollo fetal, las células germinales se diferencian y se dividen de manera mitótica hasta que entran en meiosis dando origen a los ovocitos primarios (Chaube 2001). Los ovocitos primarios surgen durante la primera división meiótica, dando lugar a lo que se conoce como vesícula germinal (GV, por sus siglas inglés). Todo esto ocurre dentro del folículo primordial donde se inicia la meiosis I y hasta el primer arresto en el estadio de diploteno en la profase I

(Chaube 2001; Mehlmann 2005). Este arresto meiótico se sabe es promovido por una molécula de adenosina mono fosfato cíclico (AMPc) intracelular, que tiene efectos inhibidores en la maduración (Vásquez *et al.* 2006).

Posterior al nacimiento del individuo, los folículos primordiales presentan un desarrollo basal lento en cada ciclo ovárico, así como una activación progresiva de la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa de planas a cuboides alrededor del ovocito, dando origen al folículo primario (Kidder y Vanderhyden 2010).

El folículo primario se caracteriza por tener una capa de células de la granulosa rodeando a un ovocito. Esta etapa del desarrollo es independiente de las gonadotropinas y el folículo culmina con la formación de una zona pelúcida, dando lugar al folículo secundario (Peng *et al.* 2013). En los folículos secundarios de diferentes especies mamíferos se han identificado factores responsables del desarrollo folicular y de la maduración del ovocito, como lo son el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9, por sus siglas en inglés) específico del ovocito y la proteína morfogenética ósea 15 (BMP15, por sus siglas en inglés) que se asocian a la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa (Hussein *et al.* 2005; Hosoe *et al.* 2011). Actualmente se conoce que también actúan como mediadores de la comunicación bidireccional que se da entre células cumulares y ovocito regulando la cooperación metabólica de estos dos tipos de células (Gilchrist *et al.* 2001). La proliferación y diferenciación celular mediada por GDF9 y BMP15, dan origen a una estructura folicular con una cavidad formada por exudado celular que se conoce como folículo terciario, también nombrado como folículo preovulatorio o de Graaf, que

se compone de diferentes tipos de células: 1) las primeras se conocen como células de la granulosa murales, que revisten la pared del folículo formando un epitelio estratificado que se une a la lámina basal y están asociadas a las células de la teca (Hosoe *et al.* 2011); y 2) las células cumulares que rodean al ovocito, conformando lo que se conoce como complejo cumulus-ovocito (COC); que mantienen una comunicación bidireccional por medio de proyecciones citoplasmáticas trans-zonales, a través de las cuales se realiza el intercambio de metabolitos y segundos mensajeros como el AMPc (Russell y Robker 2007). El 99% de los folículos que llegan a la etapa de folículos terciarios están destinados a desarrollar un proceso degenerativo denominado atresia, en donde las células de la granulosa tanto murales como cumulares presentan apoptosis, lo que provoca que detengan su crecimiento y progresión (Rolaki *et al.* 2005). Otsuka *et al.* (2011) indica que los folículos que sobreviven a la atresia, lo logran debido a que presentan una mayor cantidad de receptores para hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) y para la hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés) en la superficie de las células de la granulosa. Esto se encuentra íntimamente relacionado con el grado de vascularización de las células de la teca, que están sobre las células de la granulosa por lo tanto son las células foliculares más externas. Una vez que las células de la teca se vascularizan, comienza a desarrollarse en las células de la granulosa una cavidad denominada antro, la cual se llena de líquido folicular (Palma *et al.* 2012). En este punto el ovocito es capaz de completar la primera meiosis y adquiere la competencia para poder ser

fertilizado y dar paso a el desarrollo de un embrión (Suikkari y Soderstrom-Anttila 2007).

### **Comunicación Bidireccional**

Durante todo el proceso del desarrollo folicular existe una comunicación bidireccional entre el ovocito y las células foliculares que lo rodean, donde se transfieren nutrientes y se activan vías de señalización que benefician a ambos tipos celulares (Kidder y Vanderhyden 2010). Esta comunicación se realiza de dos maneras diferentes: 1) comunicación vía uniones GAP y 2) comunicación mediada por receptores. La importancia de la comunicación bidireccional que se realiza entre estas células, radica en que gracias a este proceso el ovocito tiene la capacidad de culminar la meiosis dando con ello la capacidad de desarrollar competencia, lo que le permitirá ser fertilizado de manera idónea (Palma *et al.* 2012). Para la que la comunicación bidireccional pueda realizarse, es necesario que la membrana celular tanto del ovocito como de las células cumulares que lo rodean, estén lo más cerca posible una de la otra, mediante lo que se conoce como proyecciones trans-zonales (Figura 1), las cuales son proyecciones citoplasmáticas de las células cumulares que atraviesa la zona pelúcida del ovocito (Gilchrist *et al.* 2008). Estas estructuras permiten que se dé el medio ambiente idóneo para que se establezcan comunicaciones tipo GAP o bien una comunicación mediada por receptores.

**1. Comunicación vía uniones GAP.** Estos canales de unión están compuestos por estructuras poliméricas llamadas conexones, que conforman

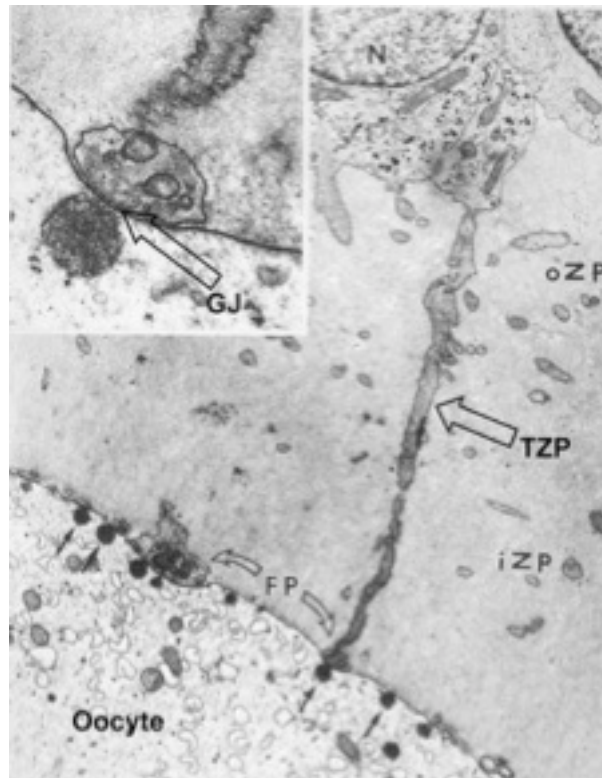


Figura 1. Proyecciones Trans-zonales. Fotografía obtenida con un microscopio electrónico de transmisión del ovocito de un mono. TZP: proyección trans-zonal, GJ: uniones GAP, ZP: zona pelúcida. (Tomada de Gilchrist *et al.*, 2008).

estructuras cilíndricas que estructuran un canal; a su vez estos están formados por unidades proteicas estructurales fundamentales llamadas conexinas (Figura 2), las cuales son esenciales para que la competencia meiótica sea alcanzada en el ovocito en crecimiento (Kidder y Mhawi 2002). A través de estas conexiones se favorece el transporte de moléculas hidrofílicas con un peso molecular de menos de 1 KDa, como lo son nucleótidos, aminoácidos y carbohidratos sencillos, así como iones (Gilchrist *et al.* 2008). Dentro de las conexinas mayormente estudiadas destaca la conexina 37 (Cx37) y la conexina 43 (Cx43). La Cx37 enlaza a las células cumulares con el ovocito, mientras que Cx43 forma uniones entre células cumulares. Según lo menciona Kidder y Mhawi (2002) en ratones deficientes para sintetizar Cx37 se observa una anomalía en el desarrollo folicular a nivel de folículos preovulatorios. Esto se explica, por la falta de comunicación entre células cumulares y el ovocito, limitando la cooperación metabólica y restringiendo la síntesis de factores parácrinos por parte del ovocito que estimulen el desarrollo celular, impidiendo la continuidad del desarrollo guiado por factores endócrinos (Sugiura *et al.* 2007).

**2. Comunicación mediada por receptores.** La comunicación mediada por receptores involucra la acción de una proteína transmembranal, que es reconocida por un ligando; esta unión desencadena una cascada de señalización que culmina en la activación o represión de genes (Liu *et al.* 2006). En el caso de la interacción entre el ovocito y las células cumulares, los ligandos son OSFs que actúan estimulando vías de señalización dentro de las células cumulares (Figura 3). Ya que los OSF son los ligandos que activan

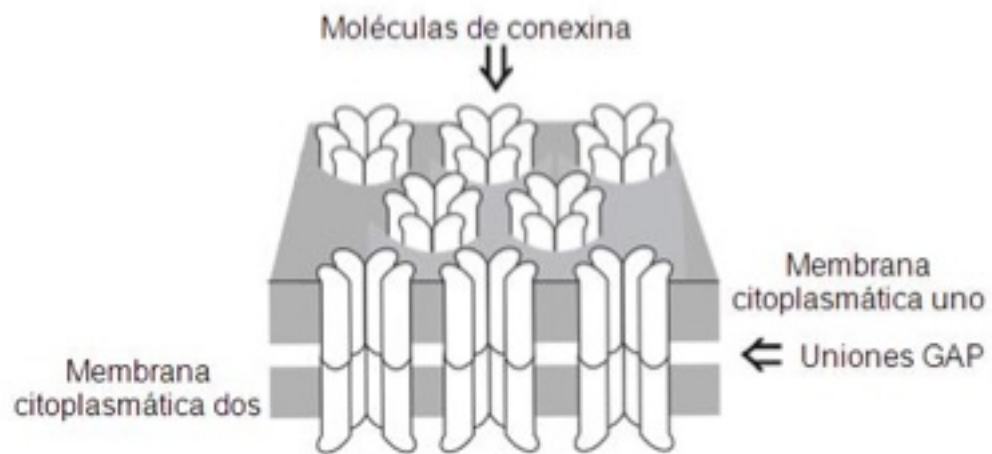


Figura 2. Uniones GAP. Son canales intracelulares generados por proteínas transmembranales denominadas conexinas, las cuales conforman conexomas que atraviesan dos membranas de células continuas. Esquema tomado de Simon y Goodenough, 1998.

determinadas vías de señalización dentro de las células cumulares, se entiende que el ovocito dirige esta maquinaria molecular de acuerdo a sus necesidades (Su *et al.* 2009). Dentro de los OSFs más estudiados destacan GDF9 y BMP15, los cuales pertenecen a la súper familia del factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$  por sus siglas en inglés), cuya vías de señalización involucran a los segundos mensajeros de la vía de proteínas SMAD (Hussein *et al.* 2006). GDF9 se une a la membrana de la célula cumular mediante el reconocimiento del receptor compuesto por las proteínas ALK5 y BMPRII; por su parte BMP15 se une a través del receptor compuesto por ALK6 y BMPRII. Cuando ambos BMP15 y/o GDF9 se unen a sus respectivos receptores, actúan como factores de crecimiento y activan en el citosol la fosforilación en cascada de la proteínas tipo SMAD 2/3 por GDF9, mientras que BMP15 se activa SMAD 1/5/8; ambos tipos de SMAD al estar fosforiladas migran al núcleo de la célula donde se unen a SMAD4 para actuar como un factor de transcripción encendiendo genes que están relacionados con la síntesis de colesterol y glucosa (Gilchrist *et al.* 2008; Russell *et al.* 2016). En diversos mamíferos como bovinos, cerdos, ovejas, ratones, humanos, entre otros; GDF9 y BMP15, tienen un papel fundamental en el funcionamiento ovárico y son esenciales para que el ovocito pueda madurar, ser ovulado y fertilizado (Teixeira Filho *et al.* 2002; Juengel y McNatty 2005; de Castro *et al.* 2016). Wang *et al.* (2013) describen que GDF9 inhibe los niveles de apoptosis en células cumulares de cerdos dado que bloquea la expresión de la proteína pro-apoptótica BIM. Además los estudios *in vivo* empleando ovejas con mutaciones en estos genes revelan deficiencias reproductivas como anomalías en el desarrollo folicular, deficiencia de la

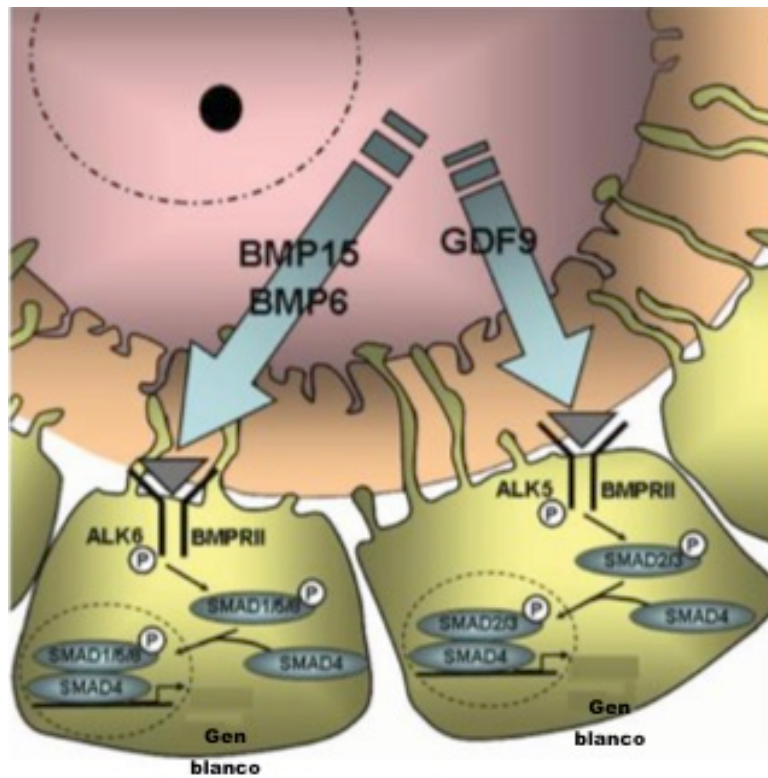


Figura 3. Comunicación bidireccional mediada por receptores. Esquema tomado de Gilchrist *et al.*, 2008

habilidad mitótica, así como problemas durante la ovulación por efecto de una luteinización temprana de las células de la granulosa (Otsuka *et al.* 2011). En humanos, Teixeira Filho *et al.* (2002) encuentra que una alteración en la expresión de GDF9 está relacionada con el síndrome del ovario poliquístico donde se da una foliculogénesis anormal. En bovinos ha quedado demostrado que en el cultivo *in vitro* el uso exógeno de GDF9 y BMP15, promueve el desarrollo de competencia del ovocito dentro del COC, lo que se ve reflejado en un aumento de blastocistos comparando contra el cultivo convencional (Hussein *et al.* 2006; Su *et al.* 2009).

Si bien, GDF9 y BMP15 son los OSFs más estudiados, y se sospecha de la existencia de otras proteínas de secreción que no sólo son secretadas por el ovocito, si no que pueden ser secretadas por las células cumulares y ejercer una acción parácrina dentro del COC (Virant-Klun y Krijgsveld 2014). Teniendo en cuenta que las proteínas que se secretan conforman el secretoma de una célula y que en el caso de los COCs, éste está definido como la cantidad de proteínas secretadas en el medio de cultivo durante el proceso de maduración del ovocito de profase I a MII (Powell *et al.* 2010), dilucidar qué proteínas lo conforman es clave para entender cómo es que este sistema de comunicación bidireccional funciona. En bovinos los estudios se han enfocados a analizar perfiles proteómicos globales tanto del ovocito como de las células cumulares que lo rodean (Memili *et al.* 2007; Peddinti *et al.* 2010). Memili *et al.* (2007) al analizar el proteoma de 500 COCs inmaduros, identificaron 1092 proteínas pertenecientes al ovocito y 4395 pertenecientes a las células cumulares, del total de estas, sólo 858 proteínas fueron comunes en ambos tipos celulares.

Esto indicó que tanto los ovocitos como las células cumulares presentan un perfil proteico exclusivo e independiente. Resultados similares encontro Peddinti *et al.* (2010) quienes idetificaron 371 proteínas comunes en ambos tipos celulares. Por su parte Castro-Valenzuela 2015, realizó un análisis bioinformático en 2167 EST que están reportadas en el NCBI provenientes de librerías de ovocitos bovinos, y encontró 17 proteínas de secreción, es decir, son proteínas que *in silico* muestran todas las características de una proteína de secreción, que podrían participar en como factores parácrinos en los medios de maduración *in vitro*. Aunque estos resultados son alentadores, la totalidad de los factores parácrinos involucrados durante la comunicación bidireccional aún es limitada, por lo que es necesario seguir investigando para poder identificarlos y establecer su funcionamiento dentro del proceso de comunicación bidireccional.

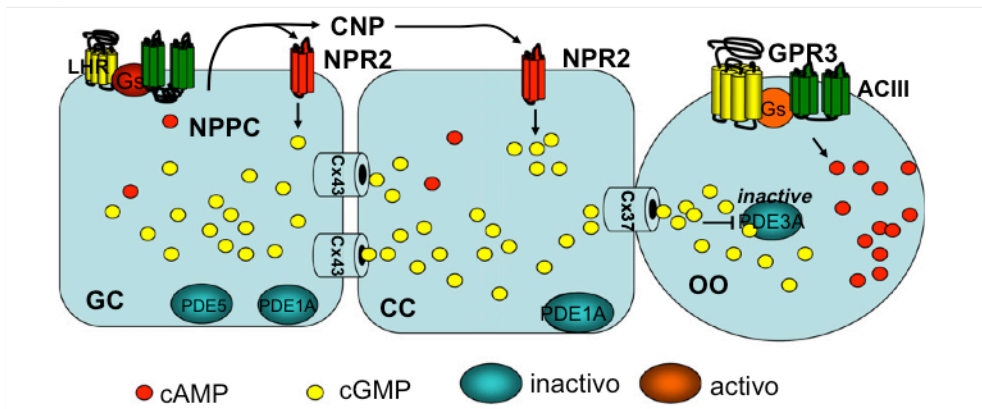
### **Rol del AMPc sobre la Maduración del Ovocito**

Un ovocito en MII es considerado competente cuando es fertilizado. Para llegar a este punto, es crítico que el ovocito tenga la capacidad de salir del arresto en profase I, es decir, que tenga la capacidad de reactivar la meiosis hasta que de nuevo se arresta en MII (Voronina y Wessel 2003). La concentración intracelular del AMPc en el ovocito es importante para la modulación de este proceso (Conti *et al.* 2012). El ovocito se mantiene arrestado en profase I, gracias a su elevada concentración intracelular de AMPc (Figura 4A). 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 o GPR2). Tanto el ovocito como las células de la granulosa que lo

rodean, son capaces de producir AMPc, aunque las cantidades producidas en las células de la granulosa son mucho menores que las producidas en el ovocito. Gracias al estímulo de las proteínas GDF9 y BMP15 las células de granulosa expresan el ARNm del gen *Nppc*, el cual una vez que se traduce y origina el péptido natriurético tipo-C (CNP por sus siglas en inglés) se secreta al espacio extra-folicular, es decir, al espacio extracelular que existe entre las células murales y las cumulares para que posteriormente, sea reconocido por el receptor del péptido natriurético 2 (NPR2 por sus siglas en inglés), el cual está presente en la membrana plasmática tanto en las células granulosa como en las cumulares (Conti *et al.* 2012). Todo lo anterior se ilustra en la figura 4A. La unión de CNP con NPR2 desencadena la producción de guanósín mono fosfato cíclico (GMPc por sus siglas en inglés), que se acumula en el espacio intracelular de las células de la granulosa. Este GMPc logra difundirse de las células murales a las células cumulares 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 fosfodiesterasa tipo 3A (PDE3A por sus siglas en inglés) e inhibe la capacidad de esta enzima para hidrolizar el AMPc, permitiendo así que el AMPc se acumule, de esta manera el AMPc activa a la proteína cinasa A (PKA), la cual fosforila a la enzima Wee1, quien a su vez fosforila a la proteína ciclina dependiente de kinasa 1 (CDK1 por sus siglas en inglés). CDK1 junto con la ciclina-B conforman el complejo denominado factor promotor de maduración (MPF por sus siglas en inglés), y al estar presente la proteína CDK1 provoca que el complejo MPF permanezca inhibido y con esto la meiosis se mantenga arrestada (Conti *et al.*, 2012). Quien termina con el arresto

A).

### Arresto de la Meiosis



B).

### Reactivación de la Meiosis

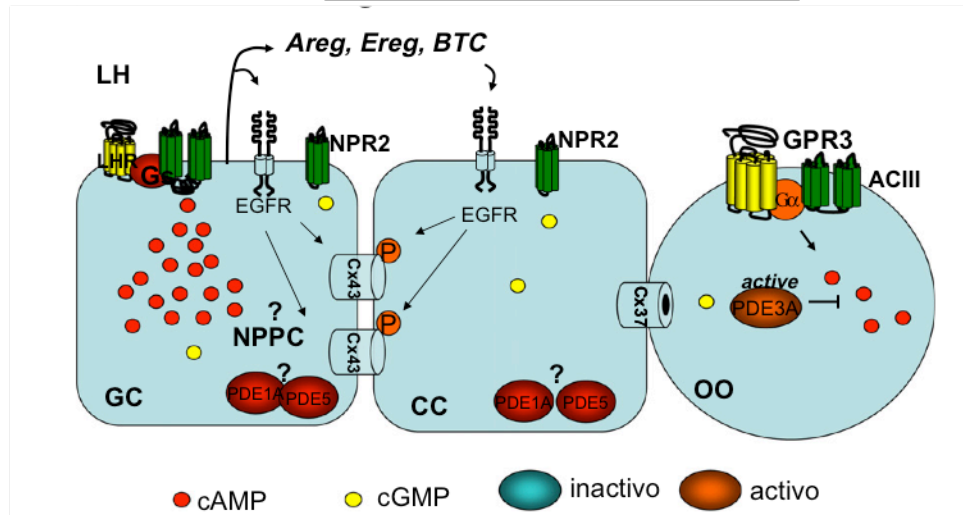


Figura 4. Modelo esquemático que resume las vías de señalización involucradas en el arresto (A) y en la reactivación (B) de la meiosis en el ovocito.

meiótico (Figura 4B) es la hormona luteinizante (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 teca y murales. El receptor LHR es una proteína tipo G al que se une la LH, cuando esto ocurre provoca que se active la vía de la adenilato ciclasa con la posterior producción de AMPc, el cual se acumula en citosol de la célula mural. El AMPc entonces a través de la vía de señalización de PKA, activa la expresión de los factores parecidos a EGF (amfiregulina, epiregulina y  $\beta$ -regulina), los cuales son secretados al espacio interfolicular donde son reconocidos por el receptor de crecimiento epidermal (EGFR) en las células cumulares. Una vez que se da este reconocimiento, EGFR desata la vía señalización de las MAPK/ERK, que fosforila a la Cx43 provocando que esta 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 célula cumular. 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 (Yamashita *et al.* 2009). Wee1B en su estado desfosforilado no tiene acción sobre CDK1 y una vez que Cdc25 está desfosforilada a su vez desfosforila a CDK1. Cuando CDK1 se encuentra desfosforilada se activa y se une a la ciclina-B, activándose el complejo MPF; el cual 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 MII, donde de nuevo es arrestada (Conti *et al.*, 2012).

### **Apoptosis**

A nivel celular la apoptosis se caracteriza por una fragmentación nuclear y citoplasmática, que conlleva a la muerte celular (Hussein 2005). En el ovario, la apoptosis a través de la atresia folicular causa la eliminación de más del 99 % de las células germinales, dejando sólo el 1 % de células para culminar la ovogénesis (Tiwari *et al.*, 2015). Estas células germinales que logran sub-existir a la atresia, entran en meiosis y se diferencian en ovocitos primarios, en cuyo estado sucede el arresto en profase I, el cual dura meses o años dependiendo de la especie de mamífero (Pandey *et al.* 2010; Tripathi *et al.* 2010). En este punto los ovocitos arrestados están rodeados por células de la granulosa, aquí la comunicación bidireccional es vital para que ambas células sobrevivan y eviten de nuevo la apoptosis (Chaube 2001; Chaube *et al.* 2005). Hussein *et al.* 2005 demuestran que en COCs de bovinos mantenidos *in vitro* tras la maduración, las células que presentan niveles más altos de apoptosis son las que se encuentran más externas al ovocito; mientras que las células que están en contacto directo con el ovocito no muestran apoptosis. El control anti-apoptótico en estas células es mediado tanto por factores endócrinos como parácrinos, que actúan reprimiendo la activación de la caspasa-3 y la subsecuente fragmentación del ácido desoxirribonucleico (DNA por sus siglas en inglés). Dentro de estos factores destaca la acción del estradiol, factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1 (IGF-1 por sus siglas en inglés), FSH, factor de crecimiento epidermal (EGF, por sus siglas en inglés) e interleucinas

tipo 6 (IL-6), los cuales activan señalizaciones que bloquean la acción de proteínas apoptóticas (Tiwari *et al.* 2015), cuando estos factores de crecimientos no ejercen su acción, la fragmentación del DNA es mediada por el apoptosoma (Matsuda *et al.* 2012).

### **Intermedin/Adrenomedulin-2(IMD/ADM2<sub>1-47</sub>)**

Chang *et al.* (2011) encontraron un nuevo ligando secretado por el ovocito de la rata, que previamente había sido identificado por Roh *et al.* (2004) y Takei *et al.* (2004) como Intermedin/Adrenomedulin-2 (IMD/ADM2), la cual pertenece a la familia de péptidos provenientes en los genes CGRP- $\alpha$  y CGRP- $\beta$ , como la calcitonina, amilina y adrenomedulin, los cuales actúan en la homeostasis cardiovascular. El gen que codifica para el péptido IMD/ADM2, expresa una proteína de 148 aminoácidos, denominada prepro-IMD/ADM2, y después de ser traducido, es procesado proteolíticamente para formar 6 péptidos (Figura 5), de los cuales únicamente los péptidos IMD/ADM2<sub>1-53</sub>, IMD/ADM2<sub>1-47</sub> e IMD/ADM2<sub>8-47</sub> tienen actividad biológica (Ni *et al.* 2014a). De éstos sólo el péptido IMD/ADM2<sub>1-47</sub> es secretado por el ovocito y es reconocido en las células cumulares por medio de un receptor, conformado por un heterodímero que está compuesto por la proteína receptor parecido a calcitonina (CLR, por sus siglas en inglés) en combinación con una de las proteínas receptor de proteínas de acción modificada (RAMPs, por sus siglas en inglés) que pueden ser RAMP1, RAMP2 o RAMP3 (Kuwasako *et al.* 2011). Este complejo de proteínas regula una cascada de señalización vía proteínas G que activa la adenilato ciclasa produciendo un aumento intracelular del AMPc,

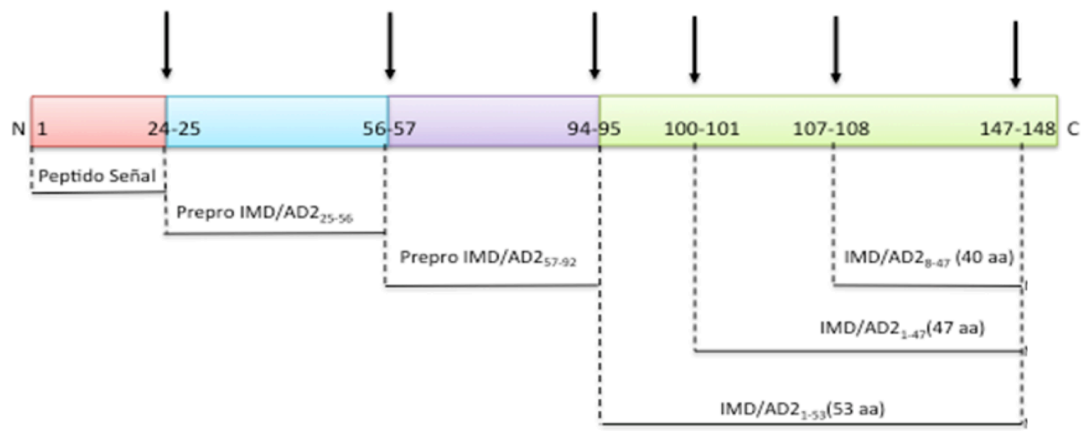


Figura 5. Diagrama esquemático de la proteína IMD/ADM2 (148 aa), mostrando los seis péptidos resultantes después del corte proteolítico postraduccional. Las flechas indican los sitios de corte.

que a su vez provoca que se active la vía de señalización de las proteínas cinasa-A (PKA por sus siglas en inglés), resultando en la fosforilación de múltiples proteínas, lo que desencadena diversas vías de señalización como lo son MAPK/ERK y CREB, entre otras; las cuales terminan en la activación de genes (Figura 6) (Hong *et al.* 2012). Tanto en humano como en rata, estos péptidos son ampliamente expresados en ovario, útero, placenta, cerebro, corazón y glándula pituitaria; donde su acción se relaciona con procesos anti-apoptóticos y de vasodilatación (Chauhan *et al.* 2009; Chauhan *et al.* 2011). A nivel reproductivo la acción de IMD/ADM2<sub>1-47</sub> se ha confinado a la regulación del ovocito (Chang *et al.* 2011), invasión y migración del trofoblasto (Chauhan *et al.* 2009) y durante el desarrollo embrionario (Chauhan *et al.* 2011). Wong *et al.* (2013) mostraron que en ratas bajo un protocolo de gonadotropinas, la IMD/ADM2<sub>1-47</sub> estaba más elevada en la fase del diestro que en el estro. Chang *et al.* (2011) después de realizar un análisis bioinformático con secuencias EST de ovocitos de rata, identificaron que la secuencia de aminoácidos de éste péptido presentaba un péptido señal de secreción. Después de evaluar su efecto adicionándola de forma recombinante en el medio de cultivo de maduración de COCs de rata, mostraron que la IMD/ADM2<sub>1-47</sub> actúa como OSF dado que mantuvo la estructura tridimensional de los COCs, manteniéndolos en una estructura compacta con una alta expresión de Cx43, dicha estructura se desestabilizó cuando se le adicionó al cultivo un anticuerpo anti-IMD, donde la expresión de Cx43 disminuyó. Por otro lado, al adicionar este péptido en cultivo de células cumulares, se incrementó la concentración de AMPc y la producción de estradiol, además de que se inhibió

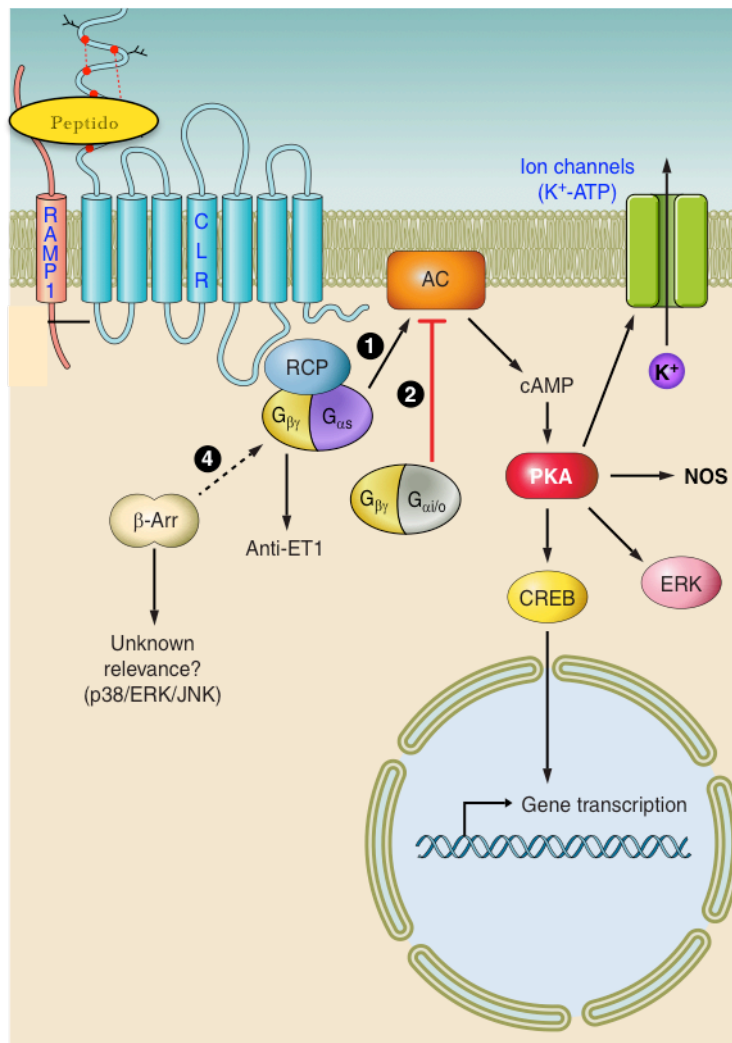


Figura 6. Vías de señalización activada por la acción del péptido IMD/ADM2, asociado al heterodímero CLR:RAMP. Ilustración tomada de Russell *et al.* (2007).

la expresión de las caspasa-3 y 7, proceso que se revirtió cuando se adicionó el anticuerpo anti-IMD. Por último, al adicionar un anticuerpo anti-IMD en el medio de cultivo sin IMD/ADM2<sub>1-47</sub> pero con FSH, la estructura compacta disminuyó notablemente en comparación con el control, esto mismo paso cuando se adicionó por separado al medio de cultivo el GCRP8-37 (inhibidor del receptor CLR/RAMP1) y el IMD17-47 (inhibidor de IMD/ADM2). Estos resultados implicaron que el péptido IMD/ADM2 actuó después de la FSH, promoviendo la comunicación entre el ovocito y las células cumulares vía Cx43, así como la reactivación de meiosis del ovocito dado que aumenta la concentración de AMPc y estradiol en células cumulares, y al inhibir la expresión de las caspasas 3 y 7 tiene un efecto antiapoptótico en las células cumulares.

A la fecha en el modelo bovino no existe ningún reporte que describa el modo de acción de la IMD-ADM2 en el proceso de maduración de ovocitos bovinos. Siendo los modelos de ratas y bovinos tan parecidos es de esperar que este péptido tenga una acción similar en ambas especies. Existiendo la necesidad de mejorar los protocolos de maduración *in vitro* para aumentar los porcentajes de blastocistos bovinos, resulta interesante probar la hipótesis de que, si el adicionar este péptido a los medios de cultivo de maduración se promueve, al igual que en rata, una mejora en la adquisición de competencia provocando que el ovocito madure y sea capaz de fertilizarse.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Determinación de la homología entre las secuencias de aminoácidos de IMD/ADM2<sub>1-47</sub> de bovino y humano.**

Dado que a la fecha aún no existe en el mercado ninguna marca comercial que maneje el péptido IMD/ADM2<sub>1-47</sub> recombinante bovino, se decidió probar si el IMD/ADM2<sub>1-47</sub> recombinante humano de la marca NeoBiolab pudiera servir de forma análoga al IMD/ADM2<sub>1-47</sub> bovino. Para lo cual, se realizó un análisis bioinformático para comparar la secuencia de aminoácidos del IMD/ADM2<sub>1-47</sub> bovino y humano. El resultado indicó que existe un 87% de identidad entre ambos péptidos (Figura 10a), lo que implicó que la diferencia fue mínima. Sin embargo, se tenía que tener claro que el reconocimiento de la IMD/ADM2<sub>1-47</sub> humana por el receptor CLR/RAMP1, 2 ó 3 bovino se daría de la misma forma que como se da con la IMD/ADM2 bovina. La característica de la estructura terciaria del péptido IMD/ADM2<sub>1-47</sub> es que hacia su extremo amino-terminal tiene un bucle de seis aminoácidos flanqueados por un puente disulfuro, seguido por un dominio  $\alpha$ -hélice y termina hacia el extremo carboxilo en un residuo de tirosina (Bell y McDermott 2008).

### **Maduración *in vitro* de Ovocitos.**

Los ovarios de bovino fueron recolectados del rastro Tipo Inspección Federal (TIF) Corrales de San Ignacio, S.P.R. de R.L. de C.V. el cual se encuentra ubicado en Periférico Lombardo Toledano 13401, Colonia Aeropuerto, Chihuahua, Chih. Los ovarios fueron transportados en cloruro de sodio estéril al 0.15 M a temperatura ambiente al laboratorio de Fertilización *in vitro* de la Facultad de

Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH) en un periodo no mayor a 3 horas. Posteriormente, éstos se limpiaron con NaCl estéril de la misma concentración para retirar restos hematológicos. Para obtener los COC, se aspiraron los folículos de menos de 10 mm de diámetro con ayuda de una aguja BD Precision Glide 18Gx1 1/2" que fue conectada a un sistema acoplado a una bomba (WOB-L® DryVacuum Pumps, Standard-Duty, Welch®) utilizando succión al vacío con una presión de ~20-25 mmHg. Los COCs fueron manejados en medio H-CDM-1 y con ayuda del estereoscopio (Leica MS5) se seleccionaron ovocitos con al menos 3 capas de células cumulares compactas. Posteriormente se cultivaron en platos de cuatro pozos (ThermoScientific), en grupos de 50 COCs por pozo, en 1000 µl de medio de maduración (IVM) de ovocitos (FSH 1µl/ml, EGF1µl/ml, Estradiol 17β 10µl/ml, cisteamina 10µl/ml y el péptido recombinante humano IMD/ADM2 (cat. no. 54832, NeoBiolab) en dosis crecientes similares a las utilizadas por Chang *et al* (2011), 0, 15, 153 y 510 µg/ml, a 38.5°C con 5% CO<sub>2</sub> saturado de humedad en el aire durante 23 h; como control se utilizó el medio de cultivo en ausencia de IMD/ADM2. Posteriormente 25 COCs fueron evaluados para identificar el grado de expansión cumular y 25 COCs se utilizaron para evaluar la maduración y apoptosis en el ovocito.

### **Evaluación del Grado de Expansión de las Células Cumulares.**

Posterior a someterse los ovocitos al proceso de IVM, 25 COCs fueron observados en el microscopio Axiovert 40 CFL (Zeiss) y se clasificaron cada uno de ellos en tres categorías: 1. Compactos, 2. Semicompactos y 3. Expandidos.

### **Evaluación de la Maduración y Apoptosis en el Ovocito**

Después del proceso de IVM, en un plato de cuatro pozos se depositaron 200 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS por sus siglas en inglés) y Polivinil pirrolidona (PVA por sus siglas en inglés) al 1% por pozo, donde se lavaron grupos de 25 COC tres veces, luego fueron desprovistos de las células cumulares por medio de agitación vigorosa con hialuronidasa. Posterior a esto, los ovocitos desnudos fueron transferidos a una placa de 96 pozos, con la menor cantidad posible de PBS-PVA y se fijaron agregando 100 µl de paraformaldehído (PFA) al 4% y 100 µl de PBS, para reducir la concentración del PFA al 2%, se incubó por 60 min, a temperatura ambiente en condiciones de poca luz, luego se centrifugó la placa a 300 gravedades (xg) durante 10 min a temperatura ambiente, subsecuentemente se retiró el PFA al 2% con una pipeta Pasteur, teniendo cuidado de no aspirar los ovocitos. En seguida se adicionó 200 µl de PBS y se centrifugó a 300 xg por 10 min, se aspiró la mayor cantidad posible de PBS y se adicionó 100 µl de solución permeabilizante (tritón 100 X al 0.1 % en citrato de sodio al 0.1 %) y se incubó en hielo por 2 min, para luego lavarse dos veces en 200 µl de PBS-PVA. Una vez lavados, se utilizó el kit de fluorescencia para muerte celular (*In Situ* Cell Death Detection Kit Fluorescein, Roche) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Brevemente, los ovocitos se colocaron en un plato de 96 pozos y se les adicionó la solución de reacción Túnel (1 µl solución de enzima terminal deoxinucleotidil transferasa (TDT por sus siglas en inglés) más 9 µl de solución de marcaje con Deoxinucleotidil trifosfato (dUTP's por sus siglas en inglés). Se protegió el plato de la luz envuelto con papel aluminio y se incubó en la 38.5 °C por 60 min, para luego realizar un lavado con en 500 µl de PBS. Posterior a esto, los ovocitos fueron transferidos en gotas de 50 µl del fluorocromo Hoechst

en PBS (25 mg/ml) y se incubó durante 30 min a 38.5°C. Por último, los ovocitos fueron colocados en 10 µl de glicerol sobre un portaobjeto cubierto con cubre objeto, éste fue sellado (esmalte de uñas) para permitir la humedad con la resina, finalmente fueron almacenados a 4°C y protegidos de la luz para posteriormente ser observados y evaluados en el microscopio de fluorescencia Axiovert40 CFL (Zeiss).

Las células apoptóticas fueron observadas con un filtro de 565 nm de longitud de onda (emitiendo fluorescencia verde), mientras que la maduración del ovocito se observó con el filtro de 455 nm para excitar fluorescencia, emitiendo color azul, para lo cual se buscó que el ovocito inmaduro tuviera vesícula germinal (Figura 13a), ovocito en la metafase de la segunda división y ovocito apoptótico. Los resultados observados fueron foto documentados con la cámara AxioCam MRC ZEISS con el programa AxioVision Rel. 4.8.

### **Determinación de la Concentración Intracelular AMPc en COCs**

Posterior al proceso de IVM, en 2 repeticiones independientes, grupos de 10 COC a diferentes tiempos de maduración (0, 3, 6 y 24 h), fueron removidos del medio de cultivo y lavados con PBS, para posteriormente ser colocados en un criovial con un volumen de 10 – 20 µl de medio. Los crioviales se sumergieron en nitrógeno líquido hasta total congelación y luego fueron almacenados a -20 °C hasta su procesamiento. La concentración intracelular de AMPc fue determinada utilizando el sistema de competencia inmunoenzimática acetilado (Biotrak, GE Healthcare), de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Brevemente, los COC almacenados a -20 °C fueron descongelados en hielo; una vez descongelados fueron aforados con un volumen final de 100 µl con reactivo de

lisis 1B. Posteriormente se les agrego 2.5  $\mu\text{l}$  de reactivo de acetilación y se mezcló vigorosamente el microtubo por medio de vórtex durante 10 min. Por otro lado 100  $\mu\text{l}$  del antisuero anti-AMPc fueron colocados dentro de los pozos de la microplaca, a los cuales subsecuentemente se les adicionó 100  $\mu\text{l}$  del reactivo de lisis 2B más 50  $\mu\text{l}$  de reactivo de lisis 1B, para posteriormente colocar 50  $\mu\text{l}$  de las muestras previamente acetiladas. Luego de mezclar cada uno de los pozos, la microplaca se incubó a 4 °C por 1 h. Después a cada uno de los pozos, se les adicionó 100  $\mu\text{l}$  del conjugado peroxidasa y se incubó a 4 °C por 1 h. Subsecuentemente, se retiró el contenido líquido de cada pozo y se lavó 4 veces con 400  $\mu\text{l}$  de amortiguador de lavado. Inmediatamente después del último lavado, se colocaron en cada pozo 150  $\mu\text{l}$  del sustrato de la enzima y luego se mezcló la microplaca en un agitador orbital durante 1 h a temperatura ambiente. Por último se le adicionó a cada pozo 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M y luego de mezclar fue determinada la densidad óptica de cada pozo a una longitud de onda de 450 nm en el lector de microplacas Varioskan Flash (Thermo Scientific).

### **RT-PCR Cuantitativa por Tiempo Real**

Se realizó extracción de ARN total de grupos de 25 COC, posterior a las 24 h del procedimiento de IVM, utilizando el reactivo TRI Reagent (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, los COCs se colocaron en un tubo estéril con capacidad de 1.5 mL y se homogeneizaron con 800  $\mu\text{l}$  de TRI Reagent (Invitrogen). Luego se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y se mezclaron con 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo, nuevamente se volvió a incubar por 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a una velocidad de 13000 revoluciones por

minuto (rpm) a 4 °C durante 15 min. Después se transfirió la fase acuosa a un tubo de 1.5 mL estéril, donde se agregaron 500 µl de isopropanol para precipitar el ARN, se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm a 4 °C por 10 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla obtenida se lavó con 1 mL de etanol grado biología molecular para después centrifugarse a 8500 rpm a 4 °C durante 5 min y finalmente se decantó el sobrenadante, se retiró el exceso de etanol y se resuspendió la pastilla obtenida en 30 µl de agua libre de nucleasas. El ARN obtenido se almacenó a -80 °C en un ultra congelador marca ThermoScientific hasta la síntesis de DNA complementario. La concentración del ARN extraído fue determinada a través del espectrofotómetro NanoDrop (ThermoScientific) mediante absorbancia a 260 nm. La pureza de este ácido nucleico fue determinada calculando la relación de absorbancia entre 260 y 280 nm. La síntesis de cDNA se realizó mediante el kit High-Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems), siguiendo las indicaciones del fabricante, para lo cual se realizó una mezcla de 2 µg de RNA (con excepción del RNA obtenido de ovocito maduro, donde se utilizó 1 µg), 10 µL del amortiguador 2X para transcripción reversa (RT), 1 µL de la enzima 20X RT y 8 µL de agua libre de nucleasas. Las reacciones se colocaron en un termociclador CORBETT bajo el siguiente programa: temperatura de 37 °C durante 60 min, seguida de la temperatura para la desactivación de la enzima, 5 min a 95 °C y por último se conservó el sistema a 4 °C. El cDNA obtenido se cuantificó en el Espectrofotómetro NanoDrop (ThermoScientific) mediante la absorbancia a 260 nm y la pureza de este ácido nucleico fue determinada calculando la relación de absorbancia entre 260 y 280 nm, el cDNA se almacenó a

-20 °C hasta su posterior uso.

Para las amplificaciones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) todas las reacciones se realizaron en el termociclador Real Time StepOne (Applied Biosystems). Las regiones específicas para la amplificación se obtuvieron utilizando los reactivos TaqMan Universal Master Mix II y TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) que incluyen sonda específica con el reportero FAM para los genes cuantificados, además se utilizó el gen endógeno RNA18S. En la preparación de la reacción se adicionaron 50 ng de cDNA de cada condición, 8 µl de agua libre de nucleasas, 10 µl de TaqMan Universal Master Mix II y 1 µl de TaqMan Gene Expression Assays. Las sondas tipo TaqMan Bt03211776 y Bt04298952 que se utilizaron amplificaron los genes *bax* y *bcl2*, respectivamente. La cuantificación de la expresión de estos genes se normalizó tomando como referencia la amplificación del gen endógeno RNA18S (Hs03003631\_g1, Applied Biosystems).

### **Análisis Estadístico**

Se evaluó el posible efecto de 4 diferentes concentraciones (0, 15, 153 y 510 µg/ml) de IMD/ADM2<sub>1-47</sub> sobre cuatro variables de respuesta: 1) porcentaje de COCs expandidos; 2) porcentajes de COCs compactos, 3) porcentaje de ovocitos en apoptosis; y, 4) porcentaje de ovocitos en MII (Figura 7). Todas las variables se obtuvieron como la media ± desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza con el procedimiento GLM, del programa para análisis estadístico SAS 2010; la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey a un valor de P < 0.05.

Para analizar la concentración intracelular de AMPc durante el tiempo de maduración *in vitro* de 0, 3, 6 y 24 h (Figura 8), se tomó la media (fmol/mL)  $\pm$  desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza, el modelo incluyó los efectos de tratamiento y tiempo de manera independiente para cada serie de tiempo. La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey a un valor de  $P < 0.05$ . El análisis se realizó con el procedimiento GLM de SAS 2010.

Para el análisis de la expresión génica se analizó la variable abundancia relativa de los genes *Bax* y *Bcl2* (Figura 9). Esta abundancia se calculó de acuerdo al método de  $2^{-\Delta Ct}$ , donde el  $\Delta Ct$  se generó a partir de la diferencia del valor de CT del gen de interés normalizado con el CT del control interno que fue el gen RNA18S (Livak y Schmittgen 2001). Para cada uno de los genes se realizaron tres repeticiones independientes, cada una con tres replicas técnicas, para mostrar los resultados como la media del valor  $2^{-\Delta Ct} \pm$  desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza simple mediante el procedimiento GLM de SAS 2010. La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey a un valor de  $P < 0.05$ .

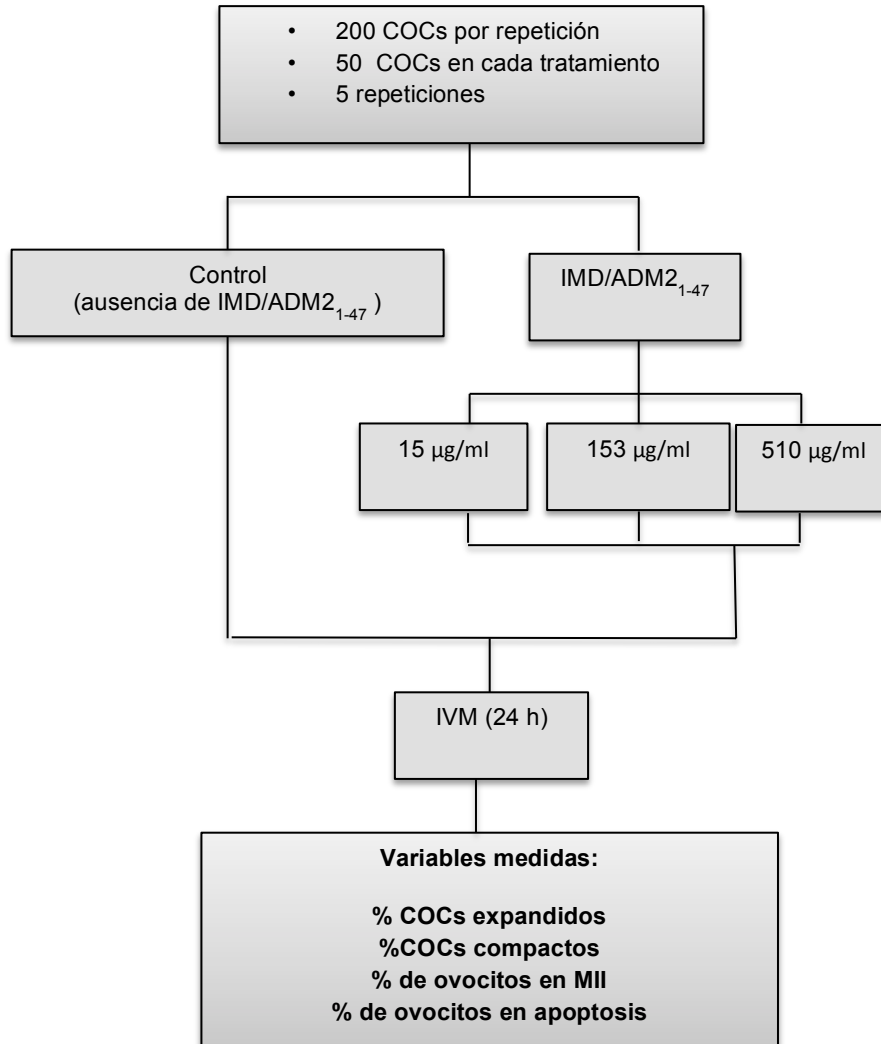


Figura 7. Estrategia experimental para la determinación de la expansión celular, apoptosis y maduración en MII de COC en presencia de IMD/ADM<sub>1-47</sub>

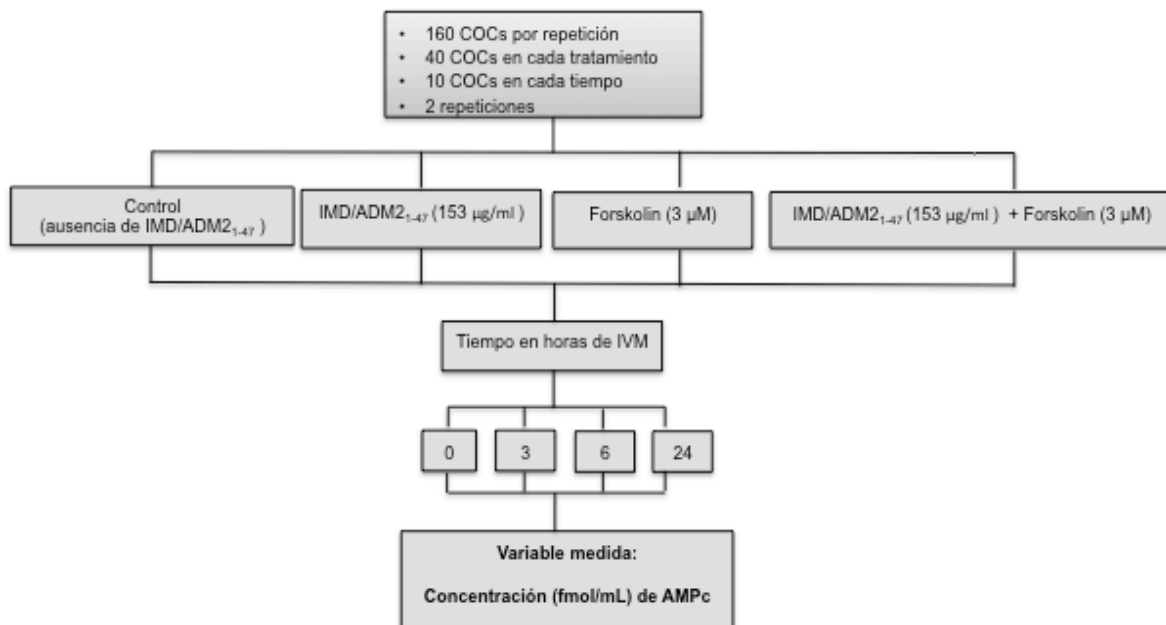


Figura 8. Estrategia experimental para la determinación de la concentración intracelular de AMPc durante el tiempo de maduración *in vitro* (IVM).

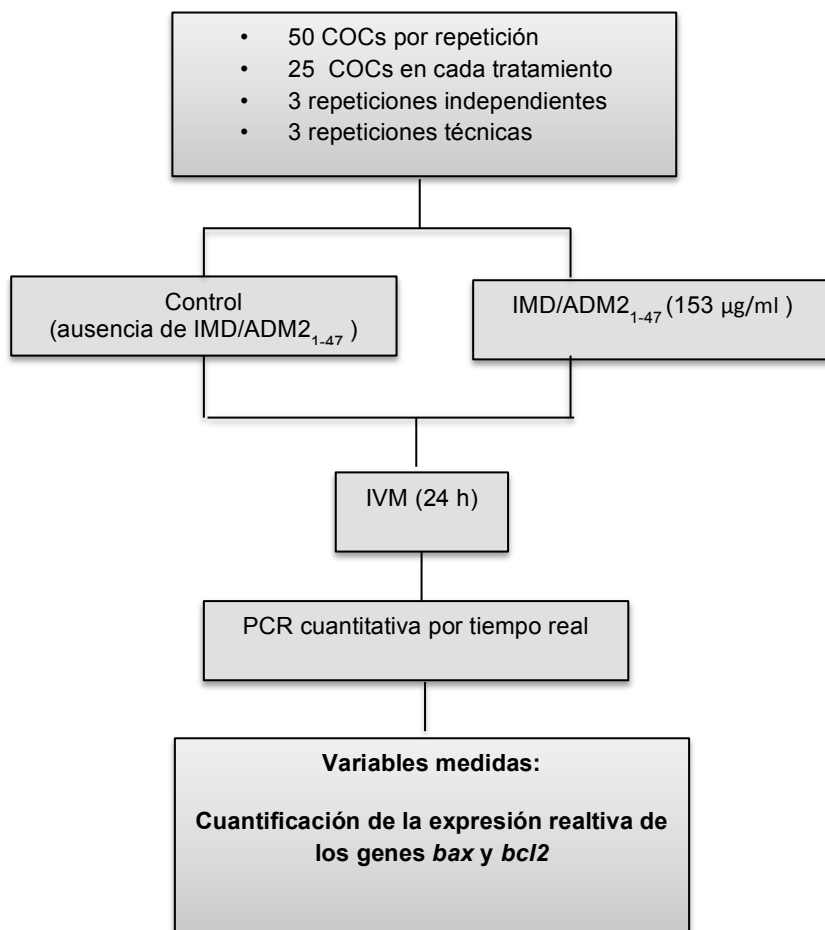


Figura 9. Estrategia experimental para la el análisis de la expresión relativa de los genes *bax* y *bcl2* en COCs madurados en ausencia y presencia de IMD/ADM2<sub>1-47</sub>.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Resultado del análisis de homología entre IMD/ADM2 de humano y bovino

El análisis de la estructura primaria mostró que tanto el IMD/ADM2<sub>1-47</sub> de humano como el de bovino comparte los residuos de aminoácidos conservados (Figura 10a) necesarios para originar una estructura terciaria del péptido (Figura 10b), presentándose en ambas la estructura del bucle unido por el puente disulfuro y el dominio  $\alpha$ -hélice que son necesarios para el reconocimiento con el receptor (Figura 10a). Estos resultados implicaron que el péptido recombinante IMD/ADM2<sub>1-47</sub> humano de la marca NeoBiolab, tiene una identidad y conformación tridimensional muy semejante al IMD/ADM2<sub>1-47</sub> bovino, por lo cual se tomó la decisión de utilizarla para evaluar su efecto en el medio de cultivo de maduración de ovocitos.

### Efecto de la adición de IMD/ADM2<sub>1-47</sub> sobre la compactación del COCs

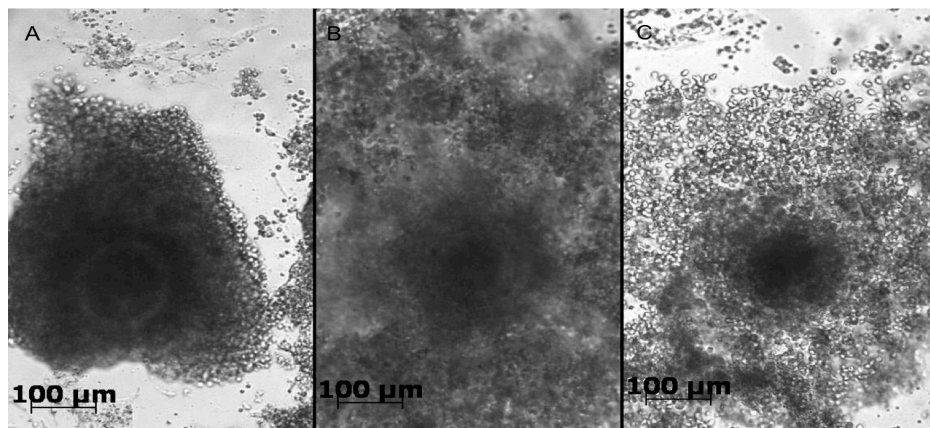
De acuerdo a Pangas *et al.* (2003), Xu *et al.* (2006) y Xu *et al.* (2011) el mantener la compactación en el COC durante el cvo de maduración *in vitro*, favorece la comunicación bidireccional entre el ovocito y las células cumulares, lo que permite una correcta maduración del ovocito. Rizos *et al.* (2002) indican que los ovocitos madurados *in vivo* generan más blastocitos que aquellos madurados *in vitro* y que esto se debe a la calidad de ovocito, la cual está directamente relacionada con la competencia que el ovocito adquirió al madurar. *In vitro* al momento que los ovocitos son aspirados del folículo, pierden la capacidad de mantener la interacción con las células cumulares que lo rodean, lo que provoca que de forma espontánea reanuden la meiosis (Bernal-Ulloa *et al.* 2016).



Con estos antecedentes se evaluó la capacidad del péptido IMD/ADM2<sub>1-47</sub> de mantener la interacción célula-célula dentro del COC, es decir, de mantener el COC en una estructura compacta en el medio de cultivo suplementado con el péptido. Los resultados se analizaron de acuerdo a lo reportado por Kobayashi *et al.* (1994), quien clasificó el grado de compactación de los COCs en tres categorías: 1) compacto si en el COC no se observa separación entre células cumulares, 2) semicompacto si existe una expansión heterogénea con regiones sin expandir y 3) expandido si hay una separación homogénea entre las células cumulares; (Figura 11a). En la Figura 11b se muestra que posterior a 24 h de maduración *in vitro*, el porcentaje de COCs con una estructura compacta se aumentó con el incremento de la concentración de IMD/ADM2<sub>1-47</sub> ( $64 \pm 18.7$  para 15  $\mu\text{g/ml}$ ,  $70 \pm 38.2$  para 153  $\mu\text{g/ml}$  y  $88 \pm 16.32$  para 510  $\mu\text{g/ml}$ ;  $P > 0.05$ ). Sin embargo los ovocitos con estructuras semi-expandidas y expandidas no muestran diferencias estadísticas entre ellos ( $28 \pm 15.3$  y  $30 \pm 28$  para 0  $\mu\text{g/ml}$ ,  $23 \pm 11.01$  y  $14 \pm 10$  para 15  $\mu\text{g/ml}$ ,  $17 \pm 19.7$  y  $13 \pm 23.4$  para 153  $\mu\text{g/ml}$ ,  $4 \pm 5.6$  y  $8 \pm 1.31$  para 510  $\mu\text{g/ml}$ ). Estos resultados concuerda con los obtenidos por Chang *et al.*, (2011) quien mostró en rata, que la suplementación de IMD/ADM2<sub>1-47</sub> en el medio de maduración *in vitro* promueve la compactación de los COCs, lo que provoca que un aumento en la síntesis de estrógenos y AMPc, así como también un aumento en la sobrevivencia de las células cumulares. Para que OSF puedan transportarse de una célula a otra, la interacción del ovocito con las células cumulares requiere de una estrecha cercanía (Hussein *et al.* 2006). *In vivo* esto sucede durante las primeras fases de la foliculogénesis desde folículo primordial hasta el folículo

secundario (Monniaux 2016). Una vez que sucede la vascularización y se forma el antro, dando lugar a la formación del folículo terciario, las células granulosas que rodean al ovocito se diferencian en células cumulares y murales (Russell *et al.* 2016). De estas sólo las cumulares se mantienen en estrecha comunicación con el ovocito, generándose así el denominado COC (Sanchez y Smitz 2012). Esta comunicación se mantiene hasta que actúa la hormona LH, quien ocasiona que la comunicación se pierda, permitiendo de esta forma que se expandan las células cumulares, lo que desorganiza el COC, promoviéndose así la ovulación (Mehlmann 2005). Si bien es cierto que *in vivo* la expansión del COC es sinónimo de maduración del ovocito, *in vitro* no es tan real. Una de las limitantes de los procesos de maduración *in vitro* es que los ovocitos inmediatamente después de ser aspirados de los folículos experimentan maduración espontánea, es decir, reactivan la meiosis de manera prematura (Vanhoutte *et al.* 2009). *In vitro* un ovocito puede haber madurado nuclearmente, es decir, haber extruido cuerpo polar y arrestarse en MII, pero esto no significa que haya alcanzado la madurez citoplasmática, es decir, que haya alcanzado a producir y almacenar todos los componentes citoplasmáticos que requiere para soportar su transición al embrión después de ser fertilizado (Mehta 2014). Entonces mantener *in vitro* la interacción célula-célula en el COC es vital para que el ovocito madure tanto nuclear como citoplasmáticamente (Coticchio *et al.* 2015). Los resultados mostrados en la Figura 11b indican que a dosis crecientes de suplementación del medio con el péptido IMD/ADM<sub>1-47</sub> la compactación aumenta, previniendo una prematura expansión del COC. Esto indica que el IMD/ADM<sub>1-47</sub> promueve la interacción célula-célula dentro

a).



b).

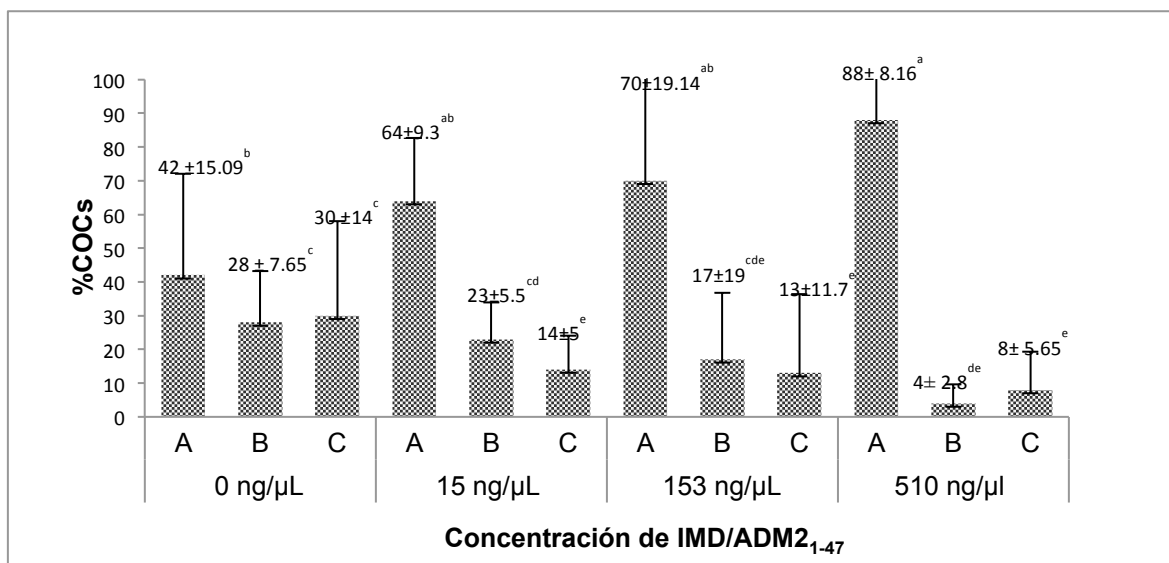


Figura 11. Concentración óptima de IMD/ADM2<sub>1-47</sub> sobre el grado de expansión acumulada. a). Organización estructural del COC: A. Compacto, B. Semicompacto y C. Expandido. Imagen tomada a 40X con el microscopio invertido Axiovert CFL40 (Zeiss). b). En la gráfica los datos se presentan en porcentajes ± EE de 5 réplicas independientes que equivalen a 500 COCs (25 COCs/tratamiento).

del COC, lo que promueve una adecuada comunicación bidireccional ente el ovocito y las células cumulares.

### **Efecto de la adición de IMD/ADM<sub>2</sub><sup>1-47</sup> sobre la maduración nuclear**

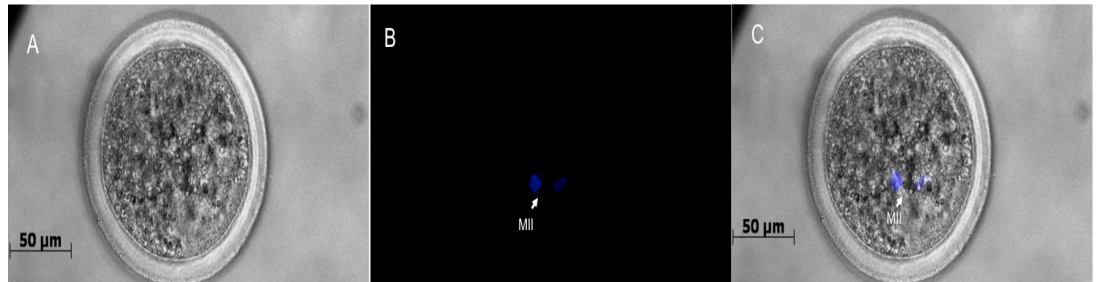
La maduración nuclear del ovocito comienza cuando reactiva la meiosis y prosigue de Profase I a MII, donde se extruye el primer cuerpo polar (Li y Albertini 2013; Dumesic *et al.* 2015). Tanto *in vivo* como *in vitro* este proceso es promovido por las hormona FSH y LH (Vásquez *et al.* 2006). Con la finalidad de evaluar si suplementar el medio de maduración con el péptido IMD/ADM<sub>1-47</sub> tiene un efecto positivo sobre la maduración nuclear del ovocito, se maduraron COCs por 24 h en presencia del IMD/ADM<sub>1-47</sub>, para luego visualizar si durante este tiempo el ovocito tuvo la capacidad de organizar sus cromosomas anclados al uso mitótico en la parte cortical de la célula, lo que indica que progreso a MII como se muestra en la figura 12a (Li y Albertini 2013). En la Figura 12b se muestra una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en el porcentaje de ovocitos en el estado de MII donde se observaron COC suplementados con 153 ng/ $\mu$ l del péptido IMD/ADM<sub>1-47</sub> comparados con el tratamiento control ( $61 \pm 3.8$  vs  $35 \pm 16.35$  respectivamente,  $P < 0.05$ ). Contrariamente a lo esperado la adición de 510 ng/ $\mu$ l de IMD/ADM<sub>1-47</sub>, no presentó diferencia significativa con el tratamiento control y con los grupos suplementados con 153 y 15  $\mu$ g/ml. Estos resultados demuestran el efecto de IMD/ADM<sub>2</sub> sobre la progresión de los ovocitos hacia la MII. Chang *et al.* (2011) al cultivar células cumulares de rata en presencia del péptido IMD/ADM<sub>1-47</sub> observó que se generaba en estas células un aumento en la síntesis de estradiol. Algo similar encontraron Chauhan *et al.* (2015), quienes al cultivar ovarios completos en

presencia de IMD/ADM<sub>1-47</sub> encontraron que se aumentaba la producción de estradiol y la expresión de genes que participan en la esteroidogénesis como lo son *Hsd17b1*, *Hsd31* y *Hsd3b2*. Por otro lado, este mismo grupo, al tratar *in vivo* ratas con un antagonista del péptido IMD/ADM<sub>1-47</sub>, encontraron que los ovarios mostraron un declive significativo en la formación del cuerpos lúteos, lo que sugiere que el inhibir la acción de IMD/ADM<sub>1-47</sub> impide la ovulación (Chauhan *et al.* 2015). El estradiol es una molécula lipofílica esteroidea que es sintetizada y secretada al medio por las células cumulares bajo el estímulo de FSH (Mingoti *et al.* 2002; Sanchez y Smitz 2012). *In vitro* la adición de estradiol al medio de maduración de COCs bovinos promueve el desarrollo de ovocitos en MII (Fukui *et al.* 1982; Younis *et al.* 1989; Saeki *et al.* 1991). Si bien en este estudio no se midieron los niveles de estradiol, es muy probable que una de las acciones del péptido IMD/ADM<sub>1-47</sub> sobre las células cumulares sea la de estimular la síntesis de estradiol, y con esto promover la maduración nuclear del ovocito.

#### **Efecto de la adicción de IMD/ADM<sub>2-47</sub> sobre la apoptosis.**

La apoptosis es un proceso de muerte celular evolutivamente conservado, que elimina las células dañadas y regula la homeostasis en organismos multicelulares. Las células que presentan este fenómeno se caracterizan por mostrar una condensación de los cromosomas hacia la membrana nuclear y una fragmentación del ADN, así como un encogimiento de la masa celular (Zamaraev *et al.* 2017).

a).



b).

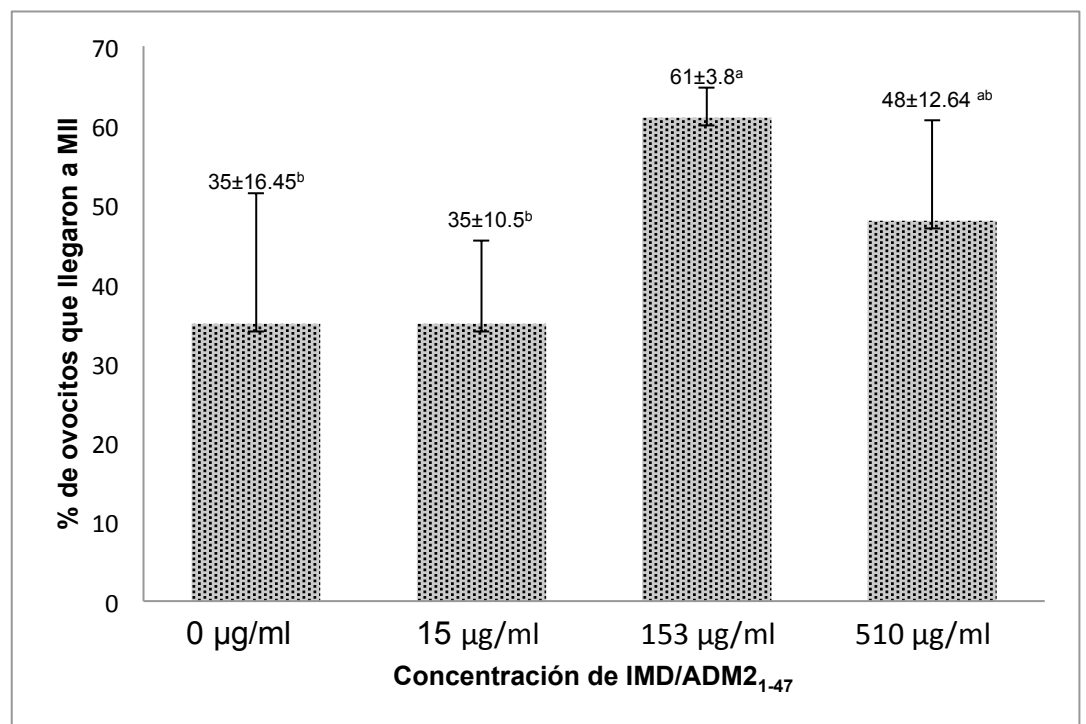
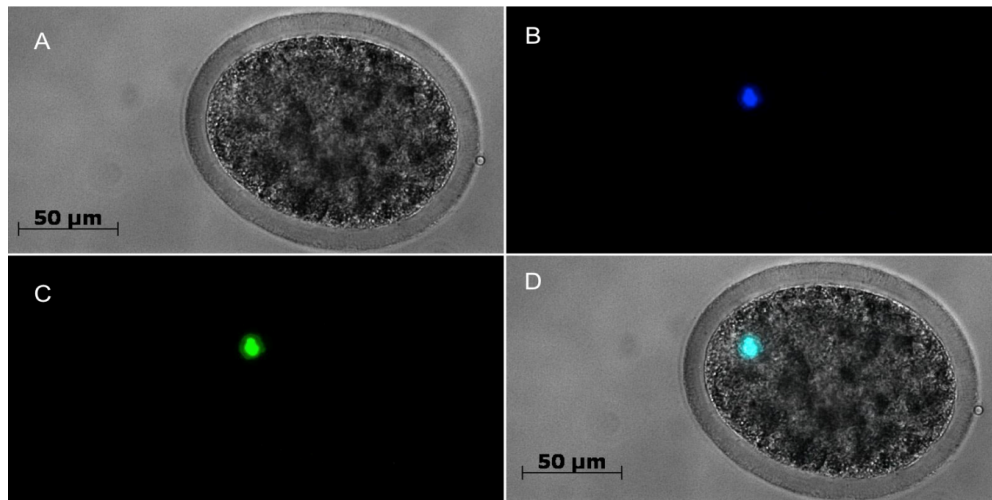


Figura 12. Efecto de la IMD/ADM2<sub>1-47</sub> sobre la maduración nuclear del ovocito. a). En la fotografía se muestra ovocito en MII: A. Contraste de fases, B. Fluorescencia a 455 nm, y C. Contraste de fases/fluorescencia. Imagen tomada a 40X con el microscopio invertido Axiovert CFL40 (Zeiss). b). En la gráfica los datos se presentan en porcentajes ± EE de 5 réplicas independientes que equivalen a 500 COCS (25 COCs/tratamiento). Barras con diferentes letras minúsculas representan tratamientos estadísticamente diferentes (P<0.05).

*In vitro* la expansión cumular prematura ocasiona una pérdida de comunicación entre las células cumulares y el ovocito, esto provoca que el ovocito sufra una privación de los nutrientes y factores de crecimiento, que puede provocar que ésta célula entre en apoptosis (Tiwari *et al.* 2015). El IMD/ADM<sub>1-47</sub> es un péptido que ha demostrado tener un efecto antiapoptótico en varios tejidos como lo son corazón y placenta (Ni *et al.* 2014; Chauhan *et al.* 2015). Chang *et al.* (2011) al madurar COCs de rata con el IMD/ADM<sub>1-47</sub> encontró que la actividad de las caspasas 3 y 7 disminuía con respecto a los COCs control que maduraron sin el péptido. Con el fin de evaluar si este péptido también tiene un efecto antiapoptótico durante la maduración del ovocito bovino, se observó si los ovocitos después de 24 h de maduración presentaban fragmentación del ADN. En la Figura 13b se muestra que suplementar el medio de maduración con 153 µg/ml de IMD/ADM<sub>1-47</sub> promovió una disminución estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) de la apoptosis comparada con el control ( $2 \pm 2.3$  vs  $21 \pm 17$ , respectivamente).

En rata la pérdida de comunicación celular en el COC interrumpe la transferencia al ovocito de metabolitos como lo son el AMPc, GMPc y el óxido nítrico. Al disminuirse estos componentes se desencadena la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). En los ovocitos el incremento de ROS conduce a un estrés oxidativo que induce la desestabilización del factor promotor de maduración (MPF) conduciendo con esto al desarrollo de apoptosis (Tripathi y Chaube 2015). Con los resultados mostrados en la Figura 11b, se puede inferir que el IMD/ADM<sub>1-47</sub> promueve la interacción célula-célula y que actúa como un factor antiapoptótico disminuyendo la apoptosis en ovocitos

a).



b).

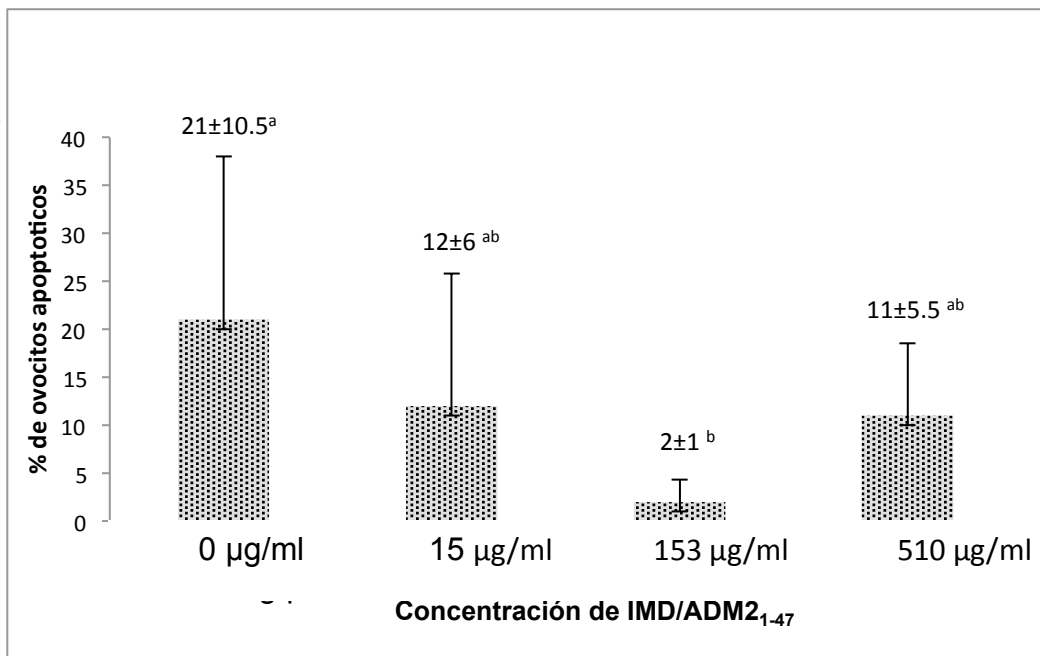
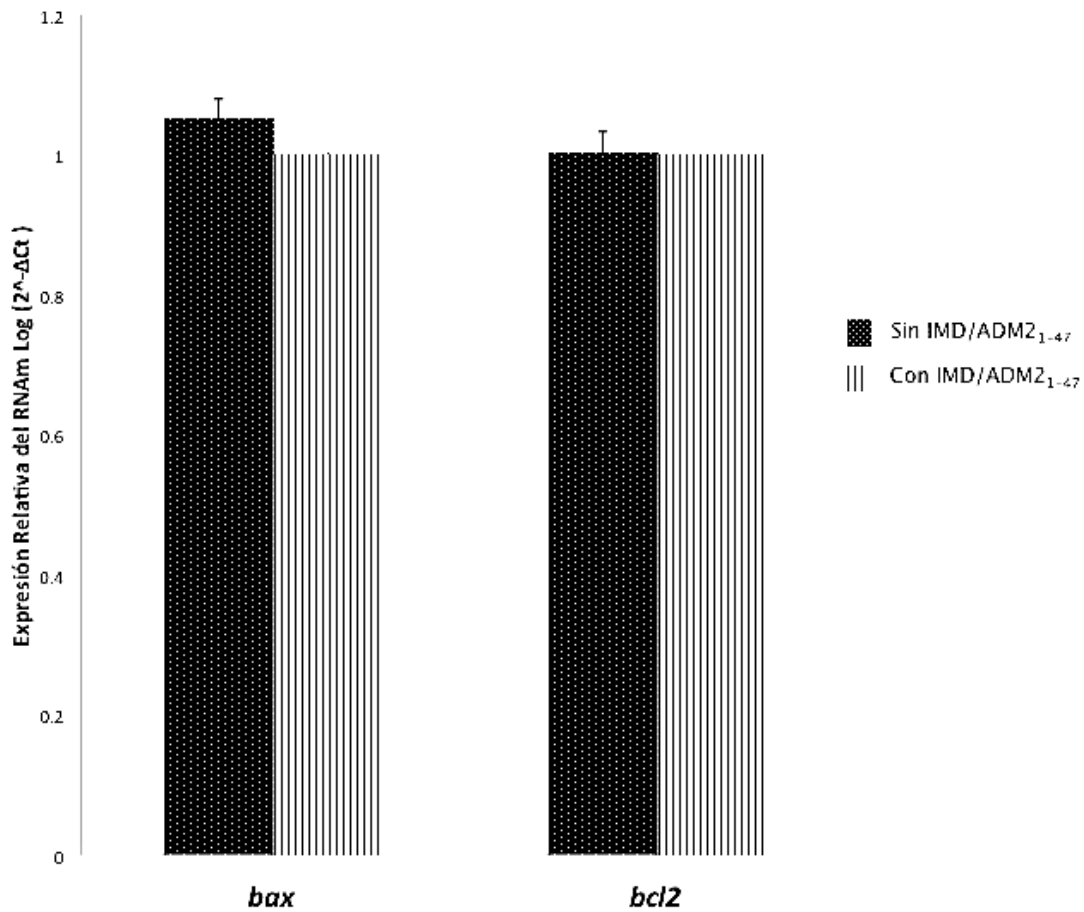


Figura 13. Efecto antiapoptótico de la IMD/ADM2<sub>1-47</sub> en el ovocito. a). En la fotografía se muestra un ovocito apoptótico: A. Contraste de fases, B. Fluorescencia a 455 nm para Hoechst, C. Fluorescencia a 565 nm para TUNEL y D. Sobreposición contraste de fases/fluorescencia Hoest/TUNEL. Imagen tomada a 40X con el microscopio invertido Axiovert CFL40 (Zeiss). b). En la gráfica los datos se presentan en porcentajes ± EE de 5 réplicas independientes que equivalen a 500 COCS (25 COCs/tratamiento). Barras con diferentes letras minúsculas representan tratamientos estadísticamente diferentes (P<0.05).

madurados en presencia de éste péptido (Figura 13b). Para poder explicar si este fenómeno está relacionado con una disminución de genes apoptóticos, se evaluó la expresión de los genes *bax* y *bcl-2* en COCs madurados en presencia y ausencia de 153 µg/ml de IMD/ADM2<sub>1-47</sub>. Los resultados en la gráfica 1 muestran que no hubo diferencias en la expresión del gen *bax* en aquellos COCs tratados con de IMD/ADM2<sub>1-47</sub> con respecto al control sin el péptido ( $P > 0.05$ ). Por su parte la expresión del gen *bcl-2* fue prácticamente la misma en los dos tipos de tratamiento ( $P > 0.05$ ). El gen *bax* codifica para la proteína BAX, la cual tiene la capacidad de insertarse en la membrana de la mitocondria, generando un poro por medio del cual es posible que se libere al citosol el citocromo c, para activar a la caspasa 3 y dar pasó a la apoptosis mediante la fragmentación del ADN. (Pena-Blanco y Garcia-Saez 2017). Por su parte, BCL2 actúa como una proteína antiapoptótica inhibiendo la acción de BAX (Matsuda-Minehata *et al.* 2006). Los resultados observados demuestran que la apoptosis que se observa en ovocitos no involucra cambios en la expresión de los genes *bcl2* y *bax*, lo que sugiere que la apoptosis que el IMD/ADM<sub>1-47</sub> promueve se debe por la activación de una vía diferente a la relacionada con las proteínas BAX y BCL2. La apoptosis es un proceso complejo que involucra dos vías: 1) intrínseca mediada por la mitocondria en el interior de la célula, y 2) la extrínseca que involucra la activación de un receptor de membrana por un ligando medioambiental. En la apoptosis intrínseca las señales que desatan la apoptosis son causadas por la proteína pro-apoptótica BAX que permite que se libere el citocromo c de la membrana de la mitocondria. Una vez que el citocromo c se libera se une con la proteína APAF-1 y con la.



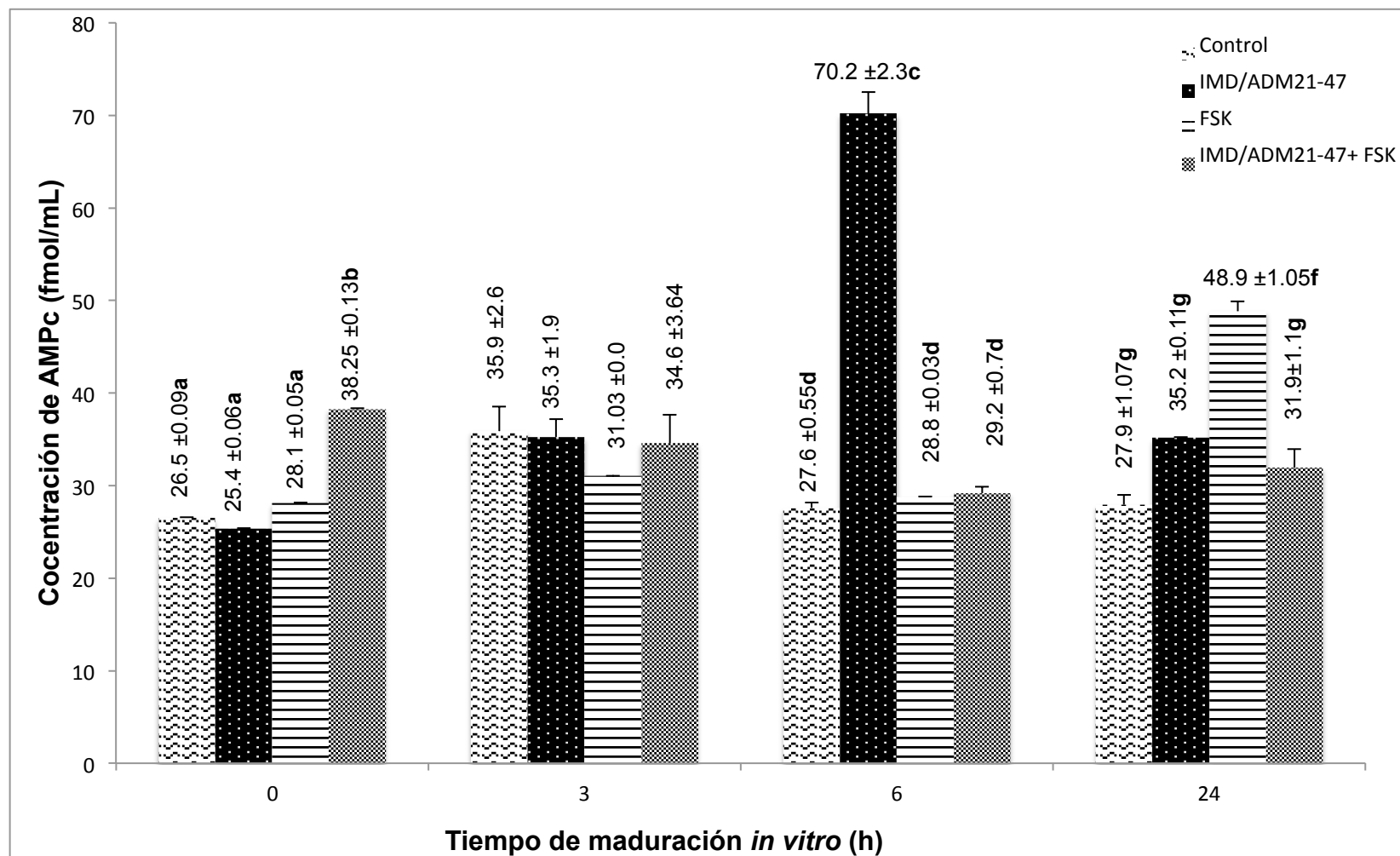
Gráfica 1. Abundancia relativa del RNAm de los genes *bax* y *bcl2* en COCs madurados en presencia o ausencia de IMD/ADM2<sub>1-47</sub>. Barras con diferentes letras minúsculas representan tratamientos estadísticamente diferentes (P<0.05)

caspasa-9 para formar el apoptosoma y activar la caspasa 3 quien es quien ejecuta la apoptosis (Morita y Tilly 1999). En la vía extrínseca el receptor de membrana es una proteína de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés), en el ovocito los más comunes son las proteínas Fas y TNFR1, los cuales una vez que reconocen su ligandos FasL y TNF $\alpha$ , provocan la activación de las caspasas 8 para luego desencadenar la apoptosis (Hussein 2005). El que los resultados muestren que no hay un cambio en la expresión de los genes *bax* y *bcl2* sugiere que la disminución de la apoptosis que promueve el IMD/ADM<sub>1-47</sub> (Figura 13b) es promovida tal vez por la vía extrínseca.

**Efecto de IMD/ADM<sub>2-47</sub> sobre la producción de AMPc en COCs durante el tiempo de maduración.**

La reactivación de la meiosis del ovocito, así como su camino hacia la maduración, son mecanismos mediados por las concentraciones elevadas de AMPc, que se acumulan de forma intracelular en la células cumulares. *In vitro*, una cantidad elevada de AMPc es un indicativo de que dentro del COC el ovocito ha reactivado la meiosis (Marei *et al.* 2010). Además el AMPc como segundo mensajero, juega un papel importante en el mantenimiento de la comunicación celular entre ovocito y células cumulares (Gilchrist *et al.*, 2006; Vásquez *et al.*, 2006). Teniendo el antecedente de que el péptido IMD/ADM<sub>2-47</sub> al ser reconocido por el receptor CLR:RAMPs, desata la vía de señalización de la adenilato ciclasa para producir AMPc (Kuwasako *et al.*, 2011), era de esperar que al suplementar el medio de maduración con el péptido IMD/ADM<sub>2-47</sub>, las concentraciones de AMPc se elevaran dentro de los COCs. Con el fin de evaluar si la suplementación de

IMD/ADM2<sub>1-47</sub> favorece la formación de AMPc, analizamos la concentración de este metabolito de forma intracelular en los COCs a lo largo del tiempo de maduración a las 0, 3, 6 y 24 h (Gráfica 2). Es importante mencionar que en estos experimentos se utilizó al Forskolin (FSK) como un control positivo, dado que esta molécula es un inductor del AMPc en COCs (Racowsky 1984; Marei *et al.* 2010). Al inicio de la maduración (0 h), la concentración de AMPc fue mayor en el tratamiento de IMD/ADM2<sub>1-47</sub>+FSK que en el tratamiento control y en los tratamientos donde se suplementó por separado IMD/ADM2<sub>1-47</sub> y Forskolin (38.37±0.13, 26.6±0.09, 25.41±0.06 y 28.15±0.05 fmol/ml; P < 0.05, respectivamente) esto indicó que el péptido IMD/ADM2<sub>1-47</sub> y FSK sumaron la acción ejercida sobre la adenilato ciclasa para la producción de AMPc. A las 0h el ovocito dentro del COC es aún inmaduro, por lo que la enzima PDE3A está aún inactivada y no hay hidrólisis de AMPc (Conti *et al.*, 2012). Cuando los COCs son estimulados por IMD/ADM2<sub>1-47</sub>+FSK, la acción de los receptores GCRP se potencializa, lo que trae como resultado un aumento en la actividad de la adenilato ciclasa, lo que culmina en esa cantidad AMPc tan elevada. Para las 3h del cultivo de maduración todos los tratamientos alcanzaron concentraciones similares en los rangos de 31.03±0.0 a 35.9±2.6 fmol/ml (P > 0.05). Para las 6 h, solamente en aquellos COCs con el estímulo de IMD/ADM2<sub>1-47</sub> presentaron un aumento significativo de AMPc, en todos demás tratamientos hubo una disminución de los niveles de AMPc (70±2.3 vs 27.6±0.55, 28.8±0.03 y 29.2±0.7 fmol/ml respectivamente; P > 0.05). Esto sugiere que en aquellos tratamientos donde el AMPc disminuyó, el ovocito dentro del COC reactivó la meiosis por lo que las



Gráfica 2. Concentración intracelular de AMPc en COCs madurados en presencia de IMD/ADM2<sub>1-47</sub>, Forskolín (FSK) y ambos. Los datos se presentan en fmol/mL ± EE de 2 réplicas independientes que equivalen a 160 COCs (40 COCs/tratamiento). Barras con diferentes letras minúsculas representan tratamientos estadísticamente diferentes (P<0.05)

concentraciones de AMPc en su interior disminuyeron por la acción de la PDE3A, la cual se activó debido al estímulo emitido al COC por las hormonas FSH y EGF, suministradas en el medio maduración; entonces la concentración total de AMPc disminuye porque sólo queda el AMPc que se está empezando a acumular en las células cumulares. Sin embargo, esto no sucedió en los COCs tratados con el péptido, donde la concentración de AMPc subió aproximadamente 2 veces más que los demás tratamientos, esto sugiere que el ovocito no ha reactivado la meiosis y continua arrestado manteniendo altos sus niveles de AMPc. La cantidad de AMPc ha sido directamente relacionada con la cantidad de conexinas presentes en COCs en cultivo de maduración, a mayor AMPc mayor presencia de uniones GAP (Thomas *et al.* 2004), este podría ser el motivo del elevado porcentaje de compactación que se observa en los COCs tratados con IMD/ADM2<sub>1-47</sub> (Figura 11b). En la relación al tratamiento IMD/ADM2<sub>1-47</sub>+FSK al contrario de lo esperado la concentración de AMPc disminuyó (29.2±0.7), esto sugiere que el FSK inhibe el efecto del IMD/ADM2<sub>1-47</sub>. A las 24 h de cultivo los niveles de AMPc disminuyeron para IMD/ADM2<sub>1-47</sub> y aumentaron para el caso de FSK (35.2±0.11 vs 48.9±1.05 fmol/ml respectivamente; P > 0,05). De acuerdo a Racowsky (1984) el efecto en los COCs del FSK aumenta con relación al tiempo, por lo tanto los resultados que se obtuvieron concuerdan con lo reportado. El que la concentración de AMPc en el grupo de COCs tratados con IMD/ADM2<sub>1-47</sub> indica que el efecto para inducir la formación de AMPc pierde potencia a las 24 h y en este punto es entonces donde se puede pensar que ya sin el estímulo el ovocito madura, esto coincide con los resultados que se muestran en la Figura 12b.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El suplementar con el péptido IMD/ADM2<sub>1-47</sub> el medio de cultivo para maduración *in vitro* tiene un impacto positivo, ya que promueve la interacción célula-célula manteniendo la estructura compacta en el COC, lo que favorece la síntesis de AMPc para impulsar la maduración a MII y la inhibición de apoptosis en el ovocito. El IMD/ADM2<sub>1-47</sub> promueve la compactación de manera dosis dependiente, a mayor concentración de IMD/ADM2<sub>1-47</sub> mayor compactación del COC. Sin embargo la maduración e inhibición de la apoptosis sólo se ve favorecida hasta la concentración de 153 µg/ml y disminuye a la concentración mayor de 510 ng/ul. Esto indica que a dosis mayores de 153 µg/ml el efecto del péptido sobre el desarrollo de competencia podría ser adverso, tal vez debido a una saturación de los receptores de CLR-RAMPs que traería como consecuencia una excesiva producción de AMPc que generaría el efecto contrario al de madurar.

La inhibición de la apoptosis mediada por el IMD/ADM2<sub>1-47</sub> en el ovocito no mostró estar influenciada por la expresión de los genes *bax* y *bcl2*. Se requieren realizar más experimentos sobre la expresión de las caspasas 3 que se activan tanto el vía intrínseca como extrínseca. Para comprobar si la vía de la apoptosis involucrada es la extrínseca se recomienda realizar un ensayo para medir la actividad de la caspasa 8.

Para saber si la suplementación del medio de maduración con el IMD/ADM2<sub>1-47</sub> produce ovocitos competentes, es necesario realizar ensayos de fertilización *in vitro* donde se esperaría observar un aumento el tasa de blastocistos generados.

## LITERATURA CITADA

- Bell, D. y B. J. McDermott. 2008. Intermedin (adrenomedullin-2): a novel counter-regulatory peptide in the cardiovascular and renal systems. *Br J Pharmacol.* 153 Suppl 1:S247-262
- Bernal-Ulloa, S. M., A. Lucas-Hahn, D. Herrmann, K. G. Haderer, P. Aldag, U. Baulain y H. Niemann. 2016. Oocyte pre-IVM with caffeine improves bovine embryo survival after vitrification. *Theriogenology.* 86:1222-1230
- Castro-Valenzuela, B. E. 2015. Análisis del secretoma del ovocito bovino (*Bos taurus*). Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chih. México.
- Conti, M., Hsieh, M., Zamah, A. M., & Oh, J. S. (2012). Molecular and Cellular Endocrinology Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation, 356, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.11.002>
- Chang, C. L., H.-S. S. Wang, Y.-K. K. Soong, S. Y. Huang, S. Y. Pai y S. Y. Hsu. 2011. Regulation of oocyte and cumulus cell interactions by intermedin/adrenomedullin 2. *The Journal of biological chemistry.* 286:43193-43203
- Chaube, S. 2001. Role of meiotic maturation regulatory factors in developmental competency of mammalian oocytes. *HPPI.* 24:218-231
- Chaube, S., P. Prasad, S. Thakur y T. Shrivastav. 2005. Hydrogen peroxide modulates meiotic cell cycle and induces morphological features characteristic of apoptosis in rat oocytes cultured in vitro. *Apoptosis.* 10:863-874
- Chauhan, M., M. Balakrishnan, C. S. Blesson y C. Yallampalli. 2015. Adrenomedullin2 (ADM2)/intermedin (IMD) in rat ovary: changes in estrous cycle and pregnancy and its role in ovulation and steroidogenesis. *Biol Reprod.* 92:39
- Chauhan, M., R. Elkins, M. Balakrishnan y C. Yallampalli. 2011. Potential role of intermedin/adrenomedullin 2 in early embryonic development in rats. *Regul Pept.* 170:65-71
- Chauhan, M., U. Yallampalli y Y. L. Dong. 2009. Expression of adrenomedullin 2 (ADM2)/intermedin (IMD) in human placenta: role in trophoblast invasion and migration. *Expression of adrenomedullin 2 (ADM2)/intermedin (IMD) in human placenta: role in trophoblast invasion and migration.*
- 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
- Coticchio, G., M. Dal Canto, M. Mignini Renzini, M. C. Guglielmo, F. Brambillasca, D. Turchi, P. V. Novara y R. Fadini. 2015. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Hum Reprod Update.* 21:427-454
- de Castro, F. C., M. H. Cruz y C. L. Leal. 2016. Role of Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 in Ovarian Function and Their Importance in Mammalian Female Fertility - A Review. *Asian-Australas J Anim Sci.* 29:1065-1074

- Dumesic, D. A., D. R. Meldrum, M. G. Katz-Jaffe, R. L. Krisher y W. B. Schoolcraft. 2015. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril*. 103:303-316
- Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122:829-838
- Fukui, Y., M. Fukushima, Y. Terawaki y H. Ono. 1982. Effect of gonadotropins, steroids and culture media on bovine oocyte maturation in vitro. *Theriogenology*. 18:161-175
- Gilchrist, R. B., M. Lane y J. G. Thompson. 2008. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*. 14:159-177
- Gilchrist, R. B., Ritter, L. J., Myllymaa, S., Kaivo-oja, N., Dragovic, R. A., Hickey, T. E., ... Mottershead, D. G. (2006). Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. <https://doi.org/10.1242/jcs.03105>
- Gilchrist, R. B., L. J. Ritter y D. T. Armstrong. 2001. Mouse oocyte mitogenic activity is developmentally coordinated throughout folliculogenesis and meiotic maturation. *Dev Biol*. 240:289-298
- Hall, V., K. Hinrichs, G. Lazzari, D. H. Betts y P. Hyttel. 2013. Early embryonic development, assisted reproductive technologies, and pluripotent stem cell biology in domestic mammals. *Vet J*. 197:128-142
- Hong, Y., D. L. Hay, R. Quirion y D. R. Poyner. 2012. The pharmacology of adrenomedullin 2/intermedin. *British journal of pharmacology*. 166:110-120
- Hosoe, M., K. Kaneyama, K. Ushizawa, K.-g. Hayashi y T. Takahashi. 2011. Quantitative analysis of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth differentiation factor 9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 9:33
- Hussein, M. R. 2005. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human reproduction update*. 11:162-178
- Hussein, T. S., D. A. Froiland, F. Amato, J. G. Thompson y R. B. Gilchrist. 2005. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci*. 118:5257-5268
- Hussein, T. S., J. G. Thompson y R. B. Gilchrist. 2006. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol*. 296:514-521
- Juengel, J. L. y K. P. McNatty. 2005. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update*. 11:143-160
- Kidder, G. M. y A. A. Mhawi. 2002. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*. 123:613-620
- Kidder, G. M. y B. C. Vanderhyden. 2010. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 88:399-413
- Kobayashi, K., S. Yamashita y H. Hoshi. 1994. Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  on in vitro maturation of cumulus cell-

- enclosed bovine oocytes in a defined medium. *Journal of reproduction and fertility*. 100:439-446
- Kuwasako, K., K. Kitamura, S. Nagata, T. Hikosaka, Y. Takei y J. Kato. 2011. Shared and separate functions of the RAMP-based adrenomedullin receptors. *Peptides*. 32:1540-1550
- Li, R. y D. F. Albertini. 2013. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 14:141
- Li, Y., R.-Q. Li, S.-B. Ou, N.-F. Zhang, L. Ren, L.-N. Wei, Q.-X. Zhang 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. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 12:81
- Liu, K., S. Rajareddy, L. Liu, K. Jagarlamudi, K. Boman, G. Selstam y P. Reddy. 2006. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. *Dev Biol*. 299:1-11
- Livak, K. J. y T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25:402-408
- Lonergan, P., D. Rizos, A. Gutierrez-Adan, T. Fair y M. Boland. 2003. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression—experience from animal studies. *Reproductive biomedicine online*. 7:657-663
- Marei, W. F., D. C. Wathes y A. A. Fouladi-Nashta. 2010. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. *Reproduction*. 139:979-988
- Matsuda, F., N. Inoue, N. Manabe y S. Ohkura. 2012. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *Journal of Reproduction and Development*. 58:44-50
- Matsuda-Minehata, F., N. Inoue, Y. Goto y N. Manabe. 2006. The regulation of ovarian granulosa cell death by pro-and anti-apoptotic molecules. *Journal of Reproduction and Development*. 52:695-705
- 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
- Mehta, J. G. 2014. In vitro maturation. *Fertility Science and Research*. 1:7
- Memili, E., D. Peddinti, L. A. Shack, B. Nanduri, F. McCarthy, H. Sagirkaya y S. C. Burgess. 2007. Bovine germinal vesicle oocyte and cumulus cell proteomics. *Reproduction*. 133:1107-1120
- Mingoti, G. Z., J. Garcia y A. Rosa-e-Silva. 2002. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus–oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids. *Animal reproduction science*. 69:175-186
- Monniaux, D. 2016. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. *Theriogenology*. 86:41-53
- Morita, Y. y J. L. Tilly. 1999. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Developmental biology*. 213:1-17

- Ni, X., J. Zhang, C. Tang y Y. Qi. 2014a. Intermedin/adrenomedullin2: an autocrine/paracrine factor in vascular homeostasis and disease. *Sci China Life Sci.* 57:781-789
- Ni, X. Q., J. S. Zhang, C. S. Tang y Y. F. Qi. 2014b. Intermedin/adrenomedullin2: an autocrine/paracrine factor in vascular homeostasis and disease. *Intermedin/adrenomedullin2: an autocrine/paracrine factor in vascular homeostasis and disease.*
- Oktem, O. y B. Urman. 2010. Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod.* 25:2944-2954
- Otsuka, F., K. J. McTavish y S. Shimasaki. 2011. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Mol Reprod Dev.* 78:9-21
- Palma, G. A., M. E. Arganaraz, A. D. Barrera, D. Rodler, A. A. Mutto y F. Sinowatz. 2012. Biology and biotechnology of follicle development. *ScientificWorldJournal.* 2012:938138
- Pandey, A. N., A. Tripathi, K. V. Premkumar, T. G. Shrivastav y S. K. Chaube. 2010. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. *J Cell Biochem.* 111:521-528
- 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 engineering.* 9:1013-1021
- Peddinti, D., E. Memili y S. C. Burgess. 2010. Proteomics-based systems biology modeling of bovine germinal vesicle stage oocyte and cumulus cell interaction. *PLoS One.* 5:e11240
- Pena-Blanco, A. y A. J. Garcia-Saez. 2017. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J.*
- Peng, J., Q. Li, K. Wigglesworth, A. Rangarajan, C. Kattamuri, R. T. Peterson, J. J. Eppig, T. B. Thompson y M. M. Matzuk. 2013. Growth differentiation factor 9:bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:E776-785
- Powell, M. D., G. Manandhar, L. Spate, M. Sutovsky, S. Zimmerman, S. C. Sachdev, M. Hannink, R. S. Prather y P. Sutovsky. 2010. Discovery of putative oocyte quality markers by comparative ExacTag proteomics. *Proteomics Clin Appl.* 4:337-351
- Racowsky, C. 1984. Effect of forskolin on the spontaneous maturation and cyclic AMP content of rat oocyte—cumulus complexes. *Journal of reproduction and fertility.* 72:107-116
- 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
- Roh, J., C. L. Chang, A. Bhalla, C. Klein y S. Y. Hsu. 2004. Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes. *J Biol Chem.* 279:7264-7274
- Rolaki, A., P. Drakakis, S. Millingos, D. Loutradis y A. Makrigiannakis. 2005. Novel trends in follicular development, atresia and corpus luteum regression: a role for apoptosis. *Reproductive biomedicine online.* 11:93-103

- Russell, D. L., R. B. Gilchrist, H. M. Brown y J. G. Thompson. 2016. Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: Old hands and new players? *Theriogenology*. 86:62-68
- Russell, D. L. y R. L. Robker. 2007. Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update*. 13:289-312
- Saeki, K., M. Hoshi, M. Leibfried-Rutledge y N. First. 1991. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biology of reproduction*. 44:256-260
- Sanchez, F. y J. Smits. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1822:1896-1912
- Su, Y. Q., K. Sugiura y J. J. Eppig. 2009. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Semin Reprod Med*. 27:32-42
- Sugiura, K., Y. Q. Su, F. J. Diaz, S. A. Pangas, S. Sharma, K. Wigglesworth, M. J. O'Brien, M. M. Matzuk, S. Shimasaki y J. J. Eppig. 2007. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development*. 134:2593-2603
- 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
- Takei, Y., K. Inoue, M. Ogoshi, T. Kawahara, H. Bannai y S. Miyano. 2004. Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Letters*. 556:53-58
- Teixeira Filho, F. L., E. C. Baracat, T. H. Lee, C. S. Suh, M. Matsui, R. J. Chang, S. Shimasaki y G. F. Erickson. 2002. Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 87:1337-1344
- Thomas, R. E., D. T. Armstrong y R. B. Gilchrist. 2004. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. *Biol Reprod*. 70:548-556
- Tiwari, M., S. Prasad, A. Tripathi, A. N. Pandey, I. Ali, A. K. Singh, T. G. Shrivastav y S. K. Chaube. 2015. Apoptosis in mammalian oocytes: a review. *Apoptosis*. 20:1019-1025
- Tripathi, A. y S. K. Chaube. 2015. Roscovitine inhibits extrusion of second polar body and induces apoptosis in rat eggs cultured in vitro. *Pharmacological Reports*. 67:866-874
- Tripathi, A., K. V. Kumar y S. K. Chaube. 2010. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. *J Cell Physiol*. 223:592-600
- Vanhoutte, L., D. Nogueira y P. De Sutter. 2009. Prematuration of human denuded oocytes in a three-dimensional co-culture system: effects on meiosis progression and developmental competence. *Hum Reprod*. 24:658-669
- Vásquez, N. A., Y. S. López, E. E. Escobar y B. Agudelo. 2006. Regulacion de la maduración del Oocito Bovino por ampc. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 1:

- Virant-Klun, I. y J. Krijgsveld. 2014. Proteomes of animal oocytes: what can we learn for human oocytes in the in vitro fertilization programme? *Biomed Res Int.* 2014:856907
- Voronina, E. y G. M. Wessel. 2003. The regulation of oocyte maturation. *Current topics in developmental biology.* 58:53-110
- Wang, Z., C. Fu y S. Yu. 2013. Green tea polyphenols added to IVM and IVC media affect transcript abundance, apoptosis, and pregnancy rates in bovine embryos. *Theriogenology.* 79:186-192
- Wong, C. W., O. Wai-Sum y F. Tang. 2013. Intermedin in rat uterus: changes in gene expression and peptide levels across the estrous cycle and its effects on uterine contraction. *Reproductive Biology and Endocrinology.*
- Xu, J., M. S. Lawson, R. R. Yeoman, K. Y. Pau, S. L. Barrett, M. B. Zelinski y R. L. Stouffer. 2011. Secondary follicle growth and oocyte maturation during encapsulated three-dimensional culture in rhesus monkeys: effects of gonadotrophins, oxygen and fetuin. *Hum Reprod.* 26:1061-1072
- 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
- Yamashita, Y., M. Hishinuma y M. Shimada. 2009. Activation of PKA, p38 MAPK and ERK1/2 by gonadotropins in cumulus cells is critical for induction of EGF-like factor and TACE/ADAM17 gene expression during in vitro maturation of porcine COCs. *J Ovarian Res.* 2:20
- Younis, A., B. Brackett y R. Fayrer-Hosken. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Molecular Reproduction and Development.* 23:189-201
- Zamaraev, A. V., G. S. Kopeina, E. A. Prokhorova, B. Zhivotovsky y I. N. Lavrik. 2017. Post-translational Modification of Caspases: The Other Side of Apoptosis Regulation. *Trends Cell Biol.* 27:322-339