

Título del Proyecto de Investigación
al que corresponde el Reporte Técnico:

Impacto del Estrés Oxidativo Sobre el Desarrollo de Partenotas en Bovinos.

Tipo de financiamiento

Externo – PRODEP (AINPTC)

Fecha de Inicio: 21/08/2018
Fecha de Término: 29/10/2021

Tipo de Reporte

Parcial

Final

Autor (es) del reporte técnico:

Dr. Ernesto Orozco Lucero
Dra. Marbella Chávez Solano
Dr. Armando Varela Ramírez
Dr. José Maria Carrera Chávez
Dr. Andrés Quezada Casasola
Dr. Ángel Gabriel Díaz Sánchez

IMPACTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE EL DESARROLLO DE PARTENOTAS EN BOVINOS

Resumen del reporte técnico en español (máximo 250 palabras)

Los altos niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) generan estrés oxidativo, el cual disminuye la efectividad de la producción *in vitro* (PIV) de embriones, tanto aquellos generados por fertilización, como por activación partenogenética. Al igual que en otras células, la defensa celular ante el estrés oxidativo en embriones incluye proteínas de la respuesta al estrés oxidativo, cuyos transcritos codificantes pueden cuantificarse para evaluar dicho proceso. La suplementación *in vitro* del antioxidante quercetina disminuye el estrés oxidativo en embriones. El objetivo fue evaluar los efectos de la suplementación *in vitro* del agente oxidante peróxido de hidrógeno (H₂O₂), además de la quercetina sobre el desarrollo y niveles de ROS en partenotas bovinas, así como obtener primers para cuantificar los niveles de transcritos relacionados con la respuesta al estrés oxidativo. Se estableció un sistema de PIV que genera efectivamente partenotas bovinas capaces de alcanzar la etapa de blastocisto eclosionado. La mejor combinación en nuestro sistema de cultivo consistió en 22 h de maduración *in vitro*/5 h de incubación con 6-dimetilaminopurina. El H₂O₂ incrementó los niveles de ROS y disminuyó el desarrollo en partenotas alrededor del estadio de ocho células, mientras que la quercetina rescató el mencionado efecto. Se sugiere una correlación negativa entre los niveles de ROS y la tasa de desarrollo alrededor del estadio de ocho células en partenotas bovinas. Se obtuvieron primers para evaluar por retrotranscripción-PCR (RT-PCR) la respuesta al estrés oxidativo en bovinos.

Resumen del reporte técnico en inglés (máximo 250 palabras):

The high levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) generate oxidative stress, which diminishes *in vitro* embryo production (IVP) effectivity, either in fertilized- or parthenogenetically-activated embryos. As in other cells, the cellular defense against oxidative stress in embryos includes proteins of the oxidative stress response, whose codifying transcripts can be quantified to evaluate such process. The *in vitro* supplementation of the antioxidant quercetin decreases embryo oxidative stress. The objective was to evaluate the effects of the *in vitro* supplementation of the oxidant hydrogen peroxide (H₂O₂), as well as quercetin on the development and ROS levels in bovine parthenotes, in addition to obtain primers to quantify the levels of transcripts related to the oxidative stress response. It was established an effective IVP system that generates bovine parthenotes able to reach the hatched blastocyst stage. The best combination in our culture system was *in vitro* maturation for 22 h /6-dimethylaminopurine incubation for 5 h. H₂O₂ increased ROS levels and diminished parthenogenetic development around the 8-cell stage, while quercetin rescued such effect. It is suggested a negative correlation between ROS levels and the developmental rate around the 8-cell stage in bovine parthenotes. It was obtained a set of primers to evaluate oxidative stress in bovines by retrotranscription-PCR (RT-PCR).

Palabras clave:

Quercetina; Flavonoide; Estrés oxidativo; Ganado; Partenogénesis; *In vitro*; Desarrollo temprano; Embrión; Respuesta al estrés oxidativo

Usuarios potenciales (del proyecto de investigación)

- Estudiantes de Lic. MVZ de UACJ (formación de recursos humanos)
- Estudiantes de Maestría en Ciencia Animal de UACJ (futura formación de recursos humanos).
- Departamento de Ciencias Veterinarias y Programa Lic. MVZ (formación de recursos humanos; vinculación con el Rastro Municipal de Ciudad Juárez, el grupo Agroindustrial Escobar S.A. de C.V. y el Border Biomedical Research Center-UTEP).
- Industria ganadera local (p. ej., grupo Agroindustrial Escobar S.A. de C.V.) nacional e internacional (aprovechamiento de protocolos mejorados de producción *in vitro* de embriones).

Reconocimientos

Se agradece por el apoyo al proyecto a: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez-Departamento de Ciencias Veterinarias; estudiantes de Lic. MVZ (UACJ) Bianca Viviana Orozco Galindo, Melissa Molina García, Christian Yael Félix Delgado y Gitzel Cárdenas Ochoa; y al Rastro Municipal de Ciudad Juárez.

1. Introducción

La producción *in vitro* de embriones (PIV) ha sido empleada con éxito durante décadas en la clínica humana, conservación de especies animales y en la producción animal. No obstante, el estrés oxidativo, acrecentado por el subóptimo ambiente *in vitro*, disminuye la efectividad de los protocolos de PIV (Hardy, Day & Morris, 2021). En células embrionarias, al igual que en cualquier tipo de células, el estrés oxidativo causa daños en membranas, de forma importante debido a la peroxidación lipídica, disfunción de metabolismo mitocondrial, ruptura de ADN, falla general de organelos, entre otros efectos negativos (Aitken, Baker & Nixon, 2015). El daño celular por estrés oxidativo disminuye la calidad embrionaria, además de las tasas de desarrollo a estadios más avanzados. Por ello, el estrés oxidativo es un obstáculo para un mayor aprovechamiento de la PIV, tanto en tratamientos de fertilidad humana, conservación de vida silvestre y en la industria ganadera (Hardy *et al.*, 2021). El estrés oxidativo es una condición en la que la célula pierde su homeostasis, generando un exceso de especies reactivas de oxígeno (ERO/reactive oxygen species, ROS) que los mismos mecanismos celulares de detoxificación ya no logran controlar. Este proceso induce un desbalance en el estatus redox intracelular. Como indican Leininger, Edwards, Lipshaw & Feldman (2006), las ERO, que también son un producto normal del metabolismo, incluyen figuras químicas que contienen oxígeno y son altamente reactivas. Entre las ERO más conocidas se encuentran los iones hipoclorito (OCl^-), superóxido (O_2^-) e hidroxilo (OH^-), el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Los mecanismos por medio de los cuales el estrés oxidativo daña a las células en general y a los embriones en desarrollo no han sido completamente dilucidados. Una parte crucial para comprender los estragos del estrés oxidativo en la fisiología embrionaria consiste en medir los niveles intracelulares de ERO. Bain, Madan & Betts (2011); Bain Madan & Betts (2013); y Betts, Bain & Madan (2014) han empleado exitosamente la tinción fluorescente de ERO con reactivos tipo diclorofluoresceína (DCF) para medir sus niveles intracelulares en embriones preimplantación. Asimismo, para la comprensión de los mecanismos del estrés oxidativo se requieren modelos *in vitro* en los que se provoque el incremento significativo de las ERO. Esto ha sido logrado mediante la adición en cultivo H_2O_2 de ovocitos y embriones tempranos para investigar en ellos los efectos del estrés oxidativo (Bain *et al.*, 2011; Bain *et al.*, 2013; Yu, Long, Lyu, Zhang, Yan *et al.*, 2014). Por otra parte, para el entendimiento de los mecanismos moleculares inducidos por el exceso de ERO es necesario estudiar las defensas intrínsecas de la célula como respuesta al estrés oxidativo. Las vías de la respuesta celular al estrés oxidativo incluyen proteínas antioxidantes y reguladoras de mecanismos antioxidantes. Algunas proteínas importantes en esta respuesta antioxidante incluyen DJ-1/PARK7, NRF2, KEAP1, PINK1, CAT, GPX1, SOD1 y SOD2 (Miyamoto, Nagai, Kitamura, Nishikawa, Ikegami *et al.*, 2011; Richarme & Dairou, 2017). Notablemente, la técnica de retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) ha producido información importante sobre los niveles de los transcritos codificantes de las proteínas de la respuesta antioxidante intrínseca de ovocitos y embriones (Romar, De Santis, Papillier, Perreau, Thélie *et al.*, 2011). Por tanto, es posible emplear el análisis a nivel transcrito

para dilucidar los mecanismos reguladores de la defensa contra el estrés oxidativo durante el desarrollo temprano.

Después de comprender parte de los mecanismos reguladores del estrés oxidativo resultaría más sencillo disminuir sus daños en ovocitos y embriones. Esto ha sido ensayado mediante la suplementación *in vitro* de agentes antioxidantes, incluyendo flavonoides. La quercetina es un flavonoide cuya adición en cultivo ha probado ser efectiva para disminuir el estrés oxidativo en ovocitos y embriones, en algunos casos incluso mejorando el desarrollo (Guemra, Monzani, Santos, Zanin, Ohashi *et al.*, 2013; Kang, Kwon, Park, Kim, Moon *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014; Kang, Moon, Choi, Park, Kim *et al.*, 2016; Sovernigo, Adona, Monzani, Guemra, Barros *et al.*, 2017; Sameni, Javadinia, Safari, Tabrizi Amjad, Khanmohammadi *et al.*, 2018). Para un mejor aprovechamiento de estrategias para mejorar la PIV, incluyendo la suplementación antioxidante, resultaría ventajoso enfocarse en momentos cruciales durante el desarrollo temprano y que muestren alta sensibilidad al estrés celular. Un momento clave en el desarrollo temprano es la activación del genoma embrionario (AGE), la cual ocurre en bovinos alrededor del estadio de 5 a 16 células, con una mayor inducción hacia el estadio de 8 células durante la segmentación (Graf, Krebs, Zakhartchenko, Schwalb, Blum *et al.*, 2014). Remarcablemente, Gad, Hoelker, Besenfelder, Havlicek, Cinar *et al.* (2012) reportaron que los embriones de bovino son altamente sensibles al estrés oxidativo al momento de la AGE. Por tanto, dicho instante podría emplearse para estudiar los posibles efectos de las modificaciones del balance redox (p. ej., con la adición de oxidantes y antioxidantes, como el H₂O₂ y la quercetina, respectivamente) en el desarrollo, ya sea en embriones generados por fertilización *in vitro* (FIV), o activación partenogenética. En este último aspecto, el cultivo de embriones partenogenéticos (partenotas) constituye un modelo de gran utilidad y alternativo a los embriones-FIV, ya que las partenotas recapitulan fidedignamente gran parte del desarrollo y los procesos fisiológicos de los embriones comunes en mamíferos (Paffoni, Brevini, Gandolfi & Ragni, 2008; Muñoz, Pennarossa, Caamaño, Díez, Brevini *et al.*, 2015). Por tanto, este proyecto se enfocó a establecer un sistema de cultivo partenogenético para investigar los efectos de la suplementación *in vitro* del H₂O₂ y la quercetina durante la etapa de segmentación, así como en la obtención de primers para futuros estudios de la respuesta al estrés oxidativo por RT-PCR en bovinos.

2. Planteamiento

2.1 Antecedentes

2.1.1 Importancia de la producción *in vitro* de embriones.

Es ampliamente conocida la importancia de la PIV para la generación de embriones de calidad y viables para transferencia en hembras receptoras. Esta estrategia ha sido utilizada con éxito en tratamientos de fertilidad en humanos, en la conservación de especies animales en algún estatus de conservación, así como para el incremento de la producción animal (Mucci *et al.*, 2006; Lopera-Vásquez *et al.*, 2016;

Callesen *et al.*, 2019). En este último aspecto, la PIV se ha empleado por la industria ganadera para la generación acelerada y masiva de crías de calidad. Esto se ha logrado con la transferencia de embriones, producidos a partir de gametos de padres con alta genética, a hembras receptoras (Callesen *et al.*, 2019). Para un mayor aprovechamiento de la PIV en cualquiera de sus aplicaciones es necesario el mejoramiento de sus protocolos. Parte crucial en ello consiste en la disminución del estrés en ovocitos y embriones.

2.1.2 Impacto del estrés oxidativo en el desempeño de la PIV.

Un tipo de estrés que afecta de manera importante a ovocitos y embriones durante su el cultivo *in vitro* es el estrés oxidativo. Esto se debe a que como en todos los demás tipos de células, el estrés oxidativo causa problemas en la fisiología de las células embrionarias. Por tanto, el estrés oxidativo disminuye la calidad ovocitaria y embrionaria, además de un decremento en las tasas de desarrollo en ovocitos y embriones (Khazaei & Aghaz, 2017; Jeong *et al.*, 2019; Piras *et al.*, 2019).

2.1.3 Estrés oxidativo y especies reactivas de oxígeno

El estrés oxidativo es generado por niveles excesivos de ERO/ROS como para que las células les pueda contrarrestar con sus mecanismos de defensa intrínsecos. Las ERO/ROS incluyen radicales libres producto del metabolismo normal del oxígeno. Algunas ERO/ROS de importancia son el H₂O₂, el OCl⁻, el radical ·OH, el ion OH⁻ y el O₂⁻ (Leininger *et al.*, 2006). Asimismo, Aitken *et al.* (2015) señalan que las ERO/ROS generan un impacto negativo, estructural y funcional en las células. Entre los componentes celulares afectados se encuentran organelos (donde destaca la mitocondria y su proceso respiratorio, el cual es parte crucial en la generación natural de ERO/ROS), membranas y biomoléculas (incluyendo lípidos, ácidos nucleicos y proteínas).

2.1.4 Medición de niveles de especies reactivas de oxígeno por tinción fluorescente en ovocitos y embriones.

Para comprender los mecanismos por los que las ERO/ROS controlan la fisiología (y a niveles excesivos la afectan negativamente) de ovocitos y embriones es necesario medir sus niveles intracelulares. Esto se ha logrado con precisión por medio de la tinción fluorescente de ERO/ROS en ovocitos y embriones de diversas especies con agentes como la 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA) o moléculas muy similares. Con ello, tras microscopía de fluorescencia, se ha logrado hacer una comparativa de la intensidad de la señal de ERO/ROS como un reflejo del nivel de estrés oxidativo durante el desarrollo temprano en distintos estadios, o tras la aplicación de condiciones variables de cultivo (Bain *et al.*, 2011; Ostad Hosseini *et al.*, 2011; Bain *et al.*, 2013; Betts *et al.*, 2014).

2.1.5 Estudios del estrés oxidativo en ovocitos y embriones mediante la adición del agente oxidante peróxido de hidrógeno.

En los estudios del estrés oxidativo se requieren de estrategias efectivas para inducir deliberadamente altos niveles de ERO en los sistemas vivos. Esto se ha logrado en ovocitos y embriones tempranos de roedores (Yu *et al.*, 2014) y bovinos (Bain *et al.*, 2011; Bain *et al.*, 2013; Betts *et al.*, 2014)) por medio de la adición *in vitro* de H₂O₂. La suplementación de este agente oxidante eleva los niveles intracelulares de ERO/ROS pues es un importante precursor de estos últimos (Bain *et al.*, 2011).

2.1.6 Estudios de la respuesta al estrés oxidativo en ovocitos y embriones. Uso de la retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa.

Como se ha mencionado con anterioridad, las células cuentan con su propia defensa celular contra altos niveles de ERO/ROS. Parte de este mecanismo de defensa incluye enzimas antioxidantes y proteínas reguladoras de las mismas. En este grupo de proteínas de ambos tipos se pueden mencionar a DJ-1/PARK7, NRF2, KEAP1, PINK1, CAT, GPX1, SOD1 y SOD2 (Miyamoto *et al.*, 2011; Richarme & Dairou, 2017). Como no siempre es posible evaluar la expresión génica a nivel de la proteína, también es posible estudiar los productos génicos a nivel transcripcional, por medio de la evaluación de los niveles de ARN mensajero (ARNm). Esto se ha logrado en ovocitos y embriones con el uso de RT-PCR para evaluar los niveles del ARNm correspondiente a moléculas de la respuesta al estrés oxidativo (Romar *et al.*, 2011).

2.1.7 Disminución del estrés oxidativo por medio de la suplementación *in vitro* de antioxidantes.

Parte de las estrategias para disminuir el estrés oxidativo durante el desarrollo temprano consiste en la suplementación *in vitro* de antioxidantes. De esta forma (Ostad Hosseini *et al.*, 2011) lograron disminuir los niveles de ERO/ROS en embriones ovinos con la adición de antioxidantes enzimáticos. Por otra parte, los antioxidantes no enzimáticos incluyen moléculas secuestradoras de ERO/ROS o sus precursores. Algunos de ellos son los flavonoides. En este grupo se encuentra la quercetina, cuya adición *in vitro* ha sido demostrada como una estrategia efectiva para disminuir los niveles de ERO/ROS, e incluso mejorar el desarrollo en ovocitos y embriones de roedores (Yu *et al.*, 2014; Sameni *et al.*, 2018), porcinos (Kang *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2016) y bovinos (Guemra *et al.*, 2013; Sovernigo *et al.*, 2017).

2.1.8 Efectos del estrés en momentos cruciales del desarrollo temprano: la etapa de segmentación y la activación del genoma embrionario.

Con el objeto de establecer modelos de estudio en los que se afecte deliberadamente el balance redox durante el desarrollo temprano, se requiere encontrar una ventana de tiempo con alta sensibilidad al estrés celular. De forma interesante, Gad *et al.* (2012) reportaron que el momento donde ocurre la AGE

en bovinos es un instante en el que los embriones son altamente sensibles a cambios en las condiciones de cultivo, facilitando la ocurrencia de estrés oxidativo.

2.1.9 Modelos alternativos para el estudio del desarrollo temprano: embriones partenogenéticos.

Los efectos del estrés oxidativo durante el desarrollo temprano pueden estudiarse con embriones de distinto origen. Es decir, ya sea con embriones generados por medio de FIV, o con embriones obtenidos tras activación partenogenética (partenotas). Los embriones partenogenéticos en mamíferos no se producen de forma natural en la vasta mayoría de los casos. No obstante, es posible inducir artificialmente el inicio de las divisiones celulares de un ovocito mamífero mediante procesos de activación físicos (p. ej., descarga eléctrica) o químicos (exposición a un agente químico). El principio activador consiste en incrementar los niveles de ion calcio intracelular a partir de los reservorios del mismo ion en el retículo endoplasmático. Es posible inducir este mecanismo con la adición en cultivo de sustancias movilizadoras de ion calcio, tales como cloruro de estroncio o ionomicina, para generar los picos de ion calcio de una forma similar a como ocurren tras la fertilización (Méo *et al.*, 2007). No obstante, para mejores resultados con los protocolos de producción de partenotas de mamífero se requiere optimizar el proceso artificial de activación. Esto se ha alcanzado al ensayar distintos periodos de maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos, así como incubación con inhibidores generales de proteína quinasa. Esto último tiene el objeto de inhibir el factor promotor de la maduración presente en el citoplasma heredado por el ovocito al presunto cigoto, facilitando la transición de un ciclo celular meiótico al primer ciclo mitótico (Méo *et al.*, 2007; Orozco-Lucero, Orozco-Galindo, Quintero-Elisea, Itza-Ortiz, Chavez-Solano *et al.*, 2020). Paffoni *et al.* (2008) y Muñoz *et al.* (2015) indican que la generación de embriones partenogenéticos es un modelo válido para el estudio de la fisiología durante el desarrollo temprano en mamíferos. Lo anterior obedece el hecho de que en partenotas se recapitulan fidedignamente parte importante de los eventos durante los primeros pasos de la embriogénesis sin necesidad de fusionar un ovocito con un espermatozoide durante la fertilización. Además, múltiples autores señalan el valor de los embriones partenogenéticos para la caracterización de la fisiología del desarrollo temprano en varias especies, incluyendo bovinos (Lechniak *et al.*, 1998; Bastos *et al.*, 2008; Golding *et al.*, 2011).

2.2 Marco teórico

Con el uso de la producción *in vitro* de embriones (PIV) se han realizado grandes aportaciones durante las últimas décadas a la clínica humana en casos de infertilidad, a la conservación de especies con algún estatus de conservación, así como a la industria ganadera. Sin embargo, un problema central de la PIV consiste en la menor eficiencia de los sistemas de PIV en comparación con los sistemas *in vivo* de generación de embriones en todas las especies estudiadas de mamíferos. Lo anterior consta principalmente en la capacidad de alcanzar la etapa de blastocisto (Gardner & Lane, 1998; Bettgowda

et al., 2008; Bols *et al.*, 2012; Boni, 2012). Existen dos grandes puntos de vista tratando de explicar este fenómeno y la manera en que afecta el desempeño de un sistema de producción de embriones. El primero se enfoca en la calidad intrínseca del ovocito (Blondin *et al.*, 2002; Krisher, 2004; Sirard *et al.*, 2006), mientras que el segundo en la combinación de factores externos al ovocito (Meldrum *et al.*, 2016) y la generación de productos del metabolismo, en el cual la respiración celular juega un papel preponderante. El estrés oxidativo, originado por un exceso de especies reactivas de oxígeno (ERO/ROS), las cuales son producto normal de la respiración celular, ocasiona un significativo impacto negativo sobre la reproducción, incluyendo el desarrollo temprano (Bain *et al.*, 2013; Betts *et al.*, 2014; Meldrum *et al.*, 2016; Menezo *et al.*, 2016; Khazaei & Aghaz, 2017).

Debido a los numerosos efectos negativos del estrés oxidativo en cualquier contexto celular, mencionados previamente, el embrión temprano también sufre un impacto significativo al someterse a altos niveles intracelulares de ERO. Además, para mejorar los resultados de los protocolos de PIV se requiere disminuir el estrés oxidativo durante el cultivo en el laboratorio. Por lo tanto, y dado que aún se carece de información detallada acerca de los mecanismos por los cuales las ERO impactan el desarrollo temprano, en años recientes se han hecho grandes esfuerzos para disminuir los efectos adversos de las ERO durante el desarrollo precoz. Esto se ha intentado mediante la suplementación *in vitro* de agentes antioxidantes durante el cultivo de ovocitos y embriones, tanto del tipo enzimático (Khazaei & Aghaz, 2017), como no enzimático (Rocha-Frigoni *et al.*, 2016; Trapphoff *et al.*, 2016). Algunos de los antioxidantes suplementados *in vitro* que han mostrado disminuir el estrés oxidativo en ovocitos y embriones pertenecen a los flavonoides. La quercetina ha sido reportada como uno de los antioxidantes del grupo de los flavonoides con mayor éxito contra el estrés oxidativo de ovocitos y embriones tras su adición *in vitro* (Guemra *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2016; Sovernigo *et al.*, 2017; Sameni *et al.*, 2018). En cuanto a la evaluación de los niveles de estrés oxidativo en ovocitos y embriones, una estrategia factible consiste en la medición de ERO a través de su tinción fluorescente con reactivos, ya sea del tipo diclorofluoresceína o diclorofluoroscina (Bain *et al.*, 2011; Bain *et al.*, 2013; Betts *et al.*, 2014). Por otro lado, para disminuir los efectos del estrés oxidativo es crucial comprender los mecanismos moleculares de defensa celular contra dicho estrés. Estos mecanismos incluyen la respuesta al estrés oxidativo, vía molecular que consta tanto de proteínas reguladoras, como antioxidantes. Al igual que en otros tipos celulares, las proteínas involucradas en la respuesta antiestrés son intrínsecas del gameto o embrión y son fundamentales para mantener su homeostasis y, por ende, para su supervivencia y desarrollo. Las proteínas de la respuesta al estrés oxidativo son numerosas; entre las más importantes se incluyen DJ-1 (PARK7), NRF2, PINK1, KEAP1, SOD1, SOD2, PRDX1, PRDX2, CAT y GPX (Miyamoto *et al.*, 2011; Richarme & Dairou, 2017).

A pesar de que se cuenta con la información anterior, actualmente aún se pueden mejorar los protocolos de PIV a través de la disminución del estrés oxidativo, mientras que todavía faltan datos acerca de la regulación molecular de la respuesta al estrés oxidativo durante el desarrollo precoz, especialmente

durante la etapa de segmentación, ya sea a nivel proteína, como transcrito. Incluso, resultaría interesante investigar la forma en que un antioxidante aplicado exógenamente contribuye en la modulación de la respuesta antioxidante durante el desarrollo temprano. Notablemente, es posible explorar estos mecanismos a nivel transcrito en ovocitos y embriones por medio de RT-PCR. Un buen inicio consiste en el establecimiento de un sistema experimental en el cual se genere el mayor impacto (pero sin ser completamente letal) por estrés oxidativo durante el desarrollo precoz. Esto tendría un doble propósito: A) investigar los mecanismos moleculares por los que el estrés oxidativo ejerce sus efectos adversos durante el desarrollo temprano; y B) estudiar la posible disminución del estrés oxidativo por medio de la adición *in vitro* de un antioxidante efectivo (p. ej., del tipo flavonoide).

Un momento crucial durante la embriogénesis temprana es la transición materno-embriónica (TME/MET). En este proceso una parte importante de las moléculas maternas (ARNs, proteínas) debe eliminarse para facilitar la toma de control del programa de desarrollo por parte de moléculas sintetizadas a partir de la expresión del genoma del embrión. La TME incluye un evento en el cual se induce la transcripción *de novo* a partir del genoma embrionario: la activación del genoma embrionario (AGE/EGA). La AGE ocurre en bovinos alrededor del estadio de 8-células (Sirard, 2010; Graf *et al.*, 2014; Cajas *et al.*, 2021). Cabe resaltar que mediante el uso del modelo bovino Gad *et al.* (2012) demostraron que el desarrollo al momento de la AGE es un periodo con alta sensibilidad al estrés oxidativo dadas las condiciones subóptimas tras cultivar *in vitro*. Por ello, la aplicación de un estrés exógeno relativamente cercano en tiempo momento de la AGE podría constituir un sistema robusto para el estudio del estrés oxidativo durante el desarrollo temprano. Asimismo, este modelo podría emplearse para investigar potenciales tratamientos paliativos del estrés oxidativo en ovocitos y embriones a través de la suplementación de moléculas con capacidad antioxidante. Parte importante del éxito de sistemas experimentales como el propuesto estriba en la sincronización o *timing* respecto a la activación del ovocito para que proceda con las primeras segmentaciones embrionarias, además de aislar el modelo al estudio de la herencia celular y molecular de uno solo de los gametos. Es posible obtener estas condiciones mediante el empleo de embriones partenogénéticos (partenotas), ya que mediante su obtención experimental se tiene un control mucho más preciso del tiempo que transcurre desde la activación del ovocito hasta algún instante de monitoreo durante el desarrollo embrionario (Bastos *et al.*, 2008). Por otra parte, ya que un embrión partenogénético se forma tras la activación de un ovocito con un estímulo diferente a un espermatozoide en la fertilización, el uso de partenotas constituye una excelente oportunidad de estudiar en un modelo únicamente la contribución materna al desarrollo embrionario (Bastos *et al.*, 2008). En concordancia, Paffoni *et al.* (2008) y Muñoz *et al.* (2015) indican que el cultivo *in vitro* de embriones partenogénéticos de mamífero representa un modelo válido para el estudio de la fisiología durante el desarrollo preimplantación ya que tras la partenogénesis activada se recapitulan con fidelidad parte importante de los eventos durante los primeros pasos de la embriogénesis sin necesidad de fertilizar un óvulo. Además, múltiples autores han demostrado el valor de la

partenogénesis activada para la caracterización de la fisiología del desarrollo temprano en diversas especies, tanto en animales de laboratorio (Ho *et al.*, 2019), como en domésticos (Lechniak *et al.*, 1998; Bastos *et al.*, 2008; Golding *et al.*, 2011). Por todo lo anteriormente expuesto, se formuló la hipótesis de que la suplementación *in vitro* de quercetina disminuye los niveles de ERO previamente incrementados por la adición de H₂O₂ en partenotas de bovino en etapa de segmentación.

3. Objetivos (general y específicos)

3.1 Objetivo general

Evaluar el impacto del estrés oxidativo, y el de la suplementación de un compuesto antioxidante, sobre la competencia al desarrollo de partenotas de bovino, así como la manera en que afectan sus niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO).

3.2 Objetivos específicos

- Generar un sistema *in vitro* de producción de partenotas de bovino por medio de la optimización del tiempo de maduración *in vitro* y de incubación con 6-dimetilaminopurina.
- Establecer un sistema para evaluar el efecto del oxidante peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y la suplementación de un compuesto antioxidante (quercetina) sobre la tasa de segmentación de partenotas de bovino generadas *in vitro*.
- Caracterizar por microscopía de epifluorescencia el impacto de la suplementación de H₂O₂ y/o quercetina sobre los niveles de ERO en partenotas de bovino en etapa de segmentación.
- Preparar primers para en un futuro analizar por retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) las vías moleculares reguladoras de la respuesta al estrés oxidativo en bovinos.

4. Metodología

Primera Parte del Proyecto:

Establecimiento de Un Sistema *In Vitro* para la Generación de Embriones Partenogenéticos de Bovino

Animales y colecta de ovocitos. Los ovarios se colectaron de bovinos sacrificados en el Rastro Municipal de Ciudad Juárez según los estándares éticos de bienestar animal y sacrificio sin dolor del Comité Institucional de Ética y Bioética de la UACJ. Dichos estándares obedecen a la NOM-051-ZOO-1995, sobre el Cuidado humanitario de animales en la movilización; y la NOM-033-ZOO-1995, sobre el Sacrificio humanitario de animales domésticos y silvestres. Estas corresponden a las normas nacionales sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio. Las gónadas se transportaron al laboratorio en 0.9 % (p/v) NaCl, lugar al cual arribaron a una temperatura de 27-32°C. Entre las 1.5 y 4 h postmortem se

puncionaron folículos ováricos de 2 a 8 mm de diámetro con una aguja de 18-20 gauge. Se colectó líquido folicular en un tubo en el cual se agregaron 60 μ L de 5,000 UI/mL heparina (Pisa®, Guadalajara, México), manteniendo a una temperatura de 36°C. La muestra se reposó durante 5-10 min para precipitar el contenido celular (conteniendo ovocitos) y se centrifugó únicamente el sobrenadante a 800 x G/5 min. De esta centrifugación se tomó el sobrenadante, constituido por líquido folicular aclarado, el cual se mezcló con el paquete celular en una caja Petri para comenzar la búsqueda de ovocitos.

Maduración *in vitro*. Al igual que en pasos anteriores y todos los posteriores de manipulación *in vitro*, se trabajó bajo condiciones de esterilidad y manteniendo la muestra. Con un estereoscopio se realizó una búsqueda sistemática de complejos cúmulus-ovocito (COCs). Los COCs se lavaron tres veces con BO-WASH (cat. 61008, IVF Bioscience, Falmouth, Gran Bretaña). Se seleccionó la totalidad de COCs calidad A y B (según la clasificación de Yang *et al.*, 2017), además de sólo los mejores COCs calidad C (ovocito con relative homogeneidad citoplasmática y rodeado de algunas células del cúmulus no excesivamente apoptóticas. Se distribuyeron 45 COCs/500 μ L de medio (previamente equilibrado por 2 h a 38.5°C/6.5% CO₂/100% humedad relativa, HR) BO-IVM (cat. 61002, IVF Bioscience) en un pocillo de cultivo. Se maduró en la atmósfera mencionada por 22 o 24 h, según el tratamiento.

Activación partenogenética. Se verificó la expansión del cúmulus al final de la MIV. Se introdujeron los COCs en BO-WASH/1X (0.33 mg/mL) hialuronidasa. Los ovocitos se desnudaron mecánicamente (micropipeta). Los ovocitos desnudos se lavaron dos veces en BO-WASH y una vez en una gota de 120 μ L de BO-IVF (cat. 61003, IVF Bioscience). Subsecuentemente, se incubaron 10-40 ovocitos por gota de 50 μ L de BO-IVF/5 μ M ionomicina a 38.5°C/6.5% CO₂/100% HR por exactamente 5 min e inmediatamente se lavaron tres veces con BO-WASH. Posterior a la eliminación de la ionomicina, 10-40 ovocitos activados (el instante en el que se colocaron en ionomicina se consideró como el tiempo 0 h postactivación partenogenética, hPA) se incubaron por gota de 50 μ L de BO-IVF/2.8 mM dimetilaminopurina (6-DMAP) bajo la atmósfera mencionada ya sea durante 4 o 5 h, según el tratamiento. Todas las gotas de BO-IVF se cubrieron con aceite mineral para cultivo de embriones y ya estaban equilibradas por 2 h a 38.5°C/6.5% CO₂/100% HR antes de su uso.

Cultivo *in vitro* de partenotas. Los presuntos cigotos (p-Ci) se lavaron tres veces en BO-WASH al finalizar la incubación con 6-DMAP. Enseguida, los p-Ci se lavaron en una gota de 120 μ L de BO-IVC (cat. 61001, IVF Bioscience) y se colocaron 8-12 p-Ci por gota de 10 μ L del mismo medio. Todas las gotas de BO-IVC, cubiertas con aceite mineral, ya estaban equilibradas por 3-8 h a 38.5°C/5% O₂/6% CO₂/89% N₂ antes de su uso. Las partenotas diploides se cultivaron en la atmósfera mencionada.

Evaluación de desarrollo partenogenético. A las 96 hPA se evaluó la segmentación de las partenotas. Los estadios de desarrollo registrados fueron: p-Ci; 2 células (2C); 4 células (4C); 8 células estadio

temprano (5-8 células; 8C Tempr./e8C); y 8 células estadio tardío (10-16 células; 8C Tard./L8C). Con las siguientes fórmulas se estimaron algunos parámetros de desarrollo partenogenético en etapa de segmentación (clivaje):

$$\% \text{ segmentación} = (\text{estr. segmentadas}/\text{COCs MIV}) \times 100 \quad [1]$$

$$\% \text{ 8 – 16C} = [(\text{estr. 8C Tempr.} + \text{estr. 8C Tard.})/\text{COCs MIV}] \times 100 \quad [2]$$

Donde: número de estructuras (estr.); complejos cúmulus-ovocito colocados en maduración *in vitro* (COCs MIV); partenotas de 8 células estadio temprano (5-8 células; 8C Tempr.); partenotas de 8 células estadio tardío (10-16 células; 8C Tard.); y partenotas de 8-16 células (5-16 células; 8-16C).

Posterior al registro de los diversos estadios de segmentación, las partenotas se dejaron en cultivo bajo las mismas condiciones hasta las 192 hPA. Entonces, se registró el número de blastocistos tempranos, expandidos y eclosionados (en los resultados de este trabajo, tanto el término “eclosión”, como “eclosionado” se referirán indistintamente a blastocistos ya completamente eclosionados o en claro proceso de eclosión) y se emplearon las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Blast. Tempr.} = (\text{estr. Blast. Tempr.}/\text{COCs MIV}) \times 100 \quad [3]$$

$$\% \text{ Exp./COCs MIV} = [(\text{blastocistos expandidos} + \text{eclosionados})/\text{COCs MIV}] \times 100 \quad [4]$$

$$\% \text{ Ecl./COCs MIV} = (\text{blastocistos eclosionados}/\text{COCs MIV}) \times 100 \quad [5]$$

$$\% \text{ Blast.} = (\text{Blast.}/\text{COCs MIV}) \times 100 \quad [6]$$

$$\% \text{ Exp./Blast.} = [(\text{blastocistos expandidos} + \text{eclosionados})/\text{Blast.}] \times 100 \quad [7]$$

$$\% \text{ Ecl./Blast.} = (\text{blastocistos eclosionados}/\text{Blast.}) \times 100 \quad [8]$$

Donde: número de estructuras (estr.); complejos cúmulus-ovocito colocados en maduración *in vitro* (COCs MIV); blastocistos partenogenéticos estadio temprano (Blast. Tempr.); blastocistos partenogenéticos con capacidad de expansión (expandidos + eclosionados), considerando el número de complejos cúmulus-ovocito colocados en maduración *in vitro* (Exp./COCs MIV); blastocistos partenogenéticos eclosionados, considerando el número de complejos cúmulus-ovocito colocados en maduración *in vitro* (Ecl./COCs MIV); blastocistos partenogenéticos totales (Blast.); blastocistos partenogenéticos con capacidad de expansión (expandidos + eclosionados), considerando el número de blastocistos totales (Exp./Blast.); y blastocistos partenogenéticos eclosionados, considerando el número de blastocistos totales (Ecl./Blast.).

Diseño experimental. Se evaluó el efecto de dos distintos periodos de MIV (22 y 24 h), además del impacto de dos diferentes tiempos (4 y 5 h) de incubación con 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), inhibidor de actividad proteína quinasa sobre los previamente mencionados parámetros de desarrollo partenogenético en etapa de segmentación y de blastocisto. Por lo tanto, los grupos fueron: a) Control, 22 h MIV/4 h 6-DMAP; b) 22 h MIV/5 h 6-DMAP; c) 24 h MIV/4 h 6-DMAP; y d) 24 h MIV/5 h 6-DMAP. Se emplearon cinco réplicas biológicas en el grupo Control y seis para los otros grupos.

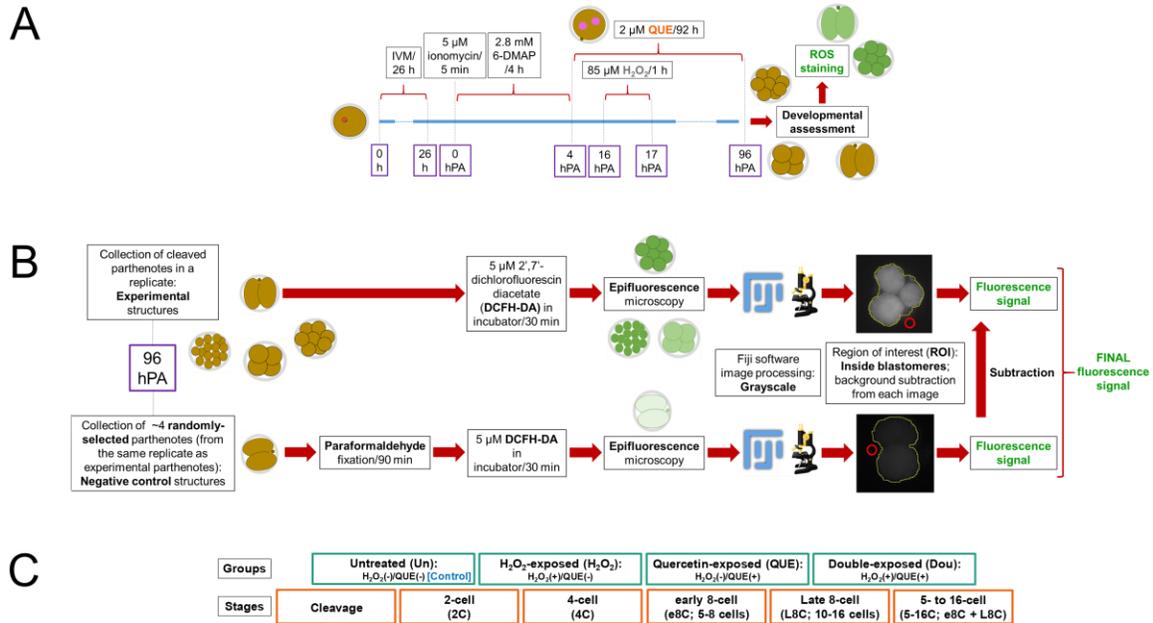
Análisis estadístico. Todos los análisis se realizaron con el software GraphPad Prism® 8.0 (GraphPad Software San Diego, CA). Se graficaron las medias de los porcentajes de los diferentes parámetros de desarrollo partenogenético, además del error estándar (E.E). El efecto de los tratamientos sobre el desarrollo se estimó a través de análisis de varianza (ANOVA) de una vía y se realizó una prueba de Tukey *post hoc* para comparar múltiples medias. Se consideraron diferencias significativas cuando $P \leq 0.05$.

Segunda Parte del Proyecto:

Efectos de la Suplementación *In Vitro* de Peróxido de Hidrógeno y Quercetina en Partenotas Bovinas Segmentadas

Obtención de complejos cúmulus ovocito y maduración *in vitro*. Los COCs se obtuvieron y se maduraron *in vitro* de la forma ya mencionada en la Metodología de la Primera Parte del Proyecto, excepto con las siguientes diferencias: i) los ovocitos seleccionados fueron aquellos con un citoplasma homogéneo y múltiples capas compactas de células del cúmulus sin signos de apoptosis o únicamente con una ligera incidencia hacia la periferia del cúmulus (Blondin & Sirard, 1995); y ii) se colocaron 10 COCs por gota de 50 μ L para someterse a MIV por 26 h bajo 38.5°C/6.5% CO₂/100% HR (Fig. 1A).

Figura 1. Metodología



A) Generación de partenotas y exposición a tratamientos con agente oxidante (H₂O₂) y antioxidante (QUE); B) tinción de especies reactivas de oxígeno (ERO/ROS) y obtención de señal de fluorescencia; C) grupos y estadios de desarrollo evaluados. Maduración *in vitro* (MIV/IVM); 6-dimetilaminopurina (6-DMAP); horas postactivación partenogenética (hPA); peróxido de hidrógeno (H₂O₂); quercetina (QUE); 2',7'-diclorofluoroscina diacetato (DCFH-DA); región de interés (línea amarilla delgada); ejemplo de la zona de la que se restó el valor de fluorescencia de fondo en cada imagen (círculo rojo); presencia (+); ausencia (-).

Activación partenogenética y cultivo *in vitro*. Los ovocitos desnudos se obtuvieron y se activaron partenogenéticamente, mientras que las partenotas se cultivaron *in vitro* como ya se describió en la Metodología de la Primera Parte del Proyecto, pero con las diferencias a continuación: i) la incubación con 6-DMAP se realizó durante 4 h en todos los casos; y ii) la atmósfera de la incubadora consistió en 38.5°C/6% CO₂/6% O₂/88% N₂/100% HR (Fig. 1A).

Tratamientos con peróxido de hidrógeno y quercetina. Desde que los p-Ci se colocaron en medio BO-IVC se expuso a 2 μM quercetina (cat. Q4951, Sigma®), donde la concentración del flavonoide fue acorde con los reportes de Guemra *et al.* (2013) y Sovernigo *et al.* (2017). La incubación con quercetina se hizo desde el inicio del CIV como pretratamiento antioxidante, siguiendo el ejemplo de Yu *et al.* (2014). Los p-Ci se incubaron por 1 h con 85 μM H₂O₂ (modificado de Betts *et al.*, 2014) 12 hr después del inicio del CIV (16-17 hPA). Los p-Ci se lavaron tres veces con BO-WASH y se colocaron en BO-IVC en ausencia de H₂O₂, aunque en presencia del flavonoide hasta las 96 hPA (Fig. 1A).

Evaluación de desarrollo partenogenético. La segmentación se monitoreó visualmente a las 96 hPA, registrándose los siguientes estadios: 2 células (2C); 4 células (4C); 8 células estadio temprano (5-8

células; 8C Tempr./e8C); 8 células estadio tardío (10-16 células; 8C Tard./L8C) y 5 a 16 células (5-16C; sumatoria de los datos de 8C Tempr. y 8C Tard.): Fig. 1C. Se emplearon las siguientes fórmulas para estimar las tasas de los diferentes estadios:

$$\% \text{ Segmentación} = \frac{\text{estr. segmentadas}}{\text{COCs MIV}} \times 100 \quad [9]$$

$$\% 2C = \frac{\text{estr. 2C}}{\text{COCs MIV}} \times 100 \quad [10]$$

$$\% 4C = \frac{\text{estr. 4C}}{\text{COCs MIV}} \times 100 \quad [11]$$

$$\% 8C \text{ Tempr.} = \frac{\text{estr. 8C Tempr.}}{\text{COCs MIV}} \times 100 \quad [12]$$

$$\% 8C \text{ Tard.} = \frac{\text{estr. 8C Tard.}}{\text{COCs MIV}} \times 100 \quad [13]$$

$$\% 5 - 16C = \frac{\text{estr. 8C Tempr.} + \text{estr. 8C Tard.}}{\text{COCs MIV}} \times 100 \quad [14]$$

Donde: número de estructuras (estr.); complejos cúmulus-ovocito colocados en maduración *in vitro* (COCs MIV); 2 células (2C); 4 células (4C); 8 células estadio temprano (5-8 células; 8C Tempr.); 8 células estadio tardío (10-16 células; 8C Tard.); y 5 a 16 células (5-16C).

Tinción de especies reactivas de oxígeno y evaluación de fluorescencia. A las 96 hPA se colectaron las partenotas para su tinción fluorescente. Las estructuras segmentadas se incubaron en BO-IVC/5 μM 2',7'-diclorofluoroscina diacetato (DCFH-DA) a 38.5°C/6% CO_2 /6% O_2 /88% N_2 /100% HR. Después de 30 min, las estructuras se lavaron tres veces con 1X PBS/1 mg/mL alcohol polivinílico, se montaron en un portaobjetos con cubreobjetos e inmediatamente se capturó una sola imagen de epifluorescencia por partenota con un objetivo 20X de un microscopio Axio Observer.Z1 (Zeiss; Oberkochen, Alemania). Se empleó un filtro de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 495 nm y emisión de 520 nm y cada imagen se expuso durante 150 mS con el software ZEN Blue 2011 (Zeiss). En cada experimento se emplearon al menos tres réplicas con un mínimo de tres partenotas cada una. Con el software Fiji (<https://fiji.sc>; Schindelin, Arganada-Carreras, Friese, Kaying, Longair *et al.*, 2012) se transformó cada imagen del canal verde a una imagen en escala de grises. Con ello se determinó el nivel de

fluorescencia en cada uno de los estadios por separado. El nivel de fluorescencia en el estadio 5-16C se estimó con la combinación de los datos de fluorescencia de 8C Tempr. y 8C Tard. La región de interés (ROI) consistió en el citoplasma de todos los blastómeros de cada estructura; se excluyó la zona pellucida. Para obtener un nivel de fluorescencia parcial, a cada ROI se le sustrajo el valor de fluorescencia de fondo de su propia imagen (zona oscura fuera de la ROI). Enseguida, a este valor parcial de una partenota individual se le restó la intensidad de fluorescencia del control negativo de su propio experimento. El control negativo consistió en el promedio de la fluorescencia de 3-4 partenotas fijadas en 4% (p/v) paraformaldehído previo a su incubación en 2',7'-DCFH-DA (Betts *et al.*, 2014). Finalmente, el nivel de fluorescencia (denotando el nivel de ERO/ROS) se expresó en unidades arbitrarias (U.A): Fig. 1B.

Diseño experimental. Se evaluó el efecto de la suplementación, tanto sobre el desarrollo en etapa de segmentación, como sobre el nivel de fluorescencia tras la tinción de ERO/ROS. Debido a que las partenotas se cultivaron en presencia (+) o ausencia (-) de H₂O₂ y/o quercetina (QUE), los grupos fueron: i) No tratado (Control; Un), H₂O₂(-)/QUE(-); ii) tratamiento con H₂O₂ (H₂O₂), H₂O₂(+)/QUE(-); iii) tratamiento con quercetina (QUE), H₂O₂(-)/QUE(+); y iv) tratamiento doble (Dou), H₂O₂(+)/QUE(+): Fig. 1C. Se emplearon cinco réplicas para el grupo Un y seis para los demás grupos.

Análisis estadístico. Antes del análisis estadístico los datos en porcentaje (desarrollo), se transformaron en arcoseno. Enseguida, en todos los casos se utilizó el software GraphPad Prism 8.0. Se graficó la media ± error estándar (E.E) de la tasa de desarrollo y el nivel de fluorescencia de los tratamientos con respecto a la media del grupo Un. Tanto para desarrollo, como para fluorescencia se empleó una prueba T múltiple (Holm-Sidak). Se consideraron diferencias significativas cuando $P \leq 0.05$.

Tercera Parte del Proyecto:

Obtención de primers para el análisis por retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) de la respuesta al estrés oxidativo en bovinos

Las secuencias de los primers (oligonucleótidos o cebadores) para amplificar fragmentos de ácido nucleico correspondientes a los ARN mensajeros (ARNm) codificados por genes bovinos, ya sea de tipo housekeeping o involucrados en la respuesta al estrés oxidativo se obtuvieron de la literatura o se diseñaron por propia cuenta. En el primer caso las secuencias de los primers correspondieron a reportes en los cuales ya se haya realizado exitosamente RT-PCR en bovino. Por otra parte, cuando se optó por diseñar nuevos primers se empleó el software PrimerQuest™ Tool de Integrated DNA Technologies™ (IDT™, Coralville, IA). Los genes correspondieron a: actin beta (*ACTB*); component of inhibitor of nuclear factor kappa B kinase complex (*CHUK*); beta-2-microglobulin (*B2M*); myosin light chain 6 (*MYL6*);

peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*); protein/nucleic acid deglycase DJ-1/Parkinson protein 7 (*DJ-1/PARK7*); Kelch-like ECH associated protein 1 (*KEAP1*); PTEN-induced kinase 1 (*PINK1*); nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (*NRF2*); superoxide dismutase 1, soluble (*SOD1*); superoxide dismutase 2, mitochondrial (*SOD2*); peroxiredoxin 1 (*PRDX1*); peroxiredoxin 2 (*PRDX2*); glutathione peroxidase 1 (*GPX1*); y catalase (*CAT*). La información empleada para la obtención de los primers se muestra en la Tabla 1 y la Tabla 2.

Tabla 1. Información inicial para la obtención de primers de bovino para amplificación de ARNm codificados por housekeeping genes

Nombre del primer	Referencia/Número de Acceso de GenBank
<i>ACTB</i> -Fw1	Orozco-Lucero <i>et al.</i> (2014)
<i>ACTB</i> -Rv1	
<i>CHUK</i> -Fw1	Orozco-Lucero <i>et al.</i> (2014)
<i>CHUK</i> -Rv1	
<i>B2M</i> -Fw1	Cagnone <i>et al.</i> (2012)
<i>B2M</i> -Rv1	
<i>MYL6</i> -Fw1	Cagnone & Sirard (2014)
<i>MYL6</i> -Rv1	
<i>PPIA</i> -Fw1	Cagnone & Sirard (2014)
<i>PPIA</i> -Rv1	

Tabla 2. Información inicial para la obtención de primers de bovino para amplificación de ARNm codificados por genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo

Nombre del primer	Referencia/Número de Acceso
<i>DJ1-Fw1</i>	NM_001015572
<i>DJ1-Rv1</i>	
<i>DJ1-Fw2</i>	NM_001015572
<i>DJ1-Rv2</i>	
<i>KEAP1-Fw1</i>	NM_001101142.1
<i>KEAP1-Rv1</i>	
<i>KEAP1-Fw2</i>	NM_001101142.1
<i>KEAP1-Rv2</i>	
<i>PINK1-Fw1</i>	NM_001099701.2
<i>PINK1-Rv1</i>	
<i>PINK1-Fw2</i>	NM_001099701.2
<i>PINK1-Rv2</i>	
<i>NRF2-Fw1</i>	Saeed-Zidane <i>et al.</i> (2017)
<i>NRF2-Rv1</i>	
<i>NRF2-Fw2</i>	Sohel <i>et al.</i> (2017)
<i>NRF2-Rv2</i>	
<i>SOD1-Fw1</i>	Saeed-Zidane <i>et al.</i> (2017)
<i>SOD1-Rv1</i>	
<i>SOD1-Fw2</i>	NM_174615.2
<i>SOD1-Rv2</i>	
<i>SOD2-Fw1</i>	Bühler <i>et al.</i> (2017)
<i>SOD2-Rv1</i>	
<i>SOD2-Fw2</i>	NM_201527.2
<i>SOD2-Rv2</i>	
<i>PRDX1-Fw1</i>	Campos-Junior <i>et al.</i> (2016)
<i>PRDX1-Rv1</i>	
<i>PRDX1-Fw2</i>	NM_174431.1
<i>PRDX1-Rv2</i>	
<i>PRDX2-Fw1</i>	Romar <i>et al.</i> (2011)
<i>PRDX2-Rv1</i>	
<i>PRDX2-Fw2</i>	NM_174763.2

PRDX2-Rv2	
GPX1-Fw1	Bühler <i>et al.</i> (2017)
GPX1-Rv1	
GPX1-Fw2	Singh <i>et al.</i> (2011)
GPX1-Rv2	
CAT-Fw1	NM_001035386.2
CAT-Rv1	
CAT-Fw2	NM_001035386.2
CAT-Rv2	

5. Instituciones, organismos o empresas de los sectores social, público o productivo participantes (Si aplica)

- Rastro Municipal de Ciudad Juárez (proporcionó muestras biológicas).
- Universidad Autónoma de Ciudad Juárez-Departamento de Ciencias Veterinarias.
- The University of Texas at El Paso-Border Biomedical Research Center.

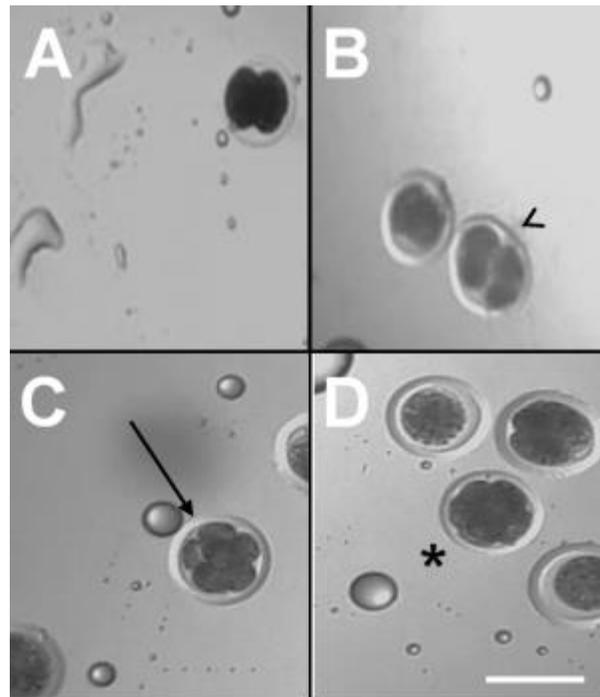
6. Resultados

Primera Parte del Proyecto:

Establecimiento de Un Sistema *In Vitro* para la Generación de Embriones Partenogénéticos de Bovino

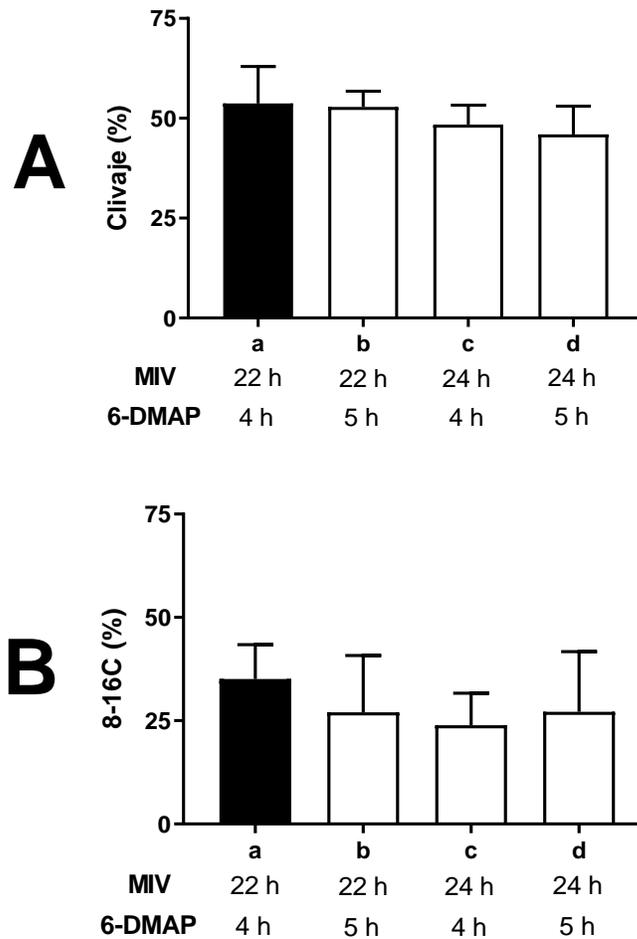
Evaluación de la eficiencia original del sistema partenogénético. En primer lugar, con este sistema de cultivo se produjeron *in vitro* partenotas con capacidad de efectuar las primeras segmentaciones (Figura 2). Por otra parte, la tasa de segmentación del grupo Control, 22 h MIV/4 h 6-DMAP resultó de $53.73 \pm 9.23\%$ (Figura 3A), lo cual fue relativamente cercano al mismo parámetro reportado en otras plataformas partenogénéticas de bovino (Méo *et al.*, 2007). Por lo tanto, el presente sistema de producción de partenotas bovinas es aceptable en términos de capacidad de segmentación.

Figura 2. Embriones partenogenéticos de bovino en etapa de segmentación.



Los complejos cúmulus-ovocito se maduraron *in vitro* por 22 h. Los ovocitos se activaron con ionomicina durante 5 min. Los presuntos cigotos resultantes se cultivaron en presencia de 6-dimetilaminopurina por 4 h. A) partenota de 2 células; B) partenota de 4 células (cabeza de flecha); C) partenota de 8 células de estadio temprano (5-8 células; flecha); D) partenota de 8 células de estadio tardío (10-16 células; asterisco). Barra de escala: 120 μ m.

Figura 3. Desarrollo partenogénico en etapa de segmentación como consecuencia de la aplicación de diferentes tiempos de maduración *in vitro* y exposición con 6-dimetilaminopurina

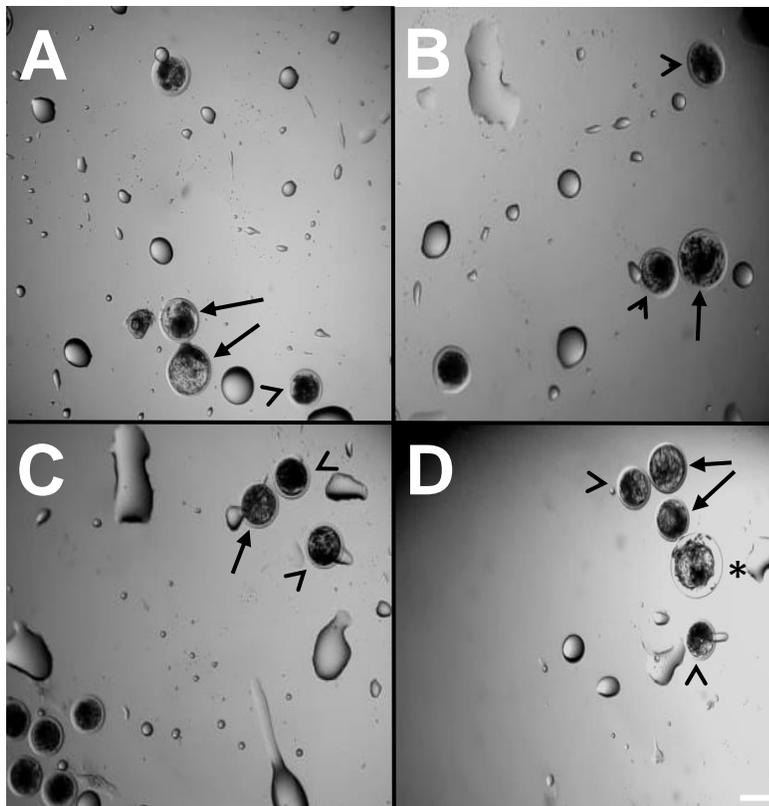


A) tasa de segmentación (clivaje); B) tasa de partenotas de 8 a 16 células (8-16C; partenotas de 8 células estadio temprano + 8 células estadio tardío). a) Control, 22 h de maduración *in vitro* (MIV) y 4 h de exposición con 6-dimetilaminopurina (6-DMAP). n = 178; b) 22 h MIV/5 h 6-DMAP. n = 226; c) 24 h MIV/4 h 6-DMAP. n = 212; d) 24 h MIV/5 h 6-DMAP. n = 197. Las barras muestran la media \pm error estándar (E.E). Las diferencias se consideraron significativas cuando $P \leq 0.05$ (*).

Por otra parte, el presente sistema partenogenético fue capaz de producir embriones de 8 a 16 células (Figura 2). Se observó que en el grupo Control, 22 h MIV/4 h 6-DMAP la tasa de desarrollo en la mencionada etapa fue de $35.11 \pm 8.29\%$ (Gráfica 3B).

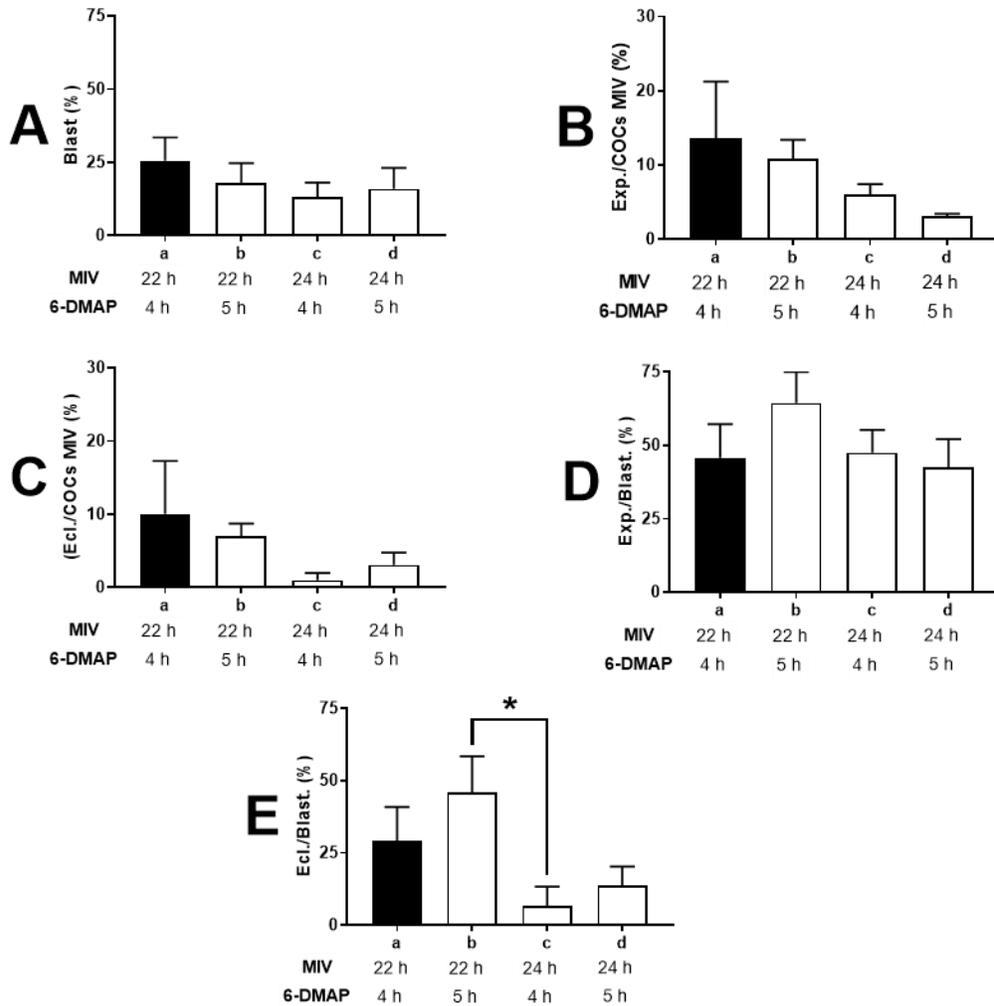
Uno de los objetivos principales de esta primera parte del proyecto fue generar partenotas capaces de alcanzar la etapa de blastocisto, lo cual pudo lograrse, como se aprecia en la Figura 4). La tasa de blastocistos totales (Blast.) se calculó al considerar el número de COCs colocados originalmente en MIV, la cual fue de $25.52 \pm 8.02\%$ en el grupo Control, 22 h MIV/4 h 6-DMAP (Figura 5A). Este porcentaje fue comparable a las tasas de blastocistos totales de otros sistemas partenogenéticos de bovino (Méo *et al.*, 2007). Incluso, el presente resultado fue similar a valores en el rango de porcentajes promedio de blastocistos totales en diversos sistemas de PIV tras fertilización *in vitro* (FIV) en esta especie (Sirard *et al.*, 2006). Por lo tanto, los resultados denotan un nivel aceptable de producción de blastocistos bovinos por el presente sistema partenogenético.

Figura 4. Blastocistos bovinos partenogenéticos producidos como consecuencia de la aplicación de diferentes tiempos de maduración *in vitro* y exposición con 6-dimetilaminopurina



A) Control: 22 h de maduración *in vitro* (MIV) y 4 h de incubación con 6- dimetilaminopurina (6-DMAP); B) 22 h MIV/5 h 6-DMAP; C) 24 h MIV/4 h 6-DMAP; D) 24 h MIV/5 h 6-DMAP. Blastocisto temprano (cabeza de flecha); blastocisto expandido (flecha); blastocisto en vías de eclosión (asterisco). Barra de escala: 120 μm .

Figura 5. Desarrollo partenogénico en etapa de blastocisto como consecuencia de la aplicación de diferentes tiempos de maduración *in vitro* y exposición con 6-dimetilaminopurina



A) tasa de blastocistos totales (Blast.); B) tasa de blastocistos con capacidad de expandir, considerando el número de complejos cúmulus-ovocito colocados en maduración *in vitro* (Exp./COCs MIV); C) tasa de blastocistos eclosionados, considerando el número de complejos cúmulus-ovocito colocados en maduración *in vitro* (Ecl./COCs MIV); D) tasa de blastocistos con capacidad de expandir, considerando el número de blastocistos totales (Exp./Blast.); E) porcentaje de blastocistos eclosionados, considerando el número de blastocistos totales (Ecl./Blast.). a) Control, 22 h de maduración *in vitro* (MIV) y 4 h de exposición con 6-dimetilaminopurina (6-DMAP). n = 178 COCs IVM y n = 45 Blast.; b) 22 h MIV/5 h 6-DMAP. n = 226 COCs IVM y n = 40 Blast.; c) 24 h MIV/4 h 6-DMAP. n = 212 COCs IVM y n = 28 Blast.; d) 24 h MIV/5 h 6-DMAP. n = 197 COCs IVM y n = 32 Blast. Las barras muestran la media ± error estándar (E.E). Las diferencias se consideraron significativas cuando $P \leq 0.05$ (*).

Se estimó la tasa de blastocistos partenogénicos capaces de expandirse (combinación de datos de blastocistos expandidos y eclosionados), considerando la cantidad de COCs originalmente colocados en MIV (Exp./COCs MIV) fue de $13.53 \pm 7.74\%$ en el grupo Control (Figura 5B). En cuanto a la tasa de eclosión (sólo blastocistos eclosionados), considerando el número de COCs sometidos a MIV (Ecl./COCs MIV), lo cual indica la capacidad de eclosión total del sistema de PIV, se obtuvo $10.03 \pm 7.25\%$ también en el Control (Figura 5C). Los resultados en este parámetro fueron similares a los de Felmer *et al.* (2011) en bovinos. Para concluir con los parámetros de desarrollo en la etapa de blastocisto, se analizó la tasa de eclosión, tomando en cuenta solamente el número de blastocistos y no de estructuras originales en el cultivo (Ecl./Blast.). Este parámetro representa la tasa de eclosión que generalmente se registra en los trabajos de PIV (Felmer *et al.*, 2011). En el presente sistema, el parámetro Ecl./Blast. en el grupo Control resultó de $29.24 \pm 11.74\%$ (Figura 5E), lo cual también es comparable a lo reportado en la literatura para esta especie (Felmer *et al.*, 2011). Por lo tanto, debido a los resultados satisfactorios en cuanto a segmentación y generación de blastocistos expandidos, así como eclosionados, se considera posible utilizar el presente sistema de cultivo partenogénico en investigaciones sobre el desarrollo temprano en bovinos. Sería factible mejorar el desempeño de este sistema partenogénico a través de variaciones en el proceso preparativo del ovocito a activar, además del método de activación del mismo.

Producción de blastocistos bovinos partenogénicos por medio de diferentes tiempos de maduración *in vitro* e incubación con 6-dimetilaminopurina. La segmentación de los cuatro grupos osciló entre 45.93 y 53.73% (Figura 4A), pero el tratamiento (diferentes periodos de MIV e incubación con el inhibidor general de actividad proteína quinasa, 6-DMAP) no tuvo efecto significativo sobre la tasa de segmentación ($P > 0.05$). Además, la tasa de desarrollo del estadio 8-16C fue de 23.89-35.11% en los cuatro grupos (Figura 4B), donde no se encontró efecto alguno del tratamiento sobre el desarrollo ($P > 0.05$).

También se monitoreó el efecto de la duración de la MIV y la incubación con 6-DMAP sobre el desarrollo de blastocistos partenogénicos. En todos los grupos se produjeron blastocistos de los tres estadios evaluados: temprano, expandido y eclosionado (Figura 5). La tasa de blastocistos totales (Blast.) fue de $25.52 \pm 8.02\%$ en a) Control, 22 h MIV/4 h 6-DMAP; $17.83 \pm 2.84\%$ en b) 22 h MIV/5 h 6-DMAP; $13.11 \pm 2.03\%$ en c) 24 h MIV/4 h 6-DMAP; y $16.04 \pm 2.88\%$ en d) 24 h MIV/5 h 6-DMAP (Figura 5A). El tratamiento no tuvo efecto estadísticamente significativo sobre el parámetro Blast. ($P > 0.05$).

En cuanto a la capacidad de expansión de blastocistos partenogénicos, se evaluó el efecto de diferentes tiempos de incubación sobre los parámetros Exp./COCs MIV y Exp./Blast., correspondiendo a la capacidad de expansión total del cultivo y aquella exclusiva de la población de blastocistos, respectivamente. Para los cuatro grupos los rangos resultaron de 2.54- 13.53% para Exp./COCs MIV y 38.47-64.4% para Exp./Blast. (Figura 5B; Figura 5D). El tratamiento tampoco mostró un efecto estadísticamente significativo ($P > 0.05$) sobre los dos parámetros evaluados de expansión de blastocistos.

En relación al rango de Ecl./COCs MIV para los cuatro grupos, es decir, de la capacidad de generar blastocistos eclosionados, considerando el total de estructuras con las que se inició el cultivo, fue de 0.98-10.03%. Como en casos anteriores, tampoco hubo un impacto significativo ($P > 0.05$) del tratamiento sobre este parámetro (Figura 5C).

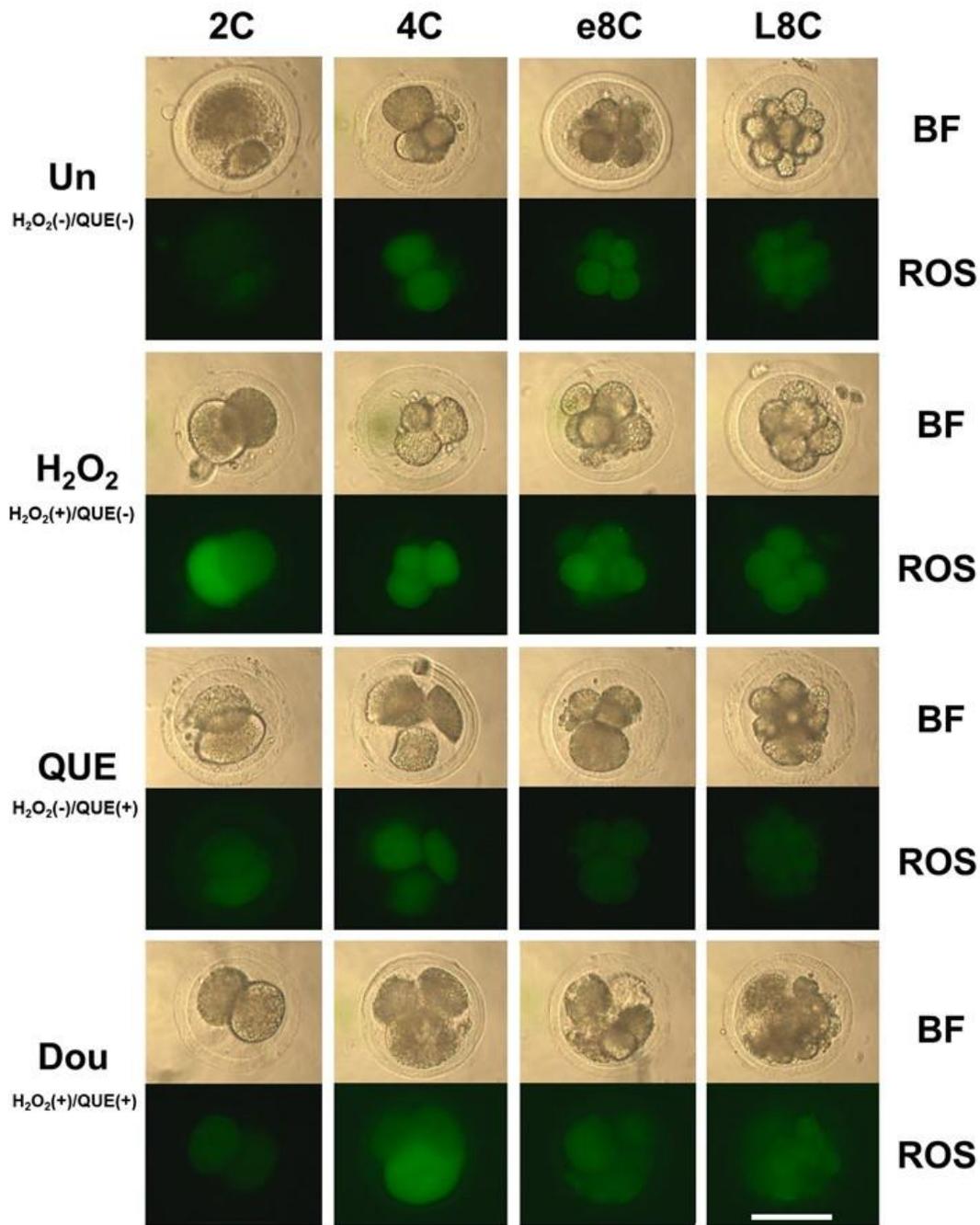
Por otro lado, se observó que un rango de Ecl./Blast. (capacidad de eclosión, considerando solamente la población de blastocistos (Ecl./Blast.) de 6.67- 45.89% (Figura 5E) con altas variaciones entre los cuatro grupos. Estas variaciones se reflejaron en el hecho de que el tratamiento tuvo un efecto estadísticamente significativo ($P = 0.039$) sobre el parámetro Ecl./Blast. Específicamente, el grupo b) 22 h MIV/5 h 6-DMAP tuvo un nivel de desarrollo significativamente mayor ($P = 0.0385$) que c) 24 h MIV/4 h 6-DMAP (Figura 5E). Por lo tanto, los resultados indican que la duración de MIV y de incubación con el inhibidor enzimático 6-DMAP influye sobre la capacidad intrínseca de blastocistos partenogénéticos de bovino para eclosionar. Asimismo, las observaciones en términos de eclosión denotan que la combinación c) 24 h MIV/4 h 6-DMAP es la menos óptima, mientras que b) 22 h MIV/5 h 6-DMAP la más óptima para el desarrollo *in vitro* de partenotas bovinas bajo nuestras condiciones experimentales.

Segunda Parte del Proyecto:

Efectos de la Suplementación *In Vitro* de Peróxido de Hidrógeno y Quercetina en Partenotas Bovinas Segmentadas

En la Fig. 6 se muestran imágenes representativas de las partenotas segmentadas de los cuatro grupos: i) Un (Control), H₂O₂(-)/QUE(-); ii) H₂O₂, H₂O₂(+)/QUE(-); iii) QUE, H₂O₂(-)/QUE(+); y iv) Dou, H₂O₂(+)/QUE(+). Las microfotografías son tanto en campo claro (bright field, BF), como en epifluorescencia (reactive oxygen species, ROS) de todos los estadios evaluados: 2C; 4C; 8C Tempr. (5-8 células; e8C); y 8C Tard. (10-16 células; L8C).

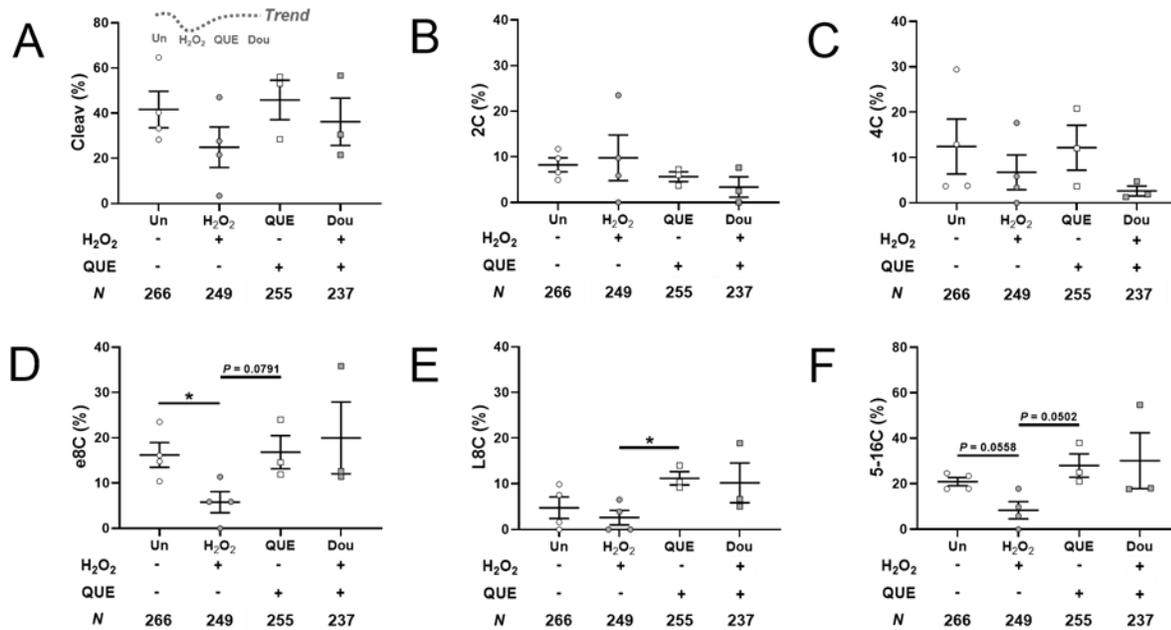
Figura 6. Microfotografías representativas de embriones partenogénicos segmentados de bovino



Microscopía de campo claro (bright field, BF) y epifluorescencia de especies reactivas de oxígeno (ERO/reactive oxygen species, ROS). Las partenotas se cultivaron en presencia (+) o ausencia (-) de 85 μ M peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y/o 2 μ M quercetina (QUE) y se tiñieron con 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA). Los estadios registrados a las 96 h postactivación partenogénica (hPA) fueron 2 células (2C), 4 células (4C), 8 células estadio temprano (5-8 células; 8C Tempr./e8C) y 8 células estadio tardío (10-16 células; 8C Tard./L8C). Los grupos fueron: i) No tratado (Control; Un), H₂O₂(-)/QUE(-); ii) tratamiento con H₂O₂ (H₂O₂), H₂O₂(+)/QUE(-); iii) tratamiento con quercetina (QUE), H₂O₂(-)/QUE(+); y iv) tratamiento doble (Dou), H₂O₂(+)/QUE(+). Barra de escala: 100 μ m.

Al evaluar el efecto de la suplementación del oxidante y/o antioxidante, se observó una tendencia ($P > 0.05$) del grupo H_2O_2 , $H_2O_2(+)/QUE(-)$ a disminuir la tasa de segmentación (cleavage, Cleav) en comparación con todos los demás grupos (Figura 7A). En tanto, se careció ya sea de diferencias significativas de desarrollo o de cualquier tendencia en los estadios de 2C y 4C (Figura 7B; Figura 7C, respectivamente). En contraste, Un, $H_2O_2(-)/QUE(-)$ mostró un desarrollo significativamente más elevado ($P < 0.05$) que el grupo H_2O_2 , $H_2O_2(+)/QUE(-)$ en el estadio de 8C Tempr. (e8C). Además, el grupo QUE, $H_2O_2(-)/QUE(+)$ tuvo tendencia ($P = 0.0791$) a un mayor desarrollo que el grupo tratado exclusivamente con H_2O_2 (Figura 7D). De manera similar, como se observa en la Figura 7E, QUE, $H_2O_2(-)/QUE(+)$ mostró un mayor desarrollo ($P < 0.05$) que H_2O_2 , $H_2O_2(+)/QUE(-)$ en el estadio 8C Tard. (L8C). Entonces, debido a lo anterior, al emplear la sumatoria de los datos de 8C Tempr. y 8C Tard., el grupo tratado únicamente con H_2O_2 tuvo una marcada tendencia ($P = 0.0558$ y $P = 0.0502$, respectivamente) a generar un menor desarrollo en toda la ventana 5-16C que Un, $H_2O_2(-)/QUE(-)$ y QUE, $H_2O_2(+)/QUE(-)$, como se indica en la Figura 7F. Estos resultados denotan que la suplementación de H_2O_2 disminuye el desarrollo partenogenético bovino alrededor del estadio de 8 células en comparación con la ausencia de tratamiento o la adición de quercetina. La tendencia en la tasa de segmentación refleja las mencionadas modificaciones en el desarrollo alrededor del estadio de 8 células. Como se verá, se sugiere que la base de dicho efecto sobre el desarrollo partenogenético depende de las modificaciones en el estatus redox intracelular de las estructuras cultivadas. Esto se analizó mediante la tinción fluorescente de ERO/ROS.

Figura 7. Evaluación del desarrollo en partenotas segmentadas de bovino

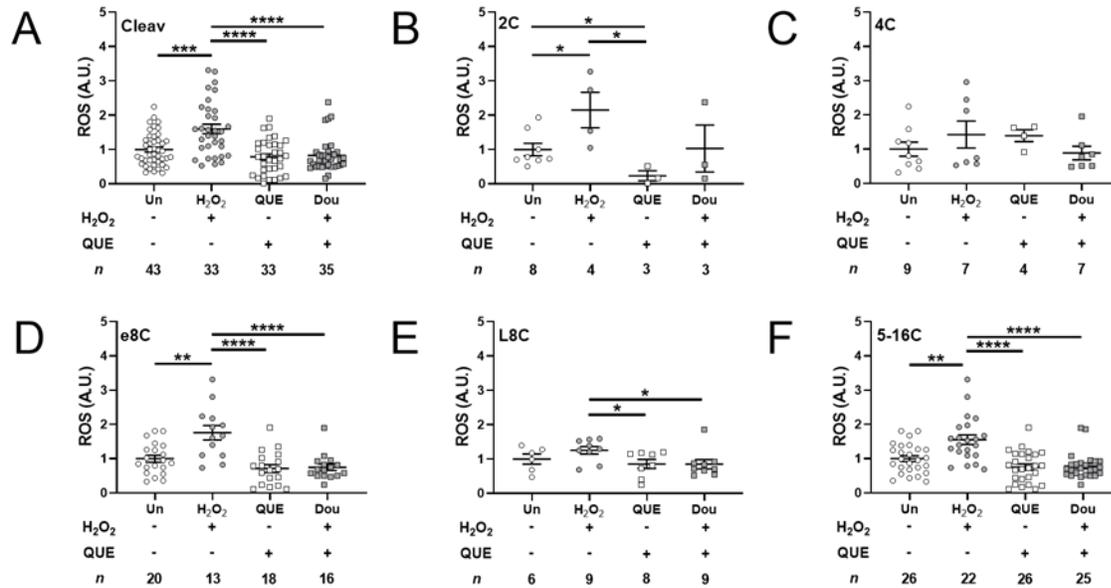


Las partenotas se cultivaron en presencia (+) o ausencia (-) de 85 μ M peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y/o 2 μ M quercetina (QUE) y su desarrollo se monitoreó a las 96 h postactivación partenogenética (hPA). Tasas de desarrollo en estadios de: A) segmentación (cleavage, Cleav); B) 2 células (2C); C) 4 células (4C); D) 8 células estadio temprano (5-8 células; 8C Tempr./e8C); E) 8 células estadio tardío (10-16 células; 8C Tard./L8C); y F) 5 a 16 células (5-16C; sumatoria de los datos de 8C Tempr. y 8C Tard.) Los grupos fueron: i) No tratado (Control; Un), H₂O₂(-)/QUE(-); ii) tratamiento con H₂O₂ (H₂O₂), H₂O₂(+)/QUE(-); iii) tratamiento con quercetina (QUE), H₂O₂(-)/QUE(+); y iv) tratamiento doble (Dou), H₂O₂(+)/QUE(+). La tendencia (Trend) se muestra con línea punteada. Número de complejos cúmulo-ovocito inicialmente colocados en maduración *in vitro* (N). Las líneas de dispersión muestran la media \pm error estándar (E.E.). Las diferencias se consideraron significativas cuando $P \leq 0.05$ (*).

En relación con el monitoreo de epifluorescencia, se observó (Figura 8A) que en partenotas bovinas con capacidad general para segmentarse (cleavage, Cleav) la suplementación exclusivamente con H₂O₂ incrementa ($P < 0.001$) los niveles de ERO/ROS respecto al grupo Un, H₂O₂(-)/QUE(-). En tanto, la adición exclusiva de quercetina, así como la combinación H₂O₂/quercetina generan niveles de ERO/ROS más bajos respecto al grupo H₂O₂, H₂O₂(+)/QUE(-) de una forma más significativa ($P < 0.0001$) que el control no tratado. Resulta plausible que estos resultados con niveles más altos de ERO/ROS en etapa de segmentación al tratar solo con H₂O₂ expliquen la tendencia a una menor segmentación en el mismo grupo (Figura 8A). Si bien no se mostraron diferencias significativas en la fluorescencia en el estadio de 4C (Figura 8C), el cual corresponde a embriones partenogenéticos con retraso en su desarrollo, el tratamiento efectivamente impactó los niveles de ERO/ROS en partenotas con desarrollo arrestado (2C) a las 96 hPA. Específicamente, el grupo donde solo se adicionó H₂O₂ mostró mayores niveles ($P < 0.05$) de ERO/ROS que el control no tratado y QUE, H₂O₂(-)/QUE(+). Además, el grupo tratado únicamente

con el flavonoide tuvo una intensidad de fluorescencia más baja que el control no tratado (Figura 8B). Esto denota que el H₂O₂ y la quercetina aumentan y disminuyen por sí solos, respectivamente, el estrés oxidativo, incluso en partenotas segmentadas con desarrollo arrestado. En cuanto a embriones partenogénicos viables a las 96 hPA; es decir, que se desarrollaron en dicho momento alrededor del estadio de 8 células, el tratamiento generó un impacto marcado. Como indica la Figura 8D y la Figura 8F, la suplementación exclusiva de H₂O₂ aumenta ($P < 0.01$) los niveles de ERO/ROS respecto al control no tratado, tanto en el estadio 8C Tempr. (e8C), como en toda la ventana 5-16C (sumatoria de los datos de 8C Tempr. y 8C Tard.). Resulta interesante el hecho de que en ambos estadios los niveles de ERO/ROS fueron aún más bajos ($P < 0.0001$) en los grupos tratados solo con el flavonoide o con la combinación H₂O₂/QUE en comparación con H₂O₂, H₂O₂(+)/QUE(-). En la misma línea, como señala la Figura 8E, los grupos QUE, H₂O₂(-)/QUE(+) y Dou, H₂O₂(+)/QUE(+) mostraron niveles significativamente más bajos ($P < 0.05$) de ERO/ROS que el grupo tratado sólo con H₂O₂ en el estadio 8C Tard. (L8C). Estas observaciones sugieren que el estatus redox en los embriones partenogénicos segmentados de bovino, que potencialmente están cursando por el importante evento de desarrollo de la AGE (alrededor del estadio de 8 células; Graf *et al.*, 2014), es sensible a modificaciones por la suplementación de agentes oxidante y antioxidante (H₂O₂ y quercetina, respectivamente). Asimismo, los resultados plantean la posibilidad de que la quercetina, suplementada exclusivamente, no solo disminuye el estrés oxidativo en partenotas segmentadas, sino que también rescata los efectos deletéreos de la presencia del oxidante H₂O₂, incluso a niveles numéricamente más bajos que los de un control no tratado.

Figura 8. Evaluación de los niveles de fluorescencia de especies reactivas de oxígeno en partenotas segmentadas de bovino

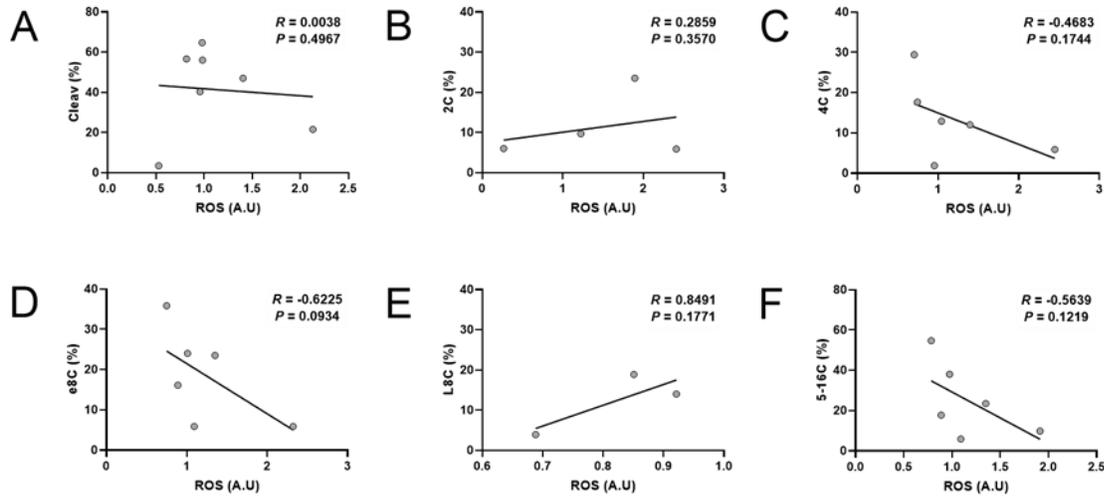


Las partenotas se cultivaron en presencia (+) o ausencia (-) de 85 μ M peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y/o 2 μ M quercetina (QUE), se colectaron y tiñeron fluorescentemente con 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA) a las 96 h postactivación partenogenética (hPA). Niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ERO/reactive oxygen species, ROS) en partenotas en estadios de: A) segmentación (cleavage, Cleav); B) 2 células (2C); C) 4 células (4C); D) 8 células estadio temprano (5-8 células; 8C Tempr./e8C); E) 8 células estadio tardío (10-16 células; 8C Tard./L8C); y F) 5 a 16 células (5-16C; sumatoria de los datos de 8C Tempr. y 8C Tard.) Los grupos fueron: i) No tratado (Control; Un), H_2O_2 (-)/QUE(-); ii) tratamiento con H_2O_2 (H_2O_2), H_2O_2 (+)/QUE(-); iii) tratamiento con quercetina (QUE), H_2O_2 (-)/QUE(+); y iv) tratamiento doble (Dou), H_2O_2 (+)/QUE(+). Unidades arbitrarias (A.U); número de estructuras analizadas por microscopía de epifluorescencia (n). Las líneas de dispersión muestran la media \pm error estándar (E.E). Las diferencias se consideraron significativas cuando $P \leq 0.05$ (*), $P \leq 0.01$ (**), $P \leq 0.001$ (***), $P \leq 0.0001$ (****).

En un esfuerzo por encontrar la asociación entre el desarrollo partenogenético bovino en etapas de segmentación y los niveles intracelulares de ERO/ROS, en este proyecto se implementó un análisis de correlación de Pearson. Los datos consistieron en las réplicas experimentales con información sobre la tasa de desarrollo y su respectivo nivel de ERO/ROS independientemente del grupo de partenotas (se combinaron los distintos grupos). Cierta asociación entre los parámetros mencionados pudo observarse en nuestro sistema en el estadio 8C Tempr. (e8C), en el cual se encontró una tendencia moderada ($P = 0.0934$) a una correlación negativa ($R = -0.6225$) entre desarrollo y nivel de ERO/ROS (Figura 9D). Por ende, se sugiere que en partenotas viables, cursando alrededor del estadio de 8 células, a mayor nivel de estrés oxidativo resulta menor la capacidad de alcanzar dicho estadio de desarrollo. Este supuesto

sería acorde con efectos negativos ejercidos por el estrés oxidativo alrededor de un momento de desarrollo en el que potencialmente ocurre un proceso molecular de importancia mayor: la AGE (Graf *et al.*, 2014).

Figura 9. Análisis de correlación



Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (R) entre el nivel de especies reactivas de oxígeno (ERO/reactive oxygen species, ROS), medido en unidades arbitrarias (A.U) y la tasa de desarrollo (%) en los estadios de: A) segmentación (cleavage, Cleav); B) 2 células (2C); C) 4 células (4C); D) 8 células estadio temprano (5-8 células; 8C Tempr./e8C); E) 8 células estadio tardío (10-16 células; 8C Tard./L8C); y F) 5 a 16 células (5-16C; sumatoria de los datos de 8C Tempr. y 8C Tard.). Los círculos denotan réplicas en donde se combinaron datos de diferentes grupos de partenotas para calcular la correlación entre la tasa de desarrollo con su respectivo nivel de fluorescencia. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P \leq 0.05$.

Tercera Parte del Proyecto:

Obtención de primers para el análisis por retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) de la respuesta al estrés oxidativo en bovinos

Las secuencias de los primers obtenidos en este proyecto se muestran en la Tabla 3 y la Tabla 4. Se generaron primers para su uso futuro en el análisis por RT-PCR de la expresión de genes (presencia de ARNm), tanto del tipo housekeeping, como relacionados con la respuesta al estrés oxidativo en células de bovino.

Tabla 3. Secuencias de primers de bovino para amplificación de ARNm codificados por housekeeping genes

Nombre del primer	Secuencia (5'-3')
<i>ACTB-Fw1</i>	ATCGTCCACCGCAAATGCTTCT
<i>ACTB-Rv1</i>	GCCATGCCAATCTCATCTCGTT
<i>CHUK-Fw1</i>	TGATGGAATCTCTGGAACAGCG
<i>CHUK-Rv1</i>	TGCTTACAGCCCAACAACCTTGC
<i>B2M-Fw1</i>	AGACACCCACCAGAAGATGG
<i>B2M-Rv1</i>	GGGGTTGTTCCAAAGTAACG
<i>MYL6-Fw1</i>	TTCGGGTGTTTGACAAGGAAGGGA
<i>MYL6-Rv1</i>	ATCCTCAGCCATTCAGCACCAT
<i>PPIA-Fw1</i>	TTTATGTGCCAGGGTGGTGACT
<i>PPIA-Rv1</i>	TCTTGCTGGTCTTGCCATTCCT

Tabla IV. Secuencias de primers de bovino para amplificación de ARNm codificados por genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo

Nombre del primer	Secuencia (5'-3')
<i>DJ1-Fw1</i>	CGGAAGTCATTACAGCTACTC
<i>DJ1-Rv1</i>	AGGAGGATGGCTTCTCAA
<i>DJ1-Fw2</i>	CATTACAGCTACTCCGAGAAC
<i>DJ1-Rv2</i>	GCTTCTCAACACAGTGACC
<i>KEAP1-Fw1</i>	GAGTGTTACTACCCAGAGAG
<i>KEAP1-Rv1</i>	AAGAACGTAGATCCTTCCC
<i>KEAP1-Fw2</i>	TACCCAGAGAGAAACGAGTG
<i>KEAP1-Rv2</i>	TAGATCCTTCCCTGGTGAAC
<i>PINK1-Fw1</i>	CTGGAGGAGTATCTGATCG
<i>PINK1-Rv1</i>	CTGGCTCATTGTGCTAAAG
<i>PINK1-Fw2</i>	GGCTGCTAATGTGCTTCAT
<i>PINK1-Rv2</i>	CGCTTCATACTCCAGGTTG
<i>NRF2-Fw1</i>	CCCAGTCTTCACTGCTCCTC

<i>NRF2</i> -Rv1	TCAGCCAGCTTGTCATTTTG
<i>NRF2</i> -Fw2	CCCAGTCTTCACTGCTCCTC
<i>NRF2</i> -Rv2	TCAGCCAGCTTGTCATTTTG
<i>SOD1</i> -Fw1	TGCCATCGTGGATATTGTAG
<i>SOD1</i> -Rv1	GCAATTCCAATTACACCACA
<i>SOD1</i> -Fw2	GCAAAGGGAGATACAGTCGTG
<i>SOD1</i> -Rv2	TGCACTGGTACAGCCTTGT
<i>SOD2</i> -Fw1	CGTGACTTTGGTTCCTTTGCC
<i>SOD2</i> -Rv1	GCGTCCCTGCTCCTTATTGA
<i>SOD2</i> -Fw2	GGTGATGTTACAGCTCAGA
<i>SOD2</i> -Rv2	GTCCCTGCTCCTTATTGAA
<i>PRDX1</i> -Fw1	ATGCCAGATGGTCAGTTCAAG
<i>PRDX1</i> -Rv1	CCTTGTTTCTTGGGTGTGTTG
<i>PRDX1</i> -Fw2	CAGTGATAGGGCAGAAGAA
<i>PRDX1</i> -Rv2	ATAGTCCTGAGCAATGGTG
<i>PRDX2</i> -Fw1	GATTATGGCGTGCTGAAGGAAGATG
<i>PRDX2</i> -Rv1	GAGCGTCCCACAGGCAAGTC
<i>PRDX2</i> -Fw2	GTGATTATGGCGTGCTGAA
<i>PRDX2</i> -Rv2	TATTCCTTGCTGTCGTCCA
<i>GPX1</i> -Fw1	GAGCCCTTCAACCTGTCCTC
<i>GPX1</i> -Rv1	GCGTTTTCTGATGCCCAAAC
<i>GPX1</i> -Fw2	ATGACCGACCCTAAGTTCATCAC
<i>GPX1</i> -Rv2	CCCACCAGGAACTTCTCGAA
<i>CAT</i> -Fw1	CGGCGACTATCCTCTTATTC
<i>CAT</i> -Rv1	GGGACAGTTCACAGGTATC
<i>CAT</i> -Fw2	TACCTGTGAACTGTCCCTA
<i>CAT</i> -Rv2	TTTCCTCTGCTCCTCATTC

7. Productos generados

Artículo de investigación publicado; revista indizada. [en *Veterinarski Arhiv*]

Dos artículos de investigación en preparación; revista indizada. [1) en *Reproduction and Fertility*: “ERO en partenotas segmentadas”; 2) en *Tecnociencia Chihuahua*: RT-PCR genes bovinos involucrados en la respuesta al estrés oxidativo]

Memoria de congreso publicada. [Réseau Québécois en reproduction, RQR]

Memoria de congreso por publicarse. [7º EJIECH]

Dos tesis de licenciatura defendidas. [Bianca Orozco; Melissa Molina]

Dos tesis de licenciatura en preparación. [Yael Félix; Gitzel Cárdenas]

Cuatro ponencias de congreso. [Semana del Veterinario 2018; Semana del Veterinario 2020; RQR; 7º EJIECH]

Un premio estudiante. [7º EJIECH (Melissa Molina)]

8. Conclusiones

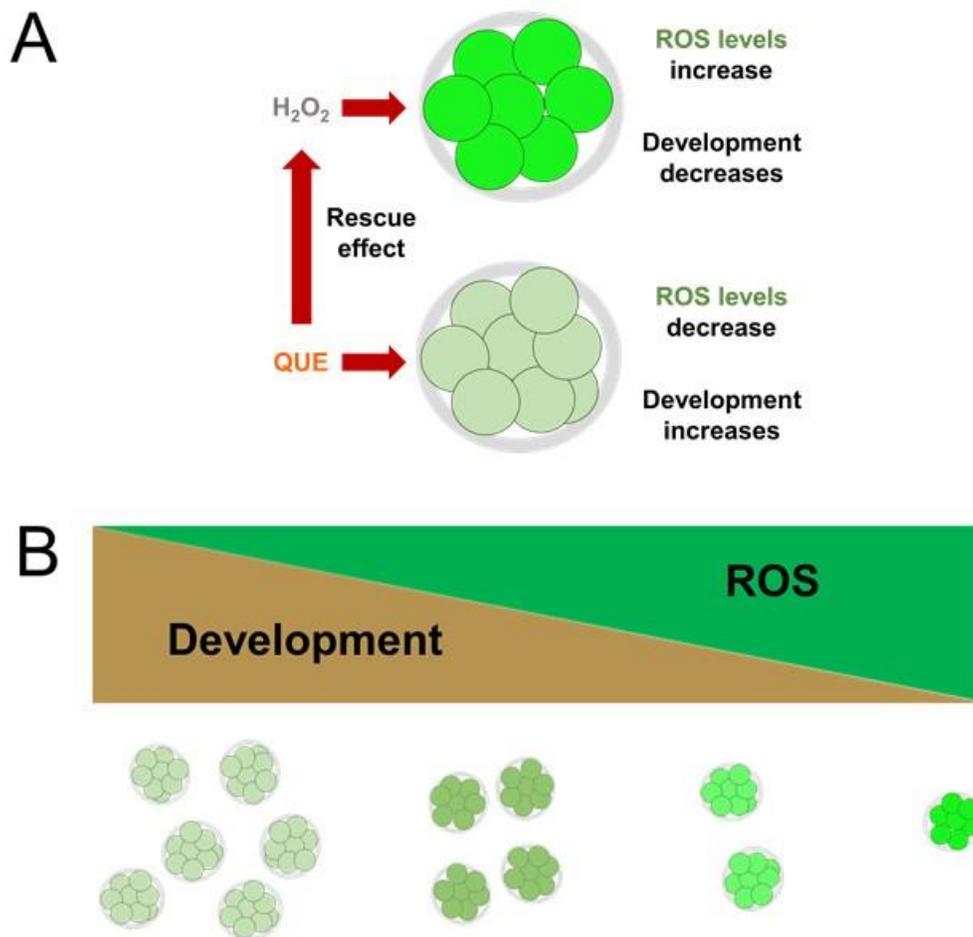
Primera Parte del Proyecto

Se estableció un sistema *in vitro* de generación de partenotas bovinas, con el cual es posible alcanzar a niveles aceptables tanto etapas de segmentación, como de blastocisto e incluso lograr la eclosión. Además, se optimizó el cultivo partenogenético bajo nuestras condiciones según el periodo de MIV e incubación con 6-DMAP (22 h y 5 h, respectivamente, fue la mejor combinación). Este sistema partenogenético es potencialmente útil ya sea para estudios fisiológicos de desarrollo temprano en mamíferos, como para el mejoramiento de los protocolos de PIV.

Segunda Parte del Proyecto

Con el presente sistema *in vitro* de generación de partenotas bovinas se comprobó que la suplementación de H₂O₂ y quercetina disminuye y aumenta el desarrollo en etapas de segmentación, respectivamente. Asimismo, la adición de dichos agentes oxidante y antioxidante aumenta y disminuye, respectivamente, el estrés oxidativo (reflejado por los niveles de ERO/ROS) en partenotas segmentadas, en el cual la quercetina es incluso capaz de rescatar los efectos nocivos del H₂O₂. Figura 10A. Además, los resultados sugieren una correlación negativa entre el nivel de ERO/ROS y desarrollo partenogenético en etapa de segmentación: a mayor estrés oxidativo, menor desarrollo (Figura 10B) Estos escenarios resultaron más claros en embriones partenogenéticos viables alrededor del estadio de 8 células, posiblemente cursando el importante evento de AGE. Los hallazgos del proyecto muestran potencial para aplicarse en estudios sobre la regulación del desarrollo temprano (p. ej., biología del estrés), así como en la optimización de protocolos de PIV. Esto podría aplicarse directamente en el bovino, una especie económicamente importante, o transferirse con los debidos ajustes a otras especies.

Figura 10. Efectos del peróxido de hidrógeno y la quercetina en partenotas bovinas en etapa de segmentación



A) En embriones partenogénéticos bovinos, de alrededor de 8 células, el H_2O_2 incrementa los niveles de ERO/ROS, disminuyendo el desarrollo. En tanto, la quercetina disminuye los niveles de ERO/ROS, incrementando el desarrollo, incluso rescatando los efectos del H_2O_2 . B) Se sugiere una correlación negativa entre los niveles de ERO/ROS y la tasa de desarrollo alrededor del estadio de 8 células en partenotas bovinas. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2); quercetina (QUE); especies reactivas de oxígeno (ERO/reactive oxygen species, ROS).

Tercera Parte del Proyecto

Se obtuvieron primers (tanto a partir de la literatura, como por diseño propio) que en un futuro podrán emplearse para estudiar por RT-PCR la expresión, ya sea de genes bovinos de tipo housekeeping (constitutivo), como relacionados con la respuesta al estrés oxidativo. Asimismo, los primers generados pueden utilizarse para PCR cuantitativa (evaluación de niveles de ARNm, en los cuales la expresión de genes tipo housekeeping podrá emplearse para calibrar los niveles de expresión de los genes problema

relacionados con la respuesta al estrés oxidativo). Debido a que es posible usar los presentes primers en cualquier tipo de célula bovina, los estudios mencionados no sólo podrán realizarse en las áreas de reproducción y biología del desarrollo, sino en cualquier área de la ciencia animal.

9. Mecanismos de transferencia. (Si aplica)

Comunicación con el sector ganadero regional y nacional (p. ej., Grupo Agroindustrial Escobar S.A. de C.V) mediante pláticas y talleres. Esto tendría el propósito de implementar las prácticas de cultivo *in vitro* de embriones bovinos incluyendo manejo para disminuir el estrés oxidativo (p. ej., incluir suplementación de un antioxidante), lo cual a su vez ayudaría a mejorar los resultados de la PIV. No obstante, en lugar de embriones partenogénéticos, se trabajaría en dicho caso con embriones generados mediante FIV.

10. Contribución e impacto del proyecto

En primer lugar, el presente proyecto ha auxiliado a incrementar el conocimiento en ciencia básica en el ámbito reproductivo. Esto ha incluido el establecimiento inicial y el mejoramiento de un sistema de cultivo *in vitro* de embriones partenogénéticos (partenotas) de bovino bajo las condiciones de nuestro laboratorio universitario. Además, este proyecto ha aportado nuevos conocimientos sobre los mecanismos del estrés oxidativo en partenotas bovinas y cómo dicha condición puede disminuirse mediante la aplicación de un antioxidante durante su cultivo en el laboratorio. Esto último representa una potencial contribución en la mejora de los protocolos de producción *in vitro* de embriones (PIV), lo cual podría aplicarse para obtener resultados más satisfactorios con los sistemas de PIV como modelos de estudio, así como en la clínica humana y en la generación *in vitro* de embriones de animales domésticos y silvestres.

Por otra parte, el presente proyecto ha contribuido con la formación de recursos humanos de nuestra universidad. Específicamente, el proyecto ha generado ya dos tesis defendidas de Lic. MVZ, mientras que otras dos se encuentran en curso en el mismo programa (ver Productos generados; y Anexos).

Finalmente, este proyecto ha proporcionado una oportunidad de vinculación para el Departamento de Ciencias Veterinarias de la UACJ con el Rastro Municipal de Ciudad Juárez, el Grupo Agroindustrial Escobar S.A. de C.V, así como con el Border Biomedical Research Center de UTEP.

11. Impacto económico, social y/o ambiental en la región

-Debido a su potencial para el mejoramiento de protocolos de PIV de ganado mayor, así como de otras especies domésticas, se espera que el presente proyecto beneficie a la industria ganadera local y nacional. Esto sería a través del incremento de resultados satisfactorios en el número y calidad de embriones generados en el laboratorio y potencialmente transferibles a hembras receptoras.

12. Referencias (bibliografía)

- Aitken, R. J., Baker, M. A., & Nixon, B. (2015). Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress?. *Asian Journal of Andrology*, 17(4), 633.
- Bain, N. T., Madan, P., & Betts, D. H. (2011). The early embryo response to intracellular reactive oxygen species is developmentally regulated. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(4), 561-575.
- Bain, N. T., Madan, P., & Betts, D. H. (2013). Elevated p66Shc is associated with intracellular redox imbalance in developmentally compromised bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 80(1), 22-34.
- Bastos, G. M., Gonçalves, P. B. D., & Bordignon, V. (2008). Immunolocalization of the High-Mobility Group N2 protein and acetylated histone H3K14 in early developing parthenogenetic bovine embryos derived from oocytes of high and low developmental competence. *Molecular Reproduction and Development*, 75(2), 282-290.
- Bettgowda, A., Patel, O. V., Lee, K. B., Park, K. E., Salem, M., Yao, J., ... & Smith, G. W. (2008). Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. *Biology of Reproduction*, 79(2), 301-309.
- Betts, D. H., Bain, N. T., & Madan, P. (2014). The p66Shc adaptor protein controls oxidative stress response in early bovine embryos. *PLoS One*, 9(1), e86978.
- Blondin, P., Bousquet, D., Twagiramungu, H., Barnes, F., & Sirard, M. A. (2002). Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, 66(1), 38-43.
- Blondin, P., & Sirard, M. A. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular reproduction and development*, 41(1), 54-62.
- Bols, P. E. J., Jorssen, E. P. A., Goovaerts, I. G. F., Langbeen, A., & Leroy, J. L. M. R. (2018). High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues. *Animal Reproduction*, 9(3), 420-425.
- Boni, R. (2018). Origins and effects of oocyte quality in cattle. *Animal Reproduction*, 9(3), 333-340.
- Bühler, S., Frahm, J., Tienken, R., Kersten, S., Meyer, U., Huber, K., & Dänicke, S. (2018). Effects of energy supply and nicotinic acid supplementation on serum anti-oxidative capacity and on expression of oxidative stress-related genes in blood leucocytes of periparturient primi- and pluriparous dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(1), e87-e98.
- Cagnone, G. L., Dufort, I., Vigneault, C., & Sirard, M. A. (2012). Differential gene expression profile in bovine blastocysts resulting from hyperglycemia exposure during early cleavage stages. *Biology of Reproduction*, 86(2), 50-1.
- Cagnone, G., & Sirard, M. A. (2014). The impact of exposure to serum lipids during in vitro culture on the transcriptome of bovine blastocysts. *Theriogenology*, 81(5), 712-722.
- Cajas, Y. N., Cañón-Beltrán, K., Núñez-Puente, C., Gutierrez-Adán, A., González, E. M., Agirregoitia, E., & Rizos, D. (2021). Nobiletin-induced partial abrogation of deleterious effects of AKT inhibition on preimplantation bovine embryo development in vitro. *Biology of Reproduction*, 105(6), 1427-1442.
- Callesen, H., Bøgh, I. B., & Greve, T. (2019). Embryo Transfer and Other Assisted Reproductive Technologies. In *Veterinary Reproduction and Obstetrics* (pp. 778-805). WB Saunders.
- Campos-Junior, P. H. A., Alves, T. J. M., Dias, M. T., Assunção, C. M., Munk, M., Mattos, M. S., ... & Viana, J. H. M. (2016). Ovarian grafts 10 days after xenotransplantation: folliculogenesis and recovery of viable oocytes. *PLoS One*, 11(6), e0158109.

- Felmer, R. N., Arias, M. E., Muñoz, G. A., & Rio, J. H. (2011). Effect of different sequential and two-step culture systems on the development, quality, and RNA expression profile of bovine blastocysts produced in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 78(6), 403-414.
- Gad, A., Hoelker, M., Besenfelder, U., Havlicek, V., Cinar, U., Rings, F., ... & Tesfaye, D. (2012). Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative in vivo and in vitro culture conditions. *Biology of Reproduction*, 87(4), 100-1.
- Gardner, D. K., & Lane, M. (1998). Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Human Reproduction*, 13(suppl_3), 148-159.
- Golding, M. C., Williamson, G. L., Stroud, T. K., Westhusin, M. E., & Long, C. R. (2011). Examination of DNA methyltransferase expression in cloned embryos reveals an essential role for Dnmt1 in bovine development. *Molecular Reproduction and Development*, 78(5), 306-317.
- Graf, A., Krebs, S., Zakhartchenko, V., Schwalb, B., Blum, H., & Wolf, E. (2014). Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(11), 4139-4144.
- Guemra, S., Monzani, P. S., Santos, E. S., Zanin, R., Ohashi, O. M., Miranda, M. D. S., & Adona, P. R. (2013). Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65, 1616-1624.
- Hardy, M. L., Day, M. L., & Morris, M. B. (2021). Redox Regulation and Oxidative Stress in Mammalian Oocytes and Embryos Developed In Vivo and In Vitro. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(21), 11374.
- Ho, N. T. K., Nguyen, T. V. T., Van Nguyen, T., & Bui, H. T. (2019). Epigenetic impairments in development of parthenogenetic preimplantation mouse embryos. *Journal of Reproduction and Development*. 65(1), 83-90.
- Jeong, P. S., Yoon, S. B., Lee, M. H., Son, H. C., Lee, H. Y., Lee, S., ... & Sim, B. W. (2019). Embryo aggregation regulates in vitro stress conditions to promote developmental competence in pigs. *PeerJ*, 7, e8143.
- Kang, J. T., Kwon, D. K., Park, S. J., Kim, S. J., Moon, J. H., Koo, O. J., ... & Lee, B. C. (2013). Quercetin improves the in vitro development of porcine oocytes by decreasing reactive oxygen species levels. *Journal of Veterinary Science*, 14(1), 15-20.
- Kang, J. T., Moon, J. H., Choi, J. Y., Park, S. J., Kim, S. J., Saadeldin, I. M., & Lee, B. C. (2016). Effect of antioxidant flavonoids (quercetin and taxifolin) on in vitro maturation of porcine oocytes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29(3), 352.
- Khazaei, M., & Aghaz, F. (2017). Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during in vitro maturation of oocytes. *International Journal of Fertility & Sterility*, 11(2), 63.
- Krisher, R. L. (2004). The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*, 82(suppl_13), E14-E23.
- Lechniak D, Cieslak D, Sosnowski J. (1998). Cytogenetic analysis of bovine parthenotes after spontaneous activation in vitro. *Theriogenology* 49,779-785.
- Leininger, G. M., Edwards, J. L., Lipshaw, M. J., & Feldman, E. L. (2006). Mechanisms of disease: mitochondria as new therapeutic targets in diabetic neuropathy. *Nature Clinical Practice Neurology*, 2(11), 620-628.
- Lopera-Vásquez, R., Hamdi, M., Fernandez-Fuertes, B., Maillo, V., Beltrán-Breña, P., Calle, A., ... & Rizos, D. (2016). Extracellular vesicles from BOEC in in vitro embryo development and quality. *PLoS One*, 11(2), e0148083.
- Meldrum, D. R., Casper, R. F., Diez-Juan, A., Simon, C., Domar, A. D., & Frydman, R. (2016). Aging and the environment affect gamete and embryo potential: can we intervene?. *Fertility and sterility*, 105(3), 548-559.

- Menezes, Y. J., Silvestris, E., Dale, B., & Elder, K. (2016). Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. *Reproductive Biomedicine Online*, 33(6), 668-683.
- Méo, S. C., Yamazaki, W., Ferreira, C. R., Perecin, F., Saraiva, N. Z., Leal, C. L. V., & Garcia, J. M. (2007). Parthenogenetic activation of bovine oocytes using single and combined strontium, ionomycin and 6-dimethylaminopurine treatments. *Zygote*, 15(4), 295-306.
- Miyamoto, K., Nagai, K., Kitamura, N., Nishikawa, T., Ikegami, H., Binh, N. T., ... & Imai, H. (2011). Identification and characterization of an oocyte factor required for development of porcine nuclear transfer embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(17), 7040-7045.
- Mucci, N., Aller, J. F., Kaiser, G. G., Hozbor, F., & Alberio, R. H. (2006). Producción in vitro de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38(2), 97-104.
- Muñoz, M., Penarossa, G., Caamaño, J. N., Díez, C., Brevini, T. A. L., & Gómez, E. (2015). Research with parthenogenetic stem cells will help decide whether a safer clinical use is possible. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(4), 325-331.
- Orozco-Lucero, E., Orozco-Galindo, B. V., Quintero-Elisea, J. A., Itza-Ortiz, M. F., Chavez-Solano, M., Carrera-Chávez, J. M., ... & Quezada-Casasola, A. (2020). The influence of the duration of in vitro maturation and incubation with an activating agent on the hatching capacity of bovine parthenotes-short communication. *Veterinarski Arhiv*, 90(5), 527-534.
- Orozco-Lucero, E., Dufort, I., Robert, C., & Sirard, M. A. (2014). Rapidly cleaving bovine two-cell embryos have better developmental potential and a distinctive mRNA pattern. *Molecular Reproduction and Development*, 81(1), 31-41.
- Hosseini, S. O., Aghaee, F., Hosseini, S. M., Hajian, M., Forouzanfar, M., Noorbakhshnia, M., ... & Nasr-Esfahani, M. H. (2011). Effect of culture condition and cell-permeable superoxide dismutase on levels of reactive oxygen species (ROS) production in "in vitro" produced sheep embryos. *Small Ruminant Research*, 97(1-3), 88-93.
- Paffoni, A., Brevini, T. A. L., Gandolfi, F., & Ragni, G. (2008). Parthenogenetic activation: biology and applications in the ART laboratory. *Placenta*, 29, 121-125.
- Piras, A. R., Menéndez-Blanco, I., Soto-Heras, S., Català, M. G., Izquierdo, D., Bogliolo, L., & Paramio, M. T. (2019). Resveratrol supplementation during in vitro maturation improves embryo development of prepubertal goat oocytes selected by brilliant cresyl blue staining. *Journal of Reproduction and Development*, 65(2), 113-120.
- Richarme, G., & Dairou, J. (2017). Parkinsonism-associated protein DJ-1 is a bona fide deglycase. *Biochemical and biophysical research communications*, 483(1), 387-391.
- Rocha-Frigoni, N. A., Leão, B. C., Dall'Acqua, P. C., & Mingoti, G. Z. (2016). Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured in vitro with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development. *Theriogenology*, 86(8), 1897-1905.
- Romar, R., De Santis, T., Papillier, P., Perreau, C., Thélie, A., Dell'Aquila, M. E., ... & Dalbiès-Tran, R. (2011). Expression of maternal transcripts during bovine oocyte in vitro maturation is affected by donor age. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), e23-e30.
- Saeed-Zidane, M., Linden, L., Salilew-Wondim, D., Held, E., Neuhoff, C., Tholen, E., ... & Tesfaye, D. (2017). Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress. *PloS one*, 12(11), e0187569.
- Sameni, H. R., Javadinia, S. S., Safari, M., Amjad, M. H. T., Khanmohammadi, N., Parsaie, H., & Zarbakhsh, S. (2018). Effect of quercetin on the number of blastomeres, zona pellucida thickness, and hatching rate of mouse embryos exposed to actinomycin D: An experimental study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 16(2), 101.

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676-682.
- Singh, S., Sharma, S., Arora, J. S., & Sarkhel, B. C. (2011). Molecular and biochemical evaluation of Indian draft breeds of cattle (*Bos indicus*). *Biochemical genetics*, 49(3), 242-250.
- Sirard, M.A. (2010). Activation of the embryonic genome. *Society of Reproduction and Fertility Supplement 67*, 145-58.
- Sirard, M. A., Richard, F., Blondin, P., & Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65(1), 126-136.
- Sohel, M. M. H., Konca, Y., Akyuz, B., Arslan, K., Sariozkan, S., & Cinar, M. U. (2017). Concentration dependent antioxidative and apoptotic effects of sulforaphane on bovine granulosa cells in vitro. *Theriogenology*, 97, 17-26.
- Sovernigo, T. C., Adona, P. R., Monzani, P. S., Guemra, S., Barros, F. D. A., Lopes, F. G., & Leal, C. L. V. (2017). Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(4), 561-569.
- Trapphoff, T., Heiligentag, M., Simon, J., Staubach, N., Seidel, T., Otte, K., ... & Eichenlaub-Ritter, U. (2016). Improved cryotolerance and developmental potential of in vitro and in vivo matured mouse oocytes by supplementing with a glutathione donor prior to vitrification. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 1-15.
- Yang, M., Tao, J., Chai, M., Wu, H., Wang, J., Li, G., ... & Liu, G. (2017). Melatonin improves the quality of inferior bovine oocytes and promoted their subsequent IVF embryo development: mechanisms and results. *Molecules*, 22(12), 2059.
- Yu, S., Long, H., Lyu, Q. F., Zhang, Q. H., Yan, Z. G., Liang, H. X., ... & Qi, C. (2014). Protective effect of quercetin on the development of preimplantation mouse embryos against hydrogen peroxide-induced oxidative injury. *PLoS one*, 9(2), e89520.

The influence of the duration of *in vitro* maturation and incubation with an activating agent on the hatching capacity of bovine parthenotes - short communication

**Ernesto Orozco-Lucero^{1#}, Bianca V. Orozco-Galindo^{1#}, Juan A. Quintero-Elisea¹,
Mateo F. Itza-Ortiz¹, Marbella Chavez-Solano², José M. Carrera-Chávez¹,
Armando Varela-Ramirez³, and Andrés Quezada-Casasola^{1*}**

¹*Department of Veterinary Sciences, Biomedical Sciences Institute, Autonomous University of Ciudad Juarez, Ciudad Juarez, Chihuahua, Mexico*

²*Department of Chemical and Biological Sciences, Biomedical Sciences Institute, Autonomous University of Ciudad Juarez, Ciudad Juarez, Chihuahua, Mexico*

³*Border Biomedical Research Center, Department of Biological Sciences, University of Texas at El Paso, El Paso, TX, USA*

OROZCO-LUCERO, E., B. V. OROZCO-GALINDO, J. A. QUINTERO-ELISEA, M. F. ITZA-ORTIZ, M. CHAVEZ-SOLANO, J. M. CARRERA-CHÁVEZ, A. VARELA-RAMIREZ, A. QUEZADA-CASASOLA: The influence of the duration of *in vitro* maturation and incubation with an activating agent on the hatching capacity of bovine parthenotes - short communication. Vet. arhiv 90, 527-534, 2020.

ABSTRACT

The period of both *in vitro* maturation (IVM) and incubation with oocyte activators affects the blastocyst yield following parthenogenetic activation (PA). Nevertheless, it is still unknown how these conditions impact the expansion and hatching rates of bovine parthenogenetic blastocysts. The objective of this study was to assess the influence of the duration of IVM and exposure to the activating agent, 6-dimethylaminopurine (6-DMAP), on a number of developmental parameters in bovine parthenotes, including: Cleavage, blastocyst formation, expansion, and hatching. Slaughterhouse oocytes were subjected to different periods of IVM. Subsequently, eggs were first parthenogenetically

Résumés des presentations par affiche / Poster presentations abstracts

Quercetin mitigates H₂O₂-induced oxidative stress in bovine parthenogenetic embryos: in vitro cleavage assessment and reactive oxygen species quantification (#1)

Ernesto Orozco-Lucero¹, Melissa Molina-Garcia¹, Marbella Chavez-Solano², Jose M. Carrera-Chavez¹, Christian Y. Felix-Delgado¹, Armando Varela-Ramirez³, Diana M. Beristain-Ruiz¹, Alejandro Martinez-Martinez², Andres Quezada-Casasola¹

¹Universidad Autonoma de Ciudad Juarez-Departamento de Ciencias Veterinarias,

²Universidad Autonoma de Ciudad Juarez-Departamento de Ciencias Quimico Biologicas,

³The University of Texas at El Paso-Department of Biological Sciences-The Border Biomedical Research Center

Antioxidants can diminish oxidative stress, improving embryonic development. Here, we evaluated the effects of an oxidative stress inducer, hydrogen peroxide (H₂O₂), and the antioxidant quercetin (QUE; plant-derived flavonoid) supplementation, by assessing in vitro cleavage development and reactive oxygen species (ROS) levels in bovine parthenotes. The parthenotes were either untreated, exposed to H₂O₂ (85 µM), QUE (2 µM), or double-exposed. Development was assessed at 96 hours post-parthenogenetic activation. The rates were estimated for: Cleavage, 2-cell (2C), 4-cell (4C), early 8-cell (e8C: 5-8 cells), late 8-cell (L8C: 10-16 cells), and 5-16 cell (5-16C; e8C+L8C) stages. All cleaved parthenotes were stained with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate to quantify ROS. The possible association between development and ROS levels was evaluated by correlation analysis. The H₂O₂-exposed parthenotes showed a significantly lower e8C-developmental rate than untreated (P<0.05). Similarly, H₂O₂-exposed parthenotes revealed less L8C-developmental rate than QUE-treated (P<0.05). Also, in H₂O₂-treated parthenotes, the 5-16C-rate was less than untreated (P=0.0557) and QUE-treated (P=0.0502). Concerning ROS, the H₂O₂-treated parthenotes exhibited higher quantities than QUE-treated 2C-parthenotes (P<0.05). Furthermore, ROS levels were higher in H₂O₂-exposed than in untreated (P<0.001), QUE-treated, and double-exposed in e8C-parthenotes (P<0.0001). Moreover, The H₂O₂-exposed parthenotes exhibited higher ROS levels, as compared with untreated (P<0.001), QUE-treated, and double-exposed (P<0.0001) at the 5-16C stage. Finally, the trends in the correlation analysis suggested inverse association between development and ROS levels. In conclusion, parthenogenetic cleavage and ROS levels appear inversely correlated. Quercetin inhibits H₂O₂-inflicted oxidative stress by mitigating ROS levels and increases in vitro cleavage in bovine parthenotes of five to 16 cells.

Dos tesis de licenciatura defendidas

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

Instituto de Ciencias Biomédicas

Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia



ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE
PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE PARTENOTAS BOVINAS

TESIS

COMO UN REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIATURA EN:

Médico Veterinario Zootecnista

Presenta:

Bianca Viviana Orozco Galindo

DIRECTOR DE TESIS:

PhD. Ernesto Orozco Lucero

CODIRECTOR:

Dr. Andrés Quezada Casasola

COMITÉ DE TESIS:

Dr. José María Carrera Chávez

Dr. Juan Alberto Quintero Elisea

Dra. Marbella Chávez Solano

Ciudad Juárez, Chihuahua

Mayo de 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS VETERINARIAS



ANÁLISIS DEL NIVEL DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN
PARTENOTAS BOVINAS EN ETAPA DE SEGMENTACIÓN ADICIONADAS *IN*
VITRO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y QUERCETINA

TESIS REMITIDA AL PROGRAMA DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA DEL DEPARTAMENTO DE
CIENCIAS VETERINARIAS COMO REQUISITO PARA
OBTENER EL GRADO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presentada por:
MELISSA MOLINA GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:
PhD. ERNESTO OROZCO LUCERO

CODIRECTOR DE TESIS
DRA. MARBELLA CHÁVEZ SOLANO

HEROICA CIUDAD JUÁREZ, CHIHUAHUA, MÉXICO NOVIEMBRE, 2021

Cuatro ponencias de congreso

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

Medicina Veterinaria y Zootecnia

Semana del Veterinario

***Partenotas y Embriones Como Modelo
de Estudio de Estrés en Bovinos***

DR. ERNESTO OROZCO LUCERO

13 Agosto 2018

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez
Departamento de Ciencias Veterinarias

XII Semana del Médico Veterinario UACJ
I Simposio Internacional Veterinario

***Óvulos y Embriones de Calidad:
¿Es Útil la Administración de
Antioxidantes en Animales?***

DR. ERNESTO OROZCO LUCERO

Agosto 2020

Québec, November 1, 2021

To whom it may concern,

This letter is to confirm that Ernesto Orozco Lucero attended the DADE meeting (Domestic Animal DOHaD and Epigenetics meeting) and the RQR Symposium held on October 12, 13, 14 and 15, 2021. He also gave a poster presentation entitled " Quercetin mitigates H2O2-induced oxidative stress in bovine parthenogenetic embryos: in vitro cleavage assessment and reactive oxygen species quantification" during the RQR symposium (co-authors: Melissa Molina-Garcia, Marbella Chavez-Solano, Christian Y., Felix-Delgado, Armando Varela-Ramirez, Diana M. Beristain-Ruiz, Alejandro Martinez-Martinez, Ernesto Orozco-Lucero).

For additional information, I invite you to contact Chloé Fortin, the network manager, by e-mail at chloe.fortin.1@ulaval.ca.

Best regards,



Claude Robert, PhD
RQR Network Director

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y
la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez
a través de
la Dirección General de Vinculación e Intercambio



Ciudad Juárez Chihuahua
20 y 21 de octubre de 2021

OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

A: Melissa Molina García

Por su invaluable participación en la modalidad Oral del Área de Biotecnología y Ciencias Agropecuarias, con el trabajo: Análisis de desarrollo y nivel de especies reactivas de oxígeno en partenotas bovinas en etapa de segmentación suplementadas in vitro con peróxido de hidrógeno y quercetina, bajo la tutoría del Dr. Ernesto Orozco Lucero.

Mtra. Tania D. Hernández García
Dirección de Vinculación e intercambio
Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

Ciudad Juárez, Chihuahua, 21 de octubre de 2021

Mtra. Yadira Isela Márquez González
Subdirección de Cooperación e internacionalización
Universidad Autónoma de Ciudad Juárez



Proyecto aprobado por el CONACYT en el año 2021

Un premio estudiante

UACJ

CONACYT

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y
la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez
a través de
la Dirección General de Vinculación e Intercambio



Ciudad Juárez Chihuahua
20 y 21 de octubre de 2021

OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

A: Melissa Molina García

Por haber obtenido el 2do. Lugar, en la modalidad Oral del Área de Biotecnología y Ciencias Agropecuarias, con el trabajo: Análisis de desarrollo y nivel de especies reactivas de oxígeno en partenotas bovinas en etapa de segmentación suplementadas in vitro con peróxido de hidrógeno y quercetina, bajo la tutoría del Dr. Ernesto Orozco Lucero.

Mtra. Tania D. Hernández García
Dirección de Vinculación e intercambio
Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

Ciudad Juárez, Chihuahua, 21 de octubre de 2021

Mtra. Yadira Isela Márquez González
Subdirección de Cooperación e internacionalización
Universidad Autónoma de Ciudad Juárez



Proyecto aprobado por el CONACYT en el año 2021

Taxonomía de los Roles de Colaborador (con las actividades logradas)

Roles	Definición de los roles	Nombre de él(la) investigador(a)	Figura	Grado de contribución	Actividades logradas durante el proyecto	Tiempo promedio semanal (en horas) dedicado al proyecto
1. Responsabilidad de la dirección del proyecto.	Coordinar la planificación y ejecución de la actividad de investigación. Organiza los roles de cada colaborador, tiene la habilidad de identificar potenciales de cada individuo para generar una sinergia de equipo colaborativo.	Dr. Ernesto Orozco Lucero	Director del proyecto	Principal	Dirección general del proyecto; inicio; desarrollo; financiero; informes; cierre.	20
2. Responsabilidad de supervisión.	Elaborar la planificación de las actividades de la investigación (cronogramas y controles de seguimiento), describe los roles identificados por el director del proyecto y facilita el apoyo constante a todos los roles para conseguir un trabajo integral, coherente y que llegue a buen término.		Supervisor del proyecto	Principal	Entrenamiento, dirección y supervisión de estudiantes; coordinación de colaboradores; gestión para obtener muestras biológicas (1ª. 2ª parte del proy.).	
3. Realización y redacción de la propuesta.	Preparación, creación y redacción de la propuesta de investigación, específicamente la redacción, revisión de coherencia del texto, presentación de los datos y la normatividad aplicable para garantizar el cumplimiento de los requisitos.		Redactor de la propuesta	Principal	Diseño, corrección de la propuesta.	
4. Desarrollo o diseño de la metodología.	Contribuir con el diseño de la metodología, modelos a implementar y el sustento teórico, empírico y científico para la aplicabilidad de los instrumentos en la ejecución del proyecto.		Diseñador de la metodología	Principal	Obtención de muestra; sistema de cultivo; suplementación oxidante, antioxidante; evaluación morfológica; microscopía; cuantificación fluorescente (1ª. 2ª parte del proy.); búsqueda, diseño de primers (3ª parte del proy.).	
5. Recopilación/ recolección de datos e información.	Ejecuta las estrategias propuestas en acciones encaminadas a obtener la información, haciendo la recopilación de datos y la inclusión de la evidencia en el proceso.		Recopilador de datos	De apoyo	Dirección de alumnos y colaboradores en la obtención de datos (1ª. 2ª parte del proy.); verificación de primers.	

Taxonomía de los Roles de Colaborador (2).

Roles	Definición de los roles	Nombre de él(la) investigador(a)	Figura	Grado de contribución	Actividades logradas durante el proyecto	Tiempo promedio semanal (en horas) dedicado al proyecto
<p>6. Elaboración del análisis formal de la investigación.</p> <p>7. Preparación, creación y/o presentación de los productos o entregables.</p>	<p>Aplicar métodos estadísticos, matemáticos, computacionales, teóricos u otras técnicas formales para analizar o sintetizar los datos del estudio. Verifica los resultados preliminares de cada etapa del análisis, los experimentos implementados y otros productos comprometidos en el proyecto.</p> <p>Preparar la redacción del reporté técnico de avance parcial y el reporte técnico final. Se hace la revisión crítica, la recopilación de las observaciones y comentarios del grupo de investigación. Y finalmente se procede a la edición del documento a entregar.</p>	Dr. Ernesto Orozco Lucero	<p>Analista de datos</p> <p>Editor de reportes técnicos</p>	<p>Principal</p> <p>Principal</p>	<p>Análisis estadístico del cultivo partenogenético (1ª, 2ª parte del proy.); cuantificación de fluorescencia, análisis estadístico (2ª parte del proy.); verificación de primers.</p> <p>Interpretación de resultados; coordinación de discusión con colaboradores; preparación y revisión productos (reporte téc., tesis, artículos, memorias, ponencias).</p>	
<p>2. Responsabilidad de supervisión.</p> <p>4. Desarrollo o diseño de la metodología.</p> <p>5. Recopilación/recolección de datos e información.</p>	<p>Elaborar la planificación de las actividades de la investigación (cronogramas y controles de seguimiento), describe los roles identificados por el director del proyecto y facilita el apoyo constante a todos los roles para conseguir un trabajo integral, coherente y que llegue a buen término.</p> <p>Contribuir con el diseño de la metodología, modelos a implementar y el sustento teórico, empírico y científico para la aplicabilidad de los instrumentos en la ejecución del proyecto.</p> <p>Ejecuta las estrategias propuestas en acciones encaminadas a obtener la información, haciendo la recopilación de datos y la inclusión de la evidencia en el proceso.</p>	Dra. Marbella Chávez Solano	<p>Supervisora del proyecto</p> <p>Diseñador de la metodología</p> <p>Recopilador de datos</p>	<p>De apoyo</p> <p>De apoyo</p> <p>De apoyo</p>	<p>Entrenamiento, dirección y supervisión de estudiantes.</p> <p>Microscopía; cuantificación fluorescente (2ª parte del proy.).</p> <p>Dirección de alumnos en la obtención de datos (2ª parte del proy.).</p>	5

Taxonomía de los Roles de Colaborador (3).

Roles	Definición de los roles	Nombre de él(la) investigador(a)	Figura	Grado de contribución	Actividades logradas durante el proyecto	Tiempo promedio semanal (en horas) dedicado al proyecto
<p>6. Elaboración del análisis formal de la investigación.</p> <p>7. Preparación, creación y/o presentación de los productos o entregables</p>	<p>Aplicar métodos estadísticos, matemáticos, computacionales, teóricos u otras técnicas formales para analizar o sintetizar los datos del estudio. Verifica los resultados preliminares de cada etapa del análisis, los experimentos implementados y otros productos comprometidos en el proyecto.</p> <p>Preparar la redacción del reporté técnico de avance parcial y el reporte técnico final. Se hace la revisión crítica, la recopilación de las observaciones y comentarios del grupo de investigación. Y finalmente se procede a la edición del documento a entregar.</p>	Dra. Marbella Chávez Solano	<p>Analista de datos</p> <p>Editor de reportes técnicos</p>	<p>De apoyo</p> <p>De apoyo</p>	<p>Cuantificación de fluorescencia (2ª parte del proy.).</p> <p>Preparación y revisión productos (reporte téc., tesis, artículos, memorias, ponencias).</p>	
<p>3. Realización y redacción de la propuesta.</p> <p>4. Desarrollo o diseño de la metodología.</p> <p>7. Preparación, creación y/o presentación de los productos o entregables.</p>	<p>Preparación, creación y redacción de la propuesta de investigación, específicamente la redacción, revisión de coherencia del texto, presentación de los datos y la normatividad aplicable para garantizar el cumplimiento de los requisitos.</p> <p>Contribuir con el diseño de la metodología, modelos a implementar y el sustento teórico, empírico y científico para la aplicabilidad de los instrumentos en la ejecución del proyecto.</p> <p>Preparar la redacción del reporté técnico de avance parcial y el reporte técnico final. Se hace la revisión crítica, la recopilación de las observaciones y comentarios del grupo de investigación. Y finalmente se procede a la edición del documento a entregar.</p>	Dr. Armando Varela Ramírez	<p>Redactor de la propuesta</p> <p>Diseñador de la metodología</p> <p>Editor de reportes técnicos</p>	<p>De apoyo</p> <p>De apoyo</p> <p>De apoyo</p>	<p>Corrección de la propuesta.</p> <p>Suplementación oxidante, antioxidante; microscopía; cuantificación fluorescente (2ª parte del proy.).</p> <p>Preparación y revisión productos (artículos, memorias, ponencias).</p>	4

Taxonomía de los Roles de Colaborador (4).

Roles	Definición de los roles	Nombre de él(la) investigador(a)	Figura	Grado de contribución	Actividades logradas durante el proyecto	Tiempo promedio semanal (en horas) dedicado al proyecto
2. Responsabilidad de supervisión. 7. Preparación, creación y/o presentación de los productos o entregables.	Elaborar la planificación de las actividades de la investigación (cronogramas y controles de seguimiento), describe los roles identificados por el director del proyecto y facilita el apoyo constante a todos los roles para conseguir un trabajo integral, coherente y que llegue a buen término. Preparar la redacción del reporté técnico de avance parcial y el reporte técnico final. Se hace la revisión crítica, la recopilación de las observaciones y comentarios del grupo de investigación. Y finalmente se procede a la edición del documento a entregar.	Dr. José María Carrera Chávez	Supervisor del proyecto Editor de reportes técnicos	De apoyo De apoyo	Supervisión de estudiantes; gestión para obtener muestras biológicas (1ª. 2ª parte del proy.). Revisión de productos (tesis, artículos).	3
2. Responsabilidad de supervisión. 7. Preparación, creación y/o presentación de los productos o entregables.	Elaborar la planificación de las actividades de la investigación (cronogramas y controles de seguimiento), describe los roles identificados por el director del proyecto y facilita el apoyo constante a todos los roles para conseguir un trabajo integral, coherente y que llegue a buen término. Preparar la redacción del reporté técnico de avance parcial y el reporte técnico final. Se hace la revisión crítica, la recopilación de las observaciones y comentarios del grupo de investigación. Y finalmente se procede a la edición del documento a entregar.	Dr. Andrés Quezada Casasola	Supervisor del proyecto Editor de reportes técnicos	De apoyo De apoyo	Supervisión de estudiantes; gestión para obtener muestras biológicas (1ª. 2ª parte del proy.). Revisión de productos (tesis, artículos).	3
4. Desarrollo o diseño de la metodología.	Contribuir con el diseño de la metodología, modelos a implementar y el sustento teórico, empírico y científico para la aplicabilidad de los instrumentos en la ejecución del proyecto.	Dr. Ángel Gabriel Díaz Sánchez	Diseñador de la metodología	De apoyo	Suplementación oxidante, antioxidante.	2

13.1.1 Estudiantes participantes en el proyecto

Nombre de estudiante(s)	Matrícula	Tiempo promedio semanal (en horas) dedicado al proyecto	Actividades logradas en la ejecución del proyecto
EMVZ. Bianca Viviana Orozco Galindo	98102	12	Optimización de la generación <i>in vitro</i> de partenotas bovinas; redacción de una tesis de licenciatura; defensa de una tesis de licenciatura.
EMVZ. Melissa Molina García	149526	12	Obtención de muestras biológicas (ovarios bovinos); cuantificación de fluorescencia en partenotas bovinas; análisis estadístico de fluorescencia en partenotas; redacción de una tesis de licenciatura; defensa de una tesis de licenciatura; 2º lugar, concurso de ponencia oral, pregrado, área Biotecnología y Ciencias Agropecuarias en el 7º EJECH.
EMVZ. Christian Yael Félix Delgado	149480	6	Obtención de muestras biológicas (ovarios bovinos); análisis estadístico de desarrollo en partenotas bovinas; redacción de una tesis de licenciatura; próxima defensa de una tesis de licenciatura.
EMVZ. Gitzel Cárdenas Ochoa	166984	6	Aprendizaje básico del proceso de RT-PCR; inicio de una tesis de licenciatura