

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



**OBTENCIÓN DE EMBRIONES DE OVINO POR TRANSFERENCIA
NUCLEAR A PARTIR DE FIBROBLASTOS DE PIEL Y OVOCITOS
MADURADOS *IN VITRO* CON RESVERATROL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA
JOSÉ LUIS MARTÍNEZ IBARRA

DIRECTORA
DRA. MARÍA DEL CARMEN NAVARRO MALDONADO

ASESORES
**DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCÍA
DR. RAYMUNDO RANGEL SANTOS**

MÉXICO, D.F. A 7 DE ABRIL DE 2016

COMITÉ TUTORAL



DIRECTORA

DRA. MARÍA DEL CARMEN NAVARRO MALDONADO
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa



ASESOR

DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCÍA
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa



ASESOR

DR. RAYMUNDO RANGEL SANTOS
Posgrado en Producción Animal
Departamento de Zootecnia
Universidad Autónoma Chapingo

“El programa de Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 003797”

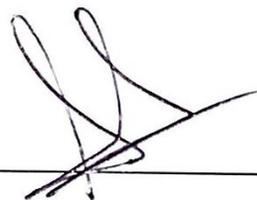
Número de CVU: 570853 y becario otorgado por CONACYT: 302861.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "Obtención de embriones de ovino por transferencia nuclear a partir de fibroblastos de piel y ovocitos madurados *in vitro* con resveratrol" que presentó José Luis Martínez Ibarra el día 7 de abril de 2016.

DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE (Presidente)
Laboratorio de Biología Celular
Departamento de Ciencias de la Salud
División de CBS UAM-I



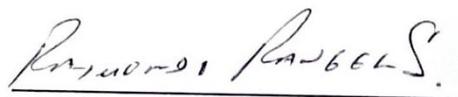
DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCÍA (Secretario)
Departamento de Biología de la Reproducción
División CBS UAM-I



DRA. EDITH ARENAS RÍOS (Vocal)
Departamento de Biología de la Reproducción
División CBS UAM-I



DR. RAYMUNDO RANGEL SANTOS (Vocal)
Posgrado en Producción Animal
Departamento de Zootecnia
Universidad Autónoma Chapingo



AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por haberme otorgado la beca para obtener el grado de Maestro en Biología de la Reproducción Animal.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por permitirme realizar mis estudios de licenciatura y maestría.

A la Dra. María del Carmen Navarro por la dirección de la presente tesis y por brindarme el apoyo y la libertad para desarrollar esta investigación.

Al Dr. Demetrio Ambriz por su apoyo incondicional durante toda la maestría, el cual fue fundamental para la culminación de esta tesis. Pero en particular por la amistad y la confianza brindada durante el tiempo que llevamos de conocernos.

Al Dr. Raymundo Rangel por su colaboración como asesor y revisor de la presente tesis.

A la Dra. Edith Arenas por compartir conmigo su conocimiento y por las palabras de apoyo que me ha brindado.

Al Dr. José Miguel Betancourt por la revisión y aportes hechos a la presente tesis.

Al Dr. Gabor Vajta por la enseñanza de la técnica de clonación manual.

A mis compañeros de laboratorio: Sarahí Hernández, Roberto Avendaño, Adriana Espinoza y Nathaly Zavala, quienes de una forma u otra aportaron su conocimiento para la realización y culminación de mi maestría. Pero sobre todo por la amistad que me han brindado, por su apoyo durante las horas de trabajo en el laboratorio, así como por sus consejos y críticas, de las cuales he aprendido mucho y me han hecho crecer como persona.

Y a todas aquellas personas que me consideran su amigo.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mi familia:

A mi mamá Carmen Ybarra y mi papá Juan José Martínez, por enseñarme con el ejemplo, que con honestidad, trabajo y esfuerzo se puede lograr cualquier cosa.

A mis hermanos Israel y Karina por estar siempre a mi lado y apoyarme en todo momento.

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de resveratrol en la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos de ovino (*Ovis aries*) y su impacto en el desarrollo temprano de embriones obtenidos por clonación manual o *handmade cloning* (HMC). Para cada concentración de resveratrol (0, 0.5, 2 y 5 μM) se evaluaron la maduración nuclear y los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ERO) en los ovocitos, así como el desarrollo y la calidad morfológica de los embriones clonados. Transcurrido el tiempo de MIV, no se observó diferencia significativa ($P>0.05$) en el porcentaje de maduración de los ovocitos tratados con 0.5 y 2 μM (81.3 y 72.0%, respectivamente) comparados con el control (74.2%), en tanto que a 5 μM (56.0%) disminuyó significativamente ($P<0.05$). Al determinar las ERO intracelulares de los ovocitos madurados *in vitro* con resveratrol, no se observaron diferencias significativas entre grupos ($P>0.05$). Durante el desarrollo embrionario, no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) en los porcentajes de embriones divididos de cada grupo (81.2, 84.4, 80.1 y 77.2%, respectivamente), de igual forma, en los embriones de 8-16 blastómeros no hubo diferencia significativa entre grupos (65.6, 70.2, 64.3 y 63.6%, respectivamente) ($P>0.05$). En las mórulas, a 5 μM el porcentaje (6.8%) disminuyó significativamente ($P<0.05$) con respecto a 0, 0.5 y 2 μM (32.8, 35.1 y 28.7%, respectivamente). Al determinar el porcentaje de mórulas compactas, se observó que a 0.5 μM fue de 10.7%, el cual fue significativamente mayor ($P<0.05$) que el control (6.2%), en tanto que a 2 y 5 μM no hubo mórulas compactas. En la calidad morfológica de los embriones de 8-16 blastómeros, no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) entre los porcentajes de embriones de calidad 1, 2, 3 y 4. En las mórulas tratadas con 0.5 μM , el porcentaje de mórulas de calidad 4 (mala) (4.7%) fue significativamente menor ($P<0.05$) que a 0, 2 y 5 μM (23.8, 23.3 y 33.3%, respectivamente), en tanto que, a 5 μM el porcentaje de

las mórulas de calidad 1 (excelentes) fue significativamente menor (0%) comparado con 0, 0.5 y 2 μM (23.8, 30.1 y 23.3%, respectivamente) ($P < 0.05$). En conclusión, el resveratrol durante la MIV no aumentó significativamente la tasa de maduración nuclear, ni redujo los niveles intracelulares de ERO de los ovocitos. Sin embargo, el tratamiento con 0.5 μM de resveratrol durante la MIV, promovió en el desarrollo de los embriones de ovino obtenidos por HMC, la compactación en las mórulas y mejoró su calidad. En tanto que a 5 μM , disminuyó el porcentaje de MIV de los ovocitos, así como el subsecuente desarrollo y calidad de los embriones.

Palabras clave: Clonación manual, Resveratrol, Ovino, Maduración *in vitro*, Desarrollo embrionario.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effects of different concentrations of resveratrol on ovine (*Ovis aries*) oocyte *in vitro* maturation (IVM) and subsequent embryonic development after handmade cloning (HMC). To determine the effects of resveratrol were evaluated four different concentrations (0, 0.5, 2 and 5 μ M) on the nuclear maturation, reactive oxygen species (ROS) levels, as well as early embryonic development and morphological quality. After IVM, no significant difference was observed in maturation of the 0.5 and 2 μ M resveratrol groups (81.3 and 72.0%, respectively) compared with the control (0 μ M) (74.2%), but the 5 μ M resveratrol group showed significantly decreased nuclear maturation (56.0%) ($P < 0.05$). Intracellular ROS levels in oocyte matured did not show significant differences between the groups ($P > 0.05$). In subsequent embryonic development after HMC, no significant differences were observed in cleaved embryos between the groups (81.2, 84.4, 80.1 and 77.2%, respectively) ($P > 0.05$). In 8-16 cell embryos, no significant differences were observed between the groups (65.6, 70.2, 64.3 and 63.6%, respectively) ($P > 0.05$). In morulae, the 5 μ M group was significantly lower (6.8%) compared with 0, 0.5 and 2 μ M groups (32.8, 35.1 and 28.7%, respectively) ($P < 0.05$). But, the 0.5 μ M resveratrol group had significantly higher morula compactation rates (10.7%) compared with 0, 2 and 5 μ M groups (6.2, 0 and 0%, respectively) ($P < 0.05$). Morphological quality did not show significant differences in 8-16 cell embryos between the 1, 2, 3 and 4 quality ($P > 0.05$). In morulae treated with 0.5 μ M had significantly less quality 4 (bad) embryos (4.7%) compared with 0, 2 and 5 μ M (23.8, 23.3 and 33.3%, respectively) ($P < 0.05$), but with 5 μ M had significantly less quality 1 (excellent) embryos (0%) compared with 0, 0.5 and 2 μ M (23.8, 30.1 and 23.3%, respectively) ($P < 0.05$). In conclusion, resvetratrol supplementation on ovine oocyte IVM did not show significant differences in maturation rates and ROS levels. However a treatment

with 0.5 μM during IVM, promoted the compactation of handmade cloned morulae and improved its quality. But with 5 μM had significantly less IVM rates as well as embryonic development and quality.

Keywords: Handmade cloning, Resveratrol, Ovine, *In vitro* maturation, Embryonic development.

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Ovogénesis..... | 5 |
| 1.2 Desarrollo folicular..... | 5 |
| 1.3 Maduración del ovocito..... | 8 |
| 1.3.1 Maduración nuclear..... | 9 |
| 1.3.2 Maduración citoplasmática..... | 10 |
| 1.4 Células de la granulosa..... | 11 |
| 1.5 Zona pelúcida..... | 12 |
| 1.6 Desarrollo embrionario temprano..... | 13 |
| 1.7 El resveratrol..... | 14 |
| 1.7.1 Biosíntesis y metabolismo del resveratrol..... | 16 |
| 1.8 Efectos biológicos del resveratrol..... | 18 |
| 1.8.1 El resveratrol como antioxidante..... | 20 |
| 1.8.2 El resveratrol como activador de la sirtuina 1..... | 21 |
| 1.8.3 El resveratrol como fitoestrógeno..... | 22 |
| 2. ANTECEDENTES | 24 |
| 2.1 Obtención de embriones por transferencia nuclear de células somáticas.. | 24 |
| 2.1.1 Células donadoras de núcleo (Carioplastos)..... | 24 |
| 2.1.2 Obtención de ovocitos..... | 27 |
| 2.1.3 Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos..... | 28 |
| 2.1.4 Denudación y enucleación de ovocitos..... | 29 |
| 2.1.5 Fusión celular..... | 31 |
| 2.1.6 Activación de embriones clonados..... | 32 |
| 2.1.7 Cultivo <i>in vitro</i> de embriones clonados..... | 33 |
| 2.1.8 Evaluación de embriones clonados..... | 35 |
| 2.2 El resveratrol en la MIV de ovocitos..... | 36 |
| 2.3 El resveratrol en el desarrollo de embriones producidos <i>in vitro</i> | 37 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 40 |
| 4. HIPÓTESIS | 42 |
| 5. OBJETIVOS | 43 |
| 5.1 Objetivo general..... | 43 |
| 5.2 Objetivos particulares..... | 43 |
| 6. MATERIAL Y MÉTODOS | 44 |
| 6.1 Obtención de los ovarios y complejos cúmulo-ovocito..... | 44 |
| 6.2 Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos tratados con resveratrol..... | 45 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 6.3 | Clonación manual..... | 45 |
| 6.3.1 | Preparación de los citoplastos..... | 45 |
| 6.3.2 | Obtención y preparación de los carioplastos..... | 47 |
| 6.3.3 | Fusión celular..... | 49 |
| 6.3.4 | Activación y cultivo <i>in vitro</i> de los embriones clonados..... | 50 |
| 6.4 | Evaluación del efecto del resveratrol en la MIV..... | 51 |
| 6.5 | Determinación de especies reactivas de oxígeno..... | 51 |
| 6.6 | Evaluación del desarrollo embrionario..... | 52 |
| 6.7 | Evaluación de la calidad morfológica embrionaria..... | 52 |
| 6.8 | Análisis estadístico..... | 53 |
| 7. | RESULTADOS..... | 54 |
| 7.1 | Efecto del resveratrol en la MIV de ovocitos de ovino..... | 54 |
| 7.2 | Especies reactivas de oxígeno en los ovocitos tratados con resveratrol... | 55 |
| 7.3 | Desarrollo temprano de los embriones clonados a partir de ovocitos tratados con resveratrol..... | 57 |
| 7.4 | Calidad morfológica de los embriones clonados a partir de ovocitos tratados con resveratrol..... | 59 |
| 8. | DISCUSIÓN..... | 62 |
| 9. | CONCLUSIONES..... | 72 |
| 10. | BIBLIOGRAFIA..... | 73 |
| 11. | ANEXOS..... | 88 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| 6-DMAP | 6-Dimetilaminopurina. |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico. |
| AMPc | Adenosín monofosfato cíclico. |
| AMPK | Proteín cinasa activada por AMP. |
| ARN | Ácido ribonucleico. |
| ATP | Adenosin trifosfato. |
| CG | Gonadotropina coriónica. |
| CGP | Células germinales primordiales. |
| COC | Complejo cúmulo-ovocito. |
| CT | Clonación tradicional. |
| DMEM | Medio Eagle modificado de Dulbecco. |
| DMSO | Dimetil sulfóxido. |
| DPBS | Solución amortiguadora de fosfatos de Dulbecco. |
| EGF | Factor de crecimiento epidérmico. |
| ERO | Especies reactivas de oxígeno. |
| FIV | Fertilización <i>in vitro</i> . |
| FSH | Hormona folículo estimulante. |
| GSH | Glutación. |
| HEPES | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid. |
| HMC | Clonación manual (Handmade Cloning). |
| LH | Hormona luteinizante. |
| MII | Metafase II. |
| MIV | Maduración <i>in vitro</i> . |
| MPF | Factor promotor de la maduración. |
| NAD+ | Nicotinamida adenina dinucleótido. |

| | |
|----------------|---|
| PHA | Fitohemaglutinina. |
| PIV | Producción <i>in vitro</i> . |
| SFB | Suero Fetal Bovino. |
| SIRT1 | Sirtuina 1. |
| SOF | Fluido oviductal sintético. |
| T10 | TCM-199 con HEPES con 10% de SFB. |
| T2 | TCM-199 con HEPES con 2% de SFB. |
| T20 | TCM-199 con HEPES con 20% de SFB. |
| TCM-199 | Medio de cultivo de tejidos 199. |
| TNCS | Transferencia nuclear de células somáticas. |
| UV | Ultravioleta. |
| WOW | Well of the Well. |
| ZP | Zona pelúcida. |

1. INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones (PIV) por transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) es una biotecnología reproductiva que presenta un gran potencial como herramienta para la propagación de individuos genéticamente valiosos, ya que puede contribuir de manera eficaz en la producción animal, la generación de individuos modificados genéticamente y la preservación de especies en riesgo de extinción (Folch *et al.*, 2009). De igual forma puede ser una herramienta útil en el desarrollo de investigación básica, debido a que facilita el estudio de diversos procesos del desarrollo embrionario y de reprogramación nuclear (Niemann *et al.*, 2008).

La TNCS, comúnmente conocida como clonación artificial, puede definirse como el proceso por el cual a partir de una célula somática o a partir de un núcleo, se obtiene uno o varios individuos genéticamente idénticos o mejor dicho casi idénticos al individuo de quien provienen dichas células o núcleos (Bren, 2003). El primer reporte de un animal clonado mediante la transferencia de un núcleo al interior de un ovocito previamente enucleado fue realizado por Briggs y King (1952), quienes clonaron una rana de la especie *Rana pipiens*. Sin embargo, el acontecimiento más destacado en clonación animal, fue el nacimiento de la oveja “Dolly”, considerada como el primer mamífero clonado a partir de una célula somática adulta (Wilmut *et al.*, 1997). Desde entonces, se han logrado clonar de manera exitosa, bovinos (Cibelli *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1998), murinos (Wakayama *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2003), porcinos (Polejaeva *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2002), caprinos (Baguisi *et al.*, 1999; Keefer *et al.*, 2002), felinos (Shin *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2004), lepóridos (Chesne *et al.*, 2002), equinos: mulas (Woods *et al.*, 2003) y caballos (Galli *et al.*, 2003; Lagutina *et al.*, 2005), caninos domésticos (Lee *et al.*, 2005; Jang *et al.*, 2007) y animales silvestres: gaur (Lanza *et al.*, 2000), muflón europeo (Loi *et al.*, 2001), hurón (Li *et al.*, 2006), búfalo (Shi *et*

al., 2007), lobo gris (Kim *et al.*, 2007) y camello (Wani, *et al.* 2010). Los reportes anteriores demuestran que es posible obtener individuos mediante clonación por TNCS.

De manera tradicional, en la clonación se utilizan micromanipuladores para enuclear los ovocitos e introducir en ellos el material genético del individuo que se desee clonar. Actualmente la técnica de clonación tradicional (CT) no es viable, ya que para su realización es necesario contar con equipo costoso y sofisticado, así como la asistencia de personal altamente calificado, haciendo que esta metodología sea compleja, tardada y poco accesible (Vajta *et al.*, 2003). Como alternativa a la CT, en 2001 se desarrolló la técnica de clonación manual o handmade cloning (HMC), la cual a diferencia de la CT no utiliza micromanipuladores, haciéndola una técnica accesible y menos compleja (Vajta *et al.*, 2001). Mediante la HMC se ha reportado el nacimiento de bovinos: domésticos (Vajta *et al.* 2004; Hall *et al.*, 2006; Taylor-Robinson *et al.*, 2014) y silvestres (George *et al.*, 2011), porcinos (Du *et. al.* 2007; Zhang *et al.*, 2012) y ovinos (Zhang *et al.*, 2013).

En ambas técnicas de clonación (CT y HMC) la eficiencia aún es baja, dependiendo de la especie, solo del 1 al 6% de los embriones transferidos han nacido vivos (Meissner *et al.*, 2006; Oback, 2008) y en algunos casos estos animales han presentado problemas de desarrollo. Se ha mencionado que estos problemas se deben a la complejidad intrínseca de estas técnicas, en las cuales están involucrados diversos factores que pueden afectar el desarrollo de los embriones (Han *et al.*, 2003). Al respecto, Rizos *et al.* (2005) y Camargo *et al.* (2006) indican que la calidad de los ovocitos madurados *in vitro* es el principal factor para obtener un desarrollo óptimo en los embriones producidos *in vitro*.

La maduración *in vitro* (MIV) del ovocito es un proceso complejo en el cual están involucrados diversos factores, que son responsables para alcanzar una correcta

maduración nuclear y citoplasmática (Ali *et al.*, 2006). Un factor importante que puede afectar la MIV de los ovocitos, es el estrés oxidativo, el cual provoca un desequilibrio entre la cantidad de oxidantes y antioxidantes naturales dentro de la célula (Combelles *et al.*, 2009). Se ha reportado que la maduración del ovocito está fuertemente influenciada por la concentración de glutatión (GSH) y las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Abeydeera *et al.*, 1998; De Matos *et al.*, 2000; You *et al.*, 2010). Las ERO son derivados metabólicos del oxígeno que se forman por la ruptura, la excitación o la reducción del oxígeno molecular (Turrens, 2013). La sobreproducción de ERO durante la MIV de los ovocitos y el desarrollo embrionario temprano, provoca peroxidación lipídica en la membrana celular, fragmentación del ADN, alteraciones en la transcripción de ARN y síntesis de proteínas. También se han reportado alteraciones en el reinicio del arresto meiótico, aneuploidas, modificaciones en la estructura del citoesqueleto, defectos en las mitocondrias, apoptosis e incluso modificaciones en la expresión génica (Combelles *et al.*, 2009). Estos acontecimientos claramente pueden provocar daños en los ovocitos y embriones, pudiendo incluso causar muerte celular.

Por lo tanto, es importante establecer un sistema de MIV que tenga la capacidad de reducir los niveles intracelulares de ERO, con lo cual se reduzca el daño oxidativo y se mejore la calidad de los ovocitos, contribuyendo así, a un mejor desarrollo embrionario. Para lograr lo anterior se ha propuesto el uso durante la MIV de diversas sustancias químicas con propiedades antioxidantes como el β -mercaptoethanol, cisteína, cistina y L-carnitina (De Matos *et al.*, 2000; You *et al.*, 2010), así como el ácido ascórbico y el α -tocoferol (Vitamina C y vitamina E, respectivamente) (Tao *et al.*, 2010). Recientemente se ha reportado que el resveratrol (*trans*-resveratrol) al ser utilizado durante la MIV mejora el desarrollo embrionario en porcinos, bovinos y caprinos (Kwak *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014; Mukherjee *et al.*, 2014).

El resveratrol (3,4',5-trihidroxi estilbeno) es un polifenol natural presente en plantas como poligonum (*Polygonum cuspidatum*) y la uva (*Vitis vinífera*), que tiene como actividad biológica proteger a la planta contra ataques patógenos, fúngicos y bacterianos. Se ha utilizado como antioxidante, antiinflamatorio, cardioprotector y anticancerígeno (Gambini *et al.*, 2013). El resveratrol también ha mostrado efectos sobre la expresión de diferentes genes relacionados con la síntesis de ADN, el ciclo celular, respuesta al estrés y la apoptosis. Además se ha reportado que induce la biogénesis mitocondrial y la activación de la Sirtuina 1 (SIRT1), lo cual podría explicar el aumento en la longevidad en algunos organismos (Palacios *et al.*, 2010).

Al hacer una revisión bibliográfica no se encontraron reportes del efecto del resveratrol durante la MIV de ovocitos de ovino (*Ovis aries*), ni tampoco en el desarrollo temprano de embriones de ovino obtenidos por HMC. Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó el efecto del resveratrol en la MIV de ovocitos de ovino y su impacto en el desarrollo y calidad de los embriones obtenidos por clonación manual.

Para comprender a detalle los procesos previamente descritos, es necesario revisar diversos aspectos generales como la ovogénesis, la maduración de ovocitos, el desarrollo embrionario temprano en ovinos, las características generales del resveratrol y la obtención de embriones por TNCS, los cuales se describen a continuación.

1.1 OVOGÉNESIS

La ovogénesis es el proceso por el cual se forman los gametos femeninos, denominados ovocitos. En los mamíferos, este proceso comienza durante el desarrollo embrionario, cuando las células germinales primordiales (CGP) migran a la gónada embrionaria y termina meses o años más tarde en el momento de la madurez sexual. La ovogénesis inicia con la formación de las CGP, las cuales sufren una serie de cambios para diferenciarse en ovogonias. Posteriormente las ovogonias se dividen mitóticamente para formar al ovocito primario, el cual entra a la meiosis I y se detiene en la etapa de diploteno de la profase I, permaneciendo inactivo hasta la pubertad, cuando en respuesta al pico de la hormona luteinizante (LH) se induce el reinicio de la meiosis (Tarazona *et al.*, 2010). Cuando el ovocito completa la meiosis I, expulsa el primer cuerpo polar y se convierte en ovocito secundario. El cual continúa hasta la metafase II (MII) de la meiosis II, donde vuelve a detenerse en espera de la fertilización y completar la meiosis (Cornejo, 2009).

1.2 DESARROLLO FOLICULAR

El desarrollo folicular es un proceso complejo, caracterizado por la proliferación y diferenciación de las células foliculares, las cuales proporcionan un medio ambiente óptimo para la maduración del ovocito y su preparación para la fertilización después de la ovulación (Villavicencio *et al.*, 2007).

Con el inicio de la meiosis, surgen los folículos primordiales que están constituidos por un ovocito rodeado de una capa de células somáticas escamosas planas, llamadas células pregranulosas. Durante el inicio de la actividad meiótica una gran cantidad de ovocitos degeneran, provocando una disminución en el número de folículos primordiales presentes en

el ovario al momento del nacimiento. Los folículos primordiales se caracterizan por mantenerse en quiescencia hasta poco antes de la pubertad, momento en que el ovario comienza a ser receptivo a las hormonas gonadotrópicas (Van den Hurk y Zhao, 2005).

Los folículos primordiales se mantienen quiescentes hasta que son reclutados y transformados en folículos primarios. Los folículos primordiales se convierten en primarios debido a la hipertrofia de las células planas que rodean al ovocito, las cuales toman una forma cúbica. A partir de este momento el folículo comienza a crecer en un proceso continuo que está regulado por el ovario y en el cual, el ovocito y las células foliculares que lo rodean crecen conjuntamente, progresando por una serie de estadios morfológicos que concluyen en la ovulación de un ovocito maduro o en la atresia folicular (Van den Hurk y Zhao, 2005).

Durante la fase de crecimiento el ovocito permanece detenido en diploteno de la profase I de la meiosis, donde el volumen de su citoplasma aumenta hasta 500 veces, debido a la acumulación de sustancias de reserva, produciéndose una mayor síntesis de ARN. Durante este periodo el número de mitocondrias crece, Cotterill *et al.* (2013) reportan una cantidad mil veces mayor de mitocondrias en ovocitos en MII, respecto a ovocitos pertenecientes a folículos primordiales. Además se forman los gránulos corticales que se sitúan debajo de la membrana plasmática, se forman microvellosidades en la membrana citoplasmática y se observa la zona pelúcida (Van den Hurk y Zhao, 2005).

La capa de células foliculares cúbicas del folículo primario se estratifican mediante divisiones mitóticas para formar las células de la granulosa. Alrededor de éstas se desarrolla una capa de células que forman la teca a partir de células del estroma intersticial. De esta manera queda constituido el folículo secundario o preantral. Las células de la granulosa además de comunicarse entre sí, forman uniones Gap con el ovocito. Estas uniones están formadas por

proteínas llamadas conexinas. Este tipo de uniones actúan como mediadores de la comunicación intercelular permitiendo el paso de pequeñas moléculas, como nutrientes, precursores metabólicos (como aminoácidos y nucleótidos), hormonas y factores de crecimiento (Van den Hurk y Zhao, 2005).

Posteriormente los folículos secundarios se desarrollan hacia el siguiente estadio, llamado folículo antral. Los folículos antrales se caracterizan por la presencia de una cavidad conocida como antro, el cual está lleno de líquido o fluido folicular. Justo antes de la formación de la cavidad antral, las células de la granulosa y la teca aumentan su actividad mitótica, al mismo tiempo que el líquido folicular se acumula en la cavidad antral. El líquido folicular es una fuente importante de moléculas reguladoras y moduladoras derivadas de la sangre (Van den Hurk y Zhao, 2005). Durante el desarrollo del folículo, la producción de líquido folicular aumenta debido a una mayor vascularización y permeabilidad de los vasos sanguíneos del folículo. En su desarrollo, el folículo antral atraviesa cuatro fases: fase de crecimiento basal, de reclutamiento, de selección y de dominancia (Fortune *et al.*, 2001; Villavicencio *et al.*, 2007).

Durante la fase de crecimiento, los folículos aumentan su tamaño significativamente. Cuando los folículos antrales alcanzan un tamaño de aproximadamente 0.2 mm en la hembra de ratón, 1 mm en cerda, 2 mm en oveja, 4 mm en la vaca y 10 mm en la yegua se vuelven dependientes de gonadotropinas y son reclutados para continuar su crecimiento (Driancourt, 2001). El reclutamiento folicular se refiere a la formación de una población de folículos antrales de los cuales uno o varios, dependiendo de la especie, es seleccionado para la ovulación. En cada ciclo ovárico es reclutado un grupo de folículos primordiales que crecen de manera continua debido al aumento en las concentraciones de la hormona folículo estimulante (FSH) (Villavicencio *et al.*, 2007). Durante la fase de reclutamiento, el número de

folículos reclutados varía entre especies, de 5-10 en vaca, de 1-4 en yeguas o más de 50 en cerdas. El reclutamiento y la selección de folículos antrales ocurren en forma de ondas y en número de 2-3 (vaca), 3-4 (oveja), 4-5 (cabra) y 1-2 (yegua) ondas por ciclo (Driancourt, 2001; Fortune *et al.*, 2001).

Al inicio de la madurez sexual una señal hormonal selecciona un grupo de folículos en crecimiento. En este proceso intervienen las hormonas FSH, LH y los estrógenos. La FSH estimula el crecimiento de los folículos mediante la proliferación de las células foliculares. Cuando los folículos alcanzan los 4 mm en oveja, 5-6 mm en cerda, 8 mm en vacas o 2-5 mm en las yeguas, comienzan a desarrollar receptores de LH en las células de la granulosa y reciben el nombre de dominantes (Driancourt, 2001), también conocidos como preovulatorios o folículo de Graaf. En ovejas el folículo dominante destinado a ovular alcanza un diámetro de 5-6 mm (Uribe *et al.*, 2009). Estos folículos crecen rápidamente y se vuelven más grandes que el resto, suprimiendo el crecimiento e impidiendo el reclutamiento de nuevos folículos. Dentro de los folículos dominantes, el ovocito se encuentra rodeado por células de la granulosa conocidas como células del cúmulo, que en conjunto forman el complejo cúmulo-ovocito (COC). Este complejo se encuentra dentro del líquido folicular y está en contacto con las células de la granulosa murales que rodean el antro folicular. Cuando se forma el antro, el ovocito finaliza su crecimiento y está en condiciones de reanudar la meiosis (Driancourt, 2001).

1.3 MADURACIÓN DEL OVOCITO

La maduración del ovocito es un proceso complejo durante el cual, el ovocito sufre una serie de transformaciones estructurales y bioquímicas que provocan que el gameto sea apto para

ser fecundado y alcanzar un desarrollo óptimo. Estos cambios ocurren principalmente en el núcleo y en el citoplasma, cambios que en conjunto son llamados maduración nuclear y maduración citoplasmática, respectivamente. La maduración del ovocito inicia con el aumento preovulatorio en los niveles de gonadotropinas, en especial de LH (Moor *et al.*, 1990).

La maduración nuclear está relacionada con la adquisición del potencial meiótico, que describe la capacidad del ovocito para reiniciar la meiosis y alcanzar la MII. Esta característica se adquiere durante la foliculogénesis y coincide con la formación del antro. La maduración citoplasmática está relacionada con el potencial de desarrollo, que se refiere a la adquisición de la capacidad del ovocito para ser fecundado y desarrollarse en un embrión sano capaz de continuar su desarrollo. La maduración citoplasmática se adquiere después de que el ovocito es meioticamente competente e involucra una acumulación factores de transcripción y un redistribución de los organelos dentro del ovocito (Sánchez y Smitz, 2012).

1.3.1 MADURACIÓN NUCLEAR

La maduración nuclear del ovocito comprende una serie de procesos por los cuales el ovocito que se encuentra en la profase I de la primera división meiótica, continúa hasta la metafase II y finaliza con la extrusión del primer cuerpo polar. La maduración nuclear inicia con la reanudación de la meiosis, el rompimiento de la vesícula germinal (proceso que conlleva la disolución de la membrana nuclear), la formación del huso mitótico y la condensación de la cromatina en cromosomas homólogos que se alinean en el huso, alcanzando entonces el estadio de metafase I, continuando posteriormente con la segregación de los dos grupos de cromosomas homólogos, dando lugar a la extrusión del

primer cuerpo polar y al paso del estadio de MII. Tras el cual la meiosis se detiene nuevamente y se reiniciará en caso de que el ovocito sea fecundado por un espermatozoide (Sánchez y Smitz, 2012).

La característica más distintiva de la maduración nuclear es la extrusión del primer cuerpo polar, indicando que el ovocito se encuentra en MII. El tiempo en que el ovocito alcanza esta fase es distinto entre especies: en ovinos la maduración nuclear ocurre a las 18-24 h (Máximo *et al.*, 2012), en bovinos ocurre a las 24 h (Vajta *et al.*, 1996), en caprinos a las 27 h (Pereira *et al.*, 2003) y en porcinos a las 44 h (Yuan *et al.*, 2012).

1.3.2 MADURACIÓN CITOPLASMÁTICA

La maduración citoplasmática se caracteriza por una serie de cambios ultraestructurales dentro del ovocito desde vesícula germinal hasta la etapa de MII y la adquisición del potencial de desarrollo, que le brinda al ovocito la capacidad de ser fertilizado y alcanzar el desarrollo embrionario (Sánchez y Smitz, 2012). Durante este proceso se adquieren las condiciones que permiten al ovocito bloquear la polispermia, descondensar el núcleo del espermatozoide y la formación del pronúcleo masculino luego de la fecundación. La maduración citoplasmática se caracteriza principalmente por la redistribución de los organelos celulares, las mitocondrias migran hacia una posición perinuclear mientras que los gránulos corticales se desplazan hacia la periferia y se sitúan debajo de la membrana plasmática para evitar la polispermia (Ferreira *et al.*, 2009). La maduración citoplasmática implica una reprogramación de la síntesis proteica. Parte del ARNm que había sido almacenado durante la fase de crecimiento del ovocito comienza a transcribirse, sintetizando

nuevas proteínas esenciales para la progresión de la meiosis, la regulación de la polisperma y la descondensación del núcleo del espermatozoide (Moor *et al.*, 1990).

La maduración citoplasmática puede evaluarse indirectamente por la capacidad del ovocito de experimentar la fertilización, la segmentación y el desarrollo a blastocisto. También puede ser evaluada, por parámetros morfológicos como la expansión del cúmulo y un aumento en el espacio perivitelino (Kruip *et al.*, 1982). Otros parámetros, son la capacidad de formación del pronúcleo masculino, la exocitosis del contenido de los gránulos corticales al espacio perivitelino y el contenido intracelular de glutatión. (Abeydeera *et al.*, 1998).

1.4 CÉLULAS DE LA GRANULOSA

Las células de la granulosa son células de tipo epitelial esenciales para el crecimiento y la sobrevivencia del ovocito. Están especializadas en subpoblaciones que consisten en células de la corona radiada, células del cúmulo, pared y células de la granulosa. Las células de la granulosa cercanas a la membrana basal son conocidas como células de la pared granulosa, y las que están cercanas al antro folicular son conocidas como células de la granulosa antral. Las células del cúmulo son la subpoblación de células de la granulosa del ovario que circundan al ovocito formando una matriz extracelular. El mayor componente de esta matriz es el ácido hialurónico (Florman y Ducibella, 2006). Las células del cúmulo que se encuentran en contacto estrecho con el ovocito son conocidas como corona radiada. Estas células se conectan con el ovocito a través de extensiones citoplasmáticas que atraviesan a la zona pelúcida. La corona radiada comunica al ovocito con otras células del cúmulo a través de uniones Gap formando un sincitio electrofisiológico (De Loss *et al.*, 1991).

Las células del cúmulo alimentan el ovocito y participan en la formación de la zona pelúcida, también han sido implicadas en la modulación o generación de inhibidores de la maduración del ovocito (Eppig y Downs, 1984). La comunicación entre las células del cúmulo y el ovocito es fundamental durante la maduración, por la generación de una señal positiva de las células del cúmulo en respuesta a los factores producidos por el ovocito para estimular la ruptura de la vesícula germinal y completar la maduración nuclear del ovocito (Shirazi *et al.*, 2007).

1.5 ZONA PELÚCIDA

La zona pelúcida (ZP) es una matriz extracelular que rodea al ovocito y al embrión, y presenta diversas funciones durante la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Sinowatz *et al.*, 2001). Está compuesta de tres a cuatro glicoproteínas: ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 (Florman y Dicubella, 2006). El origen de las glicoproteínas de la ZP no es claro, sin embargo, se han propuesto tres teorías que sugieren que la ZP es sintetizada: (1) solo por el ovocito, (2) solo por las células foliculares o (3) en conjunto por el ovocito y las células foliculares (Sinowatz *et al.*, 2001). Las glicoproteínas presentan modificaciones post-traduccionales por glicosilación de aminoácidos serina/treonina (en las uniones-O) y asparagina (en las uniones-N) que forman una red que rodea al ovocito (Florman y Dicubella, 2006). Las glicoproteínas son conservadas evolutivamente, pero su organización entre especies es diferente, lo cual les confiere la especificidad de reconocimiento con el espermatozoide. Las funciones principales de la ZP son: regular la unión de los espermatozoides con el ovocito, inducir la reacción acrosomal, evitar la polispermia, contener los blastómeros del embrión y asegurar la integridad de los embriones durante su paso por tracto reproductivo de la hembra (Wassarman, 2008).

1.6 DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO

La primera fase del desarrollo embrionario o embriogénesis es la segmentación, ésta ocurre desde la etapa de cigoto hasta el estadio de blastocisto. El desarrollo del embrión se lleva a cabo en el oviducto y el útero, donde está en contacto con el fluido oviductal y uterino, fundamental para el inicio del desarrollo. Este fluido está compuesto por trasudaciones de iones y moléculas provenientes del suero y las secreciones de las células del epitelio del oviducto (Senger, 2003). En el ovino, los embriones están bañados en este fluido durante los tres días siguientes a la fertilización, momento en el que se llevan a cabo las tres primeras divisiones mitóticas para formar embriones de 2, 4 y 8 blastómeros, a las 24 h, 1.3 días y 2.5 días, respectivamente (Forcada *et al.*, 2009). El desarrollo del embrión depende de la capacidad que tenga de iniciar y regular la expresión genética. En ovinos la transcripción del genoma embrionario inicia durante el desarrollo de los embriones de 8 a 16 blastómeros (Beaujean *et al.*, 2004). Este periodo está regulado por cambios en la composición del fluido oviductal inducidos por estímulos endocrinos y señales autocrinas y paracrinas (Walker *et al.*, 1996).

Los blastómeros en embriones de 2, 4 y 8 células son totipotenciales, ya que cada uno de ellos presenta la capacidad para originar un embrión completo (Wu *et al.*, 2013). Cuando el embrión presenta 16 blastómeros, éstos se diferencian conforme a su posición y dejan de ser totipotenciales (Sudheer y Adjaye, 2007). Los procesos de polarización y aplastamiento de los blastómeros, se conocen como compactación e incluye eventos celulares como el desarrollo de células adherentes dependientes de calcio, la generación de uniones comunicantes y la aparición de uniones estrechas focales que dividen a la membrana plasmática de los blastómeros en regiones apicales y basolaterales (Watson y Barcroft, 2001).

En ovinos, la transición de los estadios de mórula a blastocisto es un proceso que ocurre dentro del útero a los 3 a 5 y 6 a 7 días (respectivamente) después de la fertilización (Forcada *et al.*, 2009). Durante este proceso se forman dos tipos de grupos celulares, las células del trofoblasto y las células de la masa celular interna. Las células del trofoblasto se posicionan en la periferia de la mórula donde forman entre ellas uniones estrechas. Las células de la masa celular interna se posicionan en el centro al mórula para formar uniones estrechas (Watson y Barcroft, 2001). Las células del trofoblasto dan origen a la placenta y las células de la masa celular interna dan origen al embrión (Schrode *et al.*, 2013). El trofoblasto tiene la capacidad de iniciar y regular los eventos que facilitan el transporte y retención de líquido que se acumula en la cavidad del blastocisto, para la formación del blastocele (Watson y Barcroft, 2001). Los mecanismos para la formación del blastocele son determinados por sistemas de transporte iónico. La bomba de sodio y potasio es importante para la formación del blastocisto debido a su presencia en las regiones basolaterales de las células del trofoblasto, esta bomba mantiene un gradiente iónico que promueve una acumulación osmótica de agua (Watson *et al.*, 2004).

1.7 EL RESVERATROL

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) es un polifenol natural con estructura de estilbeno, formado por dos anillos fenólicos unidos por un doble enlace estireno. Su fórmula molecular es $C_{14}H_{12}O_3$, su peso molecular es 228.25 g/mol y su punto de fusión es de 253-255°C. Es poco soluble en agua, así que para aumentar su solubilidad se puede utilizar el etanol o solventes orgánicos como el DMSO (Dimetil sulfóxido). Debido a la presencia del doble enlace estireno, el resveratrol presenta dos formas isoméricas: el *trans* resveratrol y el *cis*

resveratrol (Fig. 1). De manera natural la forma más abundante y estable es el isómero *trans*. La *cis* isomerización puede ocurrir cuando la isoforma *trans* es expuesta a la luz solar, artificial o a la radiación UV. Según estudios realizados ambos isómeros presentan efectos biológicos distintos (Gambini *et al.*, 2013; Orallo, 2006).

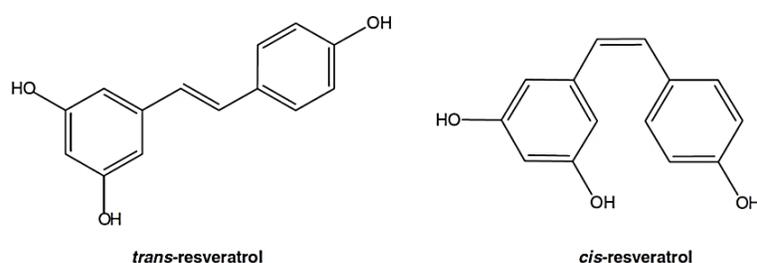


Figura 1. Estructura química del *trans*-resveratrol y el *cis*-resveratrol (Gambini *et al.*, 2013).

El resveratrol fue aislado por primera vez en 1940 por Takaoka a partir de la raíz de la planta *Veratrum grandiflorum* (Ballestera blanca), posteriormente en 1960 fue aislado de *Polygonum cuspidatum* (Centinodia de Japón). Actualmente se sabe que es producido por más de 70 especies de plantas en respuesta a situaciones de estrés (radiación ultravioleta, infecciones fúngicas y bacterianas, etc.) y está presente en varios frutos como las uvas (*Vitis vinífera*), los arándanos (*Vaccinium sp.*), la grosella (*Vaccinium sp.*), las moras (*Morus sp.*) y los cacahuates (*Arachis hypogaea*) (Gambini *et al.*, 2013).

Un alimento rico en resveratrol es el vino tinto. El contenido de resveratrol del vino procede de las uvas, en particular de su piel, semillas, peciolas y partes leñosas, que son las más ricas en este compuesto (Siemann y Creasy, 1992). Por este motivo, el vino tinto es más rico en resveratrol que el vino blanco, ya que durante la obtención del tinto se maceran las partes de la uva en las que se encuentra el resveratrol, a diferencia de la obtención del blanco, en la que se desechan dichas partes (Soleas *et al.*, 1997).

1.7.1 BIOSÍNTESIS Y METABOLISMO DEL RESVERATROL

La síntesis del *trans*-resveratrol inicia con la biotransformación de la fenilalanina y tiene lugar mediante la condensación de una molécula de cumaril-CoA con 3 de malonil-CoA (Fig. 2). Esta reacción está catalizada por la resveratrol sintetasa, una enzima que pertenece a la familia de las estilbeno sintetasa (Jeandet *et al.*, 2002). Esta familia de enzimas es codificada por genes que son sensibles a señales externas, incluyendo estrés abiótico o señales bióticas originadas por células fúngicas (Gambini *et al.*, 2013).

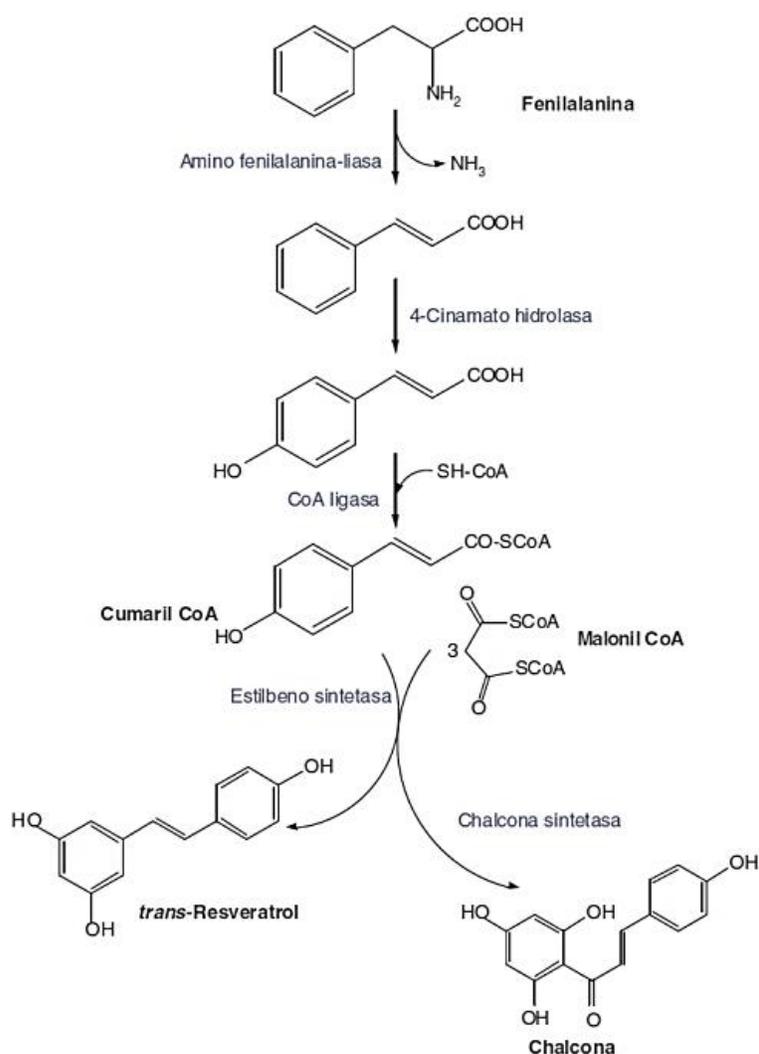


Figura 2. Esquema de la biosíntesis del resveratrol (Gambini *et al.*, 2013).

Debido a la propiedad que presenta el resveratrol de emitir fluorescencia, es posible estudiar la capacidad que tiene de alcanzar las células y penetrar dentro de ellas. Para ello, se han utilizado técnicas como la microscopía por epifluorescencia, citometría de flujo y espectrofluorimetría, las cuales ayudan a estudiar su distribución (Gambini *et al.*, 2013).

A nivel intestinal, el resveratrol se absorbe por difusión pasiva o formando complejos con transportadores de membranas, como las integrinas. Una vez en la sangre, el resveratrol se encuentra básicamente en tres formas distintas: como glucurónido, sulfatado y libre. La forma libre puede ser transportada unida a la albúmina y a lipoproteínas como las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Estos complejos a su vez, pueden ser disociados en membranas celulares que dispongan de receptores para la albúmina y LDL, dejando libre el resveratrol y permitiendo que penetre en las células (Gambini *et al.*, 2013).

La absorción del resveratrol en las células, también puede estar mediada por la capacidad que presenta el resveratrol para unirse a receptores de estradiol alfa y beta, actuando como agonista o antagonista dependiendo de su concentración (Bowers *et al.*, 2000). Los estudios moleculares han demostrado que la dinámica de unión del resveratrol al receptor alfa es estereoselectiva, con un enlace más débil con la forma *cis* en comparación con el isómero *trans* (Abou-Zeid *et al.*, 2004).

El resveratrol, al igual que otros polifenoles, puede sufrir un proceso de autooxidación, lo que conlleva a la producción de O_2^- y H_2O_2 y una mezcla compleja de semiquinonas y quinonas que pueden llegar a ser citotóxicas. La molécula de resveratrol oxidado puede generar complejos con el cobre capaces de fragmentar el ADN (Hadi *et al.*, 2010).

1.8 EFECTOS BIOLÓGICOS DEL RESVERATROL

Los efectos del resveratrol comenzaron a ser estudiados a partir del hecho nutricional llamado “Paradoja francesa”, debido a que los franceses son los europeos que consumen más grasas saturadas, y sin embargo, presentan menor riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares que otros europeos, como los ingleses, quienes igual que los franceses consumen una dieta rica en grasas saturadas. Estudios realizados muestran una correlación entre un consumo moderado de vino con una menor mortalidad por enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, un consumo elevado de vino, debido a su contenido de alcohol, puede llegar a provocar infartos, cardiomiopatía, arritmias, hipertensión, shock hemorrágico y muerte súbita, lo que confirma que el abuso en el consumo puede ser perjudicial para el sistema cardiovascular (Catalgol *et al.*, 2012).

Diversas investigaciones han mostrado que el resveratrol presenta actividad como anticancerígeno, antiagregante plaquetario, antiinflamatorio y antialérgico. Sin embargo, estas propiedades se presentan solo en estudios *in vitro* (Gambini *et al.*, 2013). Sin bien, estos estudios han demostrado una alta eficiencia a nivel celular, su distribución en los tejidos es muy baja y por lo tanto, podría no tener las propiedades descritas, debido a la biodisponibilidad que presenta. Tras un consumo oral se ha comprobado que su absorción es buena, pero las vías metabólicas dejan solo una pequeña fracción de resveratrol libre en sangre, por lo que la disponibilidad en los tejidos blanco es baja y ya que las concentraciones eficaces son muy altas, no se alcanzan las concentraciones empleadas en los estudios *in vitro* (Gambini *et al.*, 2013).

Aunque hay discrepancias en los resultados de estudios realizados *in vitro* e *in vivo*, es difícil no destacar que los resultados *in vitro* muestran numerosos efectos a nivel celular que

pueden ser benéficos para la salud. Por ejemplo, se ha reportado que el resveratrol presenta un efecto claro en la proliferación celular, la cual se inhibe a concentraciones altas (10-30 μM) provocando que se bloquee la fase G/S2 del ciclo celular. Estos estudios al realizarse en una línea celular de cáncer de próstata, mostraron que en este tipo celular el resveratrol tiene un claro efecto antitumoral (Hsieh *et al.*, 1999). Resultados similares fueron reportados por Kim *et al.* (2004) al demostrar que el resveratrol inhibe la proliferación celular e induce apoptosis en células cancerígenas.

A pesar de los resultados contradictorios, el resveratrol presenta varios efectos favorables a nivel celular que deben ser tomados en cuenta, entre ellos destacan su actividad antioxidante, la capacidad de activar la sirtuina 1 (SIRT1) y la de mimetizar los efectos de la restricción calórica (Palacios *et al.*, 2010).

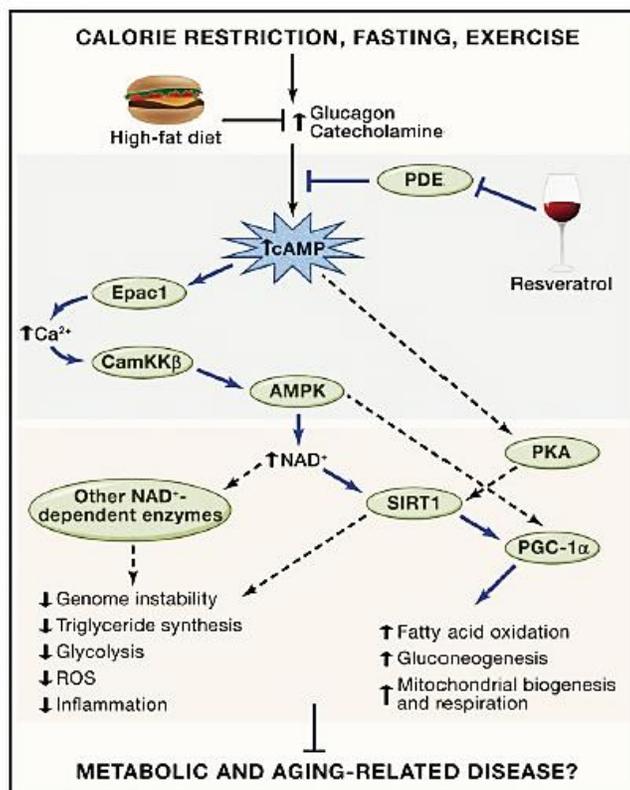


Figura 3. Modelo de como el resveratrol mimetiza los efectos de la restricción calórica (Tennen *et al.*, 2012).

El resveratrol mimetiza los efectos de la restricción calórica, debido a que es capaz de inhibir la actividad de las fosfodiesterasas, aumentando los niveles de AMPc, que activan a Epac1, resultando en la liberación de Ca^{++} intracelular y la activación de AMPK, la cual de forma natural se activa por la restricción calórica. La AMPK aumenta los niveles de NAD^+ que activan a SIRT1 y a PGC-1 α (Fig. 3). Lo que se traduce en un aumento en la oxidación de ácidos grasos, la gluconeogénesis y la biogénesis mitocondrial (Tennen *et al.*, 2012).

1.8.1 EL RESVERATROL COMO ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante del resveratrol se debe a su estructura molecular, la cual presenta un grupo hidroxilo (OH) en el anillo A y un sistema de doble enlace conjugado que provoca una deslocalización electrónica (Fig. 4). La presencia del grupo OH le brinda al resveratrol la capacidad de transferir un electrón o un átomo de hidrógeno, estabilizando así a los átomos o moléculas con electrones desapareados. Estas características provocan que el resveratrol sea un eficiente “*scavenger*” (atrapador de iones) eliminando radicales libres y especies reactivas de oxígeno, como el radical superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (HO^-), el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) y el óxido nítrico (NO) (Hussein, 2011).

Además de su estructura molecular, la capacidad antioxidante del resveratrol puede deberse, en parte, a su capacidad de regular la expresión de enzimas antioxidantes como SOD (Superóxido dismutasa) y la glutatión peroxidasa (Liu *et al.*, 2012). El tratamiento con resveratrol también aumenta la expresión y la translocación nuclear del gen FOXO3a, los genes FOXO son la primera defensa frente al estrés oxidativo (Wu *et al.*, 2013).

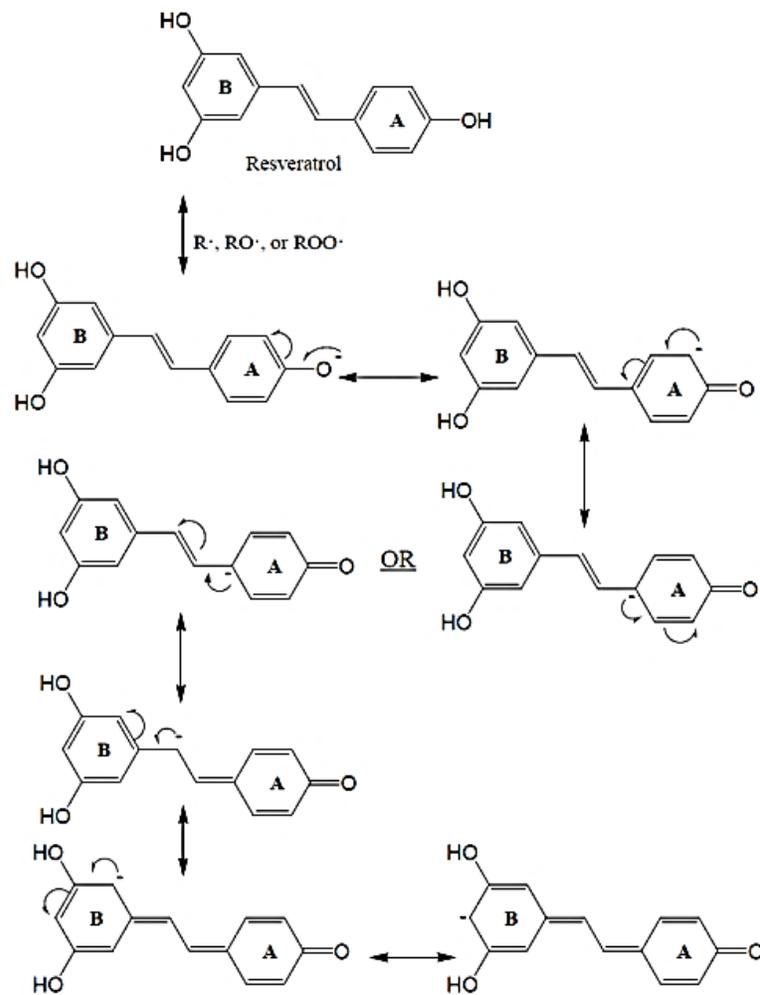


Figura 4. Mecanismo de la actividad antioxidante del resveratrol (Hussein, 2011).

1.8.2 EL RESVERATROL COMO ACTIVADOR DE LA SIRTUINA 1

El resveratrol ha mostrado un aumento de la vida media de levaduras, moscas y peces, sin embargo estos resultados no se han repetido al realizar estudios en roedores (Agarwal *et al.*, 2011). El aumento en la vida media de estos organismos, podría estar mediado por la capacidad que tiene el resveratrol para regular la actividad de la SIRT1, enzima que está

relacionada con la restricción calórica y la longevidad. La SIRT1 puede translocarse del citoplasma al núcleo, donde desacetila histonas en residuos específicos y contribuye al mantenimiento de los telómeros. Lo cual podría explicar, en parte, el aumento en la longevidad de estos organismos (Palacios *et al.*, 2010).

La SIRT1 corresponde a una familia de enzimas con actividad desacetilasa dependientes de la NAD⁺ (Nicotinamida adenina dinucleótido), las cuales han mostrado un efecto antienvjecimiento en la homeostasis celular que está involucrado con la viabilidad celular y el metabolismo energético. También se ha demostrado que la SIRT1 participa en la regulación de la biogénesis mitocondrial, incluyendo la generación de ATP (Adenosin trifosfato) y en la regulación de la AMPK (Protein cinasa activada por AMP), la cual incrementa la β -oxidación y por tanto, el consumo de ácidos grasos (Itami *et al.*, 2015).

El mecanismo de la SIRT1 consiste en la capacidad que tiene de modificar covalentemente mediante la desacetilación a las histonas que envuelven al ADN. La actividad de esta enzima podría modificar la transcripción de determinados genes y, además, podría activar o inhibir enzimas mediante desacetilaciones (Gambini *et al.*, 2013).

1.8.3 EL RESVERATROL COMO FITOESTRÓGENO

La estructura química del *trans*-resveratrol presenta bastantes similitudes con el estradiol (Fig. 5), razón por la cual se han realizado estudios con la finalidad de probar su capacidad para actuar como un fitoestrógeno.

Los estrógenos y también los fitoestrógenos, actúan mediante los receptores de estrógenos. La unión del estrógeno con estos receptores activa la transcripción de los genes que regula,

por lo tanto podrían activar genes beneficiosos para la longevidad como los genes antioxidantes. Se ha determinado que el resveratrol se puede unir a los receptores de estrógenos y, por lo tanto, activar la transcripción de tales genes a concentraciones comparables a aquellas que se requieren para sus otros efectos biológicos (Gambini *et al.*, 2013).

Gehm *et al.* (1997) demostraron que el resveratrol se comporta de forma análoga al estradiol, ellos evaluaron los efectos de estas dos moléculas en células tumorales de glándula mamaria humana, ricas en receptores estrogénicos, concluyendo que el resveratrol actuaba como superagonista, es decir, que produce una mayor respuesta en la transcripción que el estradiol. Sin embargo, estos mismos autores indicaron que este efecto no se presentaba en otros tipos celulares. Turner *et al.* (1999) al estudiar la actividad estrogénica del resveratrol, mostraron que no posee efecto alguno sobre el crecimiento y diferenciación en el útero de ratas en crecimiento. Así mismo, no se detectaron efectos en el hueso, en los niveles de colesterol plasmático, ni en el peso del animal. Con base en sus resultados, los autores concluyeron que el resveratrol no actúa como agonista en roedores.

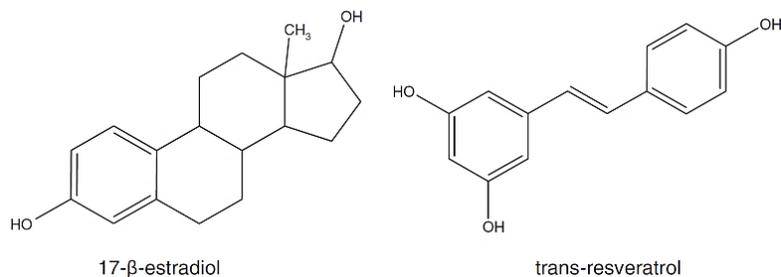


Figura 5. Comparación de las estructuras químicas del *trans*-resveratrol con el 17-β-estradiol (Gambini *et al.*, 2013).

2. ANTECEDENTES

2.1 OBTENCIÓN DE EMBRIONES POR TRANSFERENCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS (TNCS)

La TNCS se realiza principalmente mediante dos metodologías, una conocida como clonación tradicional (CT) y otra como clonación manual o *handmade cloning* (HMC). Aunque ambas metodologías tienen el mismo objetivo, los procedimientos que utilizan para alcanzarlo son distintos. La CT se basa en el uso de micromanipuladores, los cuales son utilizados para enuclear los ovocitos receptores de núcleos y posteriormente unirlos a la célula somática, ya sea por fusión eléctrica o directamente introduciéndola en el interior del ovocito enucleado (Verma *et al.*, 2015). La clonación manual se caracteriza por la no utilización de micromanipuladores, además de que los ovocitos utilizados en esta metodología no presentan la zona pelúcida y son enucleados manualmente con una micronavaja (Vajta *et al.*, 2001).

Estas metodologías pueden dividirse en dos procesos fundamentales: el primero es la preparación de la célula donadora de núcleo (carioplasto) y el segundo es la preparación del ovocito receptor de núcleo (citoplasto), el cual es enucleado y posteriormente fusionado con el carioplasto.

2.1.1 CÉLULAS DONADORAS DE NÚCLEO (CARIOPLASTOS)

El carioplasto es la célula somática que aporta el total del material genético necesario para el desarrollo del individuo clonado. Entre los tipos celulares utilizados como donadores de núcleo se han usado: células embrionarias (Peura *et al.*, 1998), células del cúmulo (Vajta *et*

al., 2001 y 2003), fibroblastos fetales (Regio *et al.*, 2001; Vajta *et al.*, 2003; Meena *et al.*, 2006; Akshey *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009), fibroblastos de individuos adultos (Beyhan *et al.*, 2002; Elsheikh *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2009; Dutta *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2014; Saini *et al.*, 2015;), tejido adiposo (Malik *et al.*, 2014) y células troncales embrionales (Mohapatra *et al.*, 2015). Aunque son varios los tipos celulares que pueden ser utilizados como donadores de núcleo, Saini *et al.* (2015) indican que los fibroblastos son las células más adecuadas para lograr óptimos resultados en la TNCS, debido a la facilidad con que pueden ser reprogramadas.

Un factor importante para lograr la clonación por TNCS, es la sincronía entre los ciclos celulares de la célula donadora de núcleo y el citoplasto receptor (Campbell *et al.*, 1996). Por lo tanto, es común que se utilicen como donadoras de núcleo, células que se encuentren en fase de quiescencia G0 o arrestadas en G1 del ciclo celular (Gibbons *et al.*, 2002), ya que si se utilizan células en otras fases celulares, generalmente el desarrollo embrionario se reduce, debido a que si las células se encuentran en la fase S puede ocurrir una condensación prematura de los cromosomas, o aneuploidias si están en las fases G2/M (Campbell *et al.*, 1996). Para sincronizar las fases celulares de las células donadoras de núcleo en G0/G1 se han utilizado diversos procedimientos, como la supresión de suero, la inhibición por contacto mediante confluencia celular y el uso de agentes químicos como cicloheximida, dimetilsulfóxido y roscovitina. De entre estos procedimientos, la inhibición por contacto, la cual se alcanza cuando las células se encuentran 100% confluentes, ha mostrado la mayor proporción de células en fase G0/G1 (Sun *et al.*, 2008).

El número de pasaje celular es un factor ampliamente estudiado en el desarrollo de embriones por TNCS. Kubota *et al.* (2000) reportaron que al cultivar los fibroblastos de bovino adulto a largo plazo (pasajes 10-15) se obtuvieron mayores tasas de desarrollo

embrionario que en un cultivo a corto plazo (pasaje 5). Roh *et al.* (2000) trabajando con fibroblastos fetales de bovino, reportan que en pasajes del 8-16 se observó un mayor desarrollo embrionario en comparación con los fibroblastos de pasajes 17-32. Trabajando con fibroblastos fetales de porcino, Zhang *et al.* (2009) concluyen que las mayores tasas de formación de blastocistos provenían de los pasajes 3-6, en comparación con los de los pasajes 7-10. Finalmente, Wells *et al.* (1999) no encontraron diferencia significativa en el desarrollo embrionario con células provenientes de los pasajes 3 y 8. De acuerdo a los estudios previos, no se puede afirmar que un número de pasaje celular sea mejor respecto a otro, debido a que los resultados son controversiales.

También se ha estudiado el efecto de la edad del individuo de quien provienen los fibroblastos en la TNCS. Al respecto, Jena *et al.* (2012) no encontraron diferencia significativa en la tasa de formación de blastocistos entre fibroblastos fetales y adultos de caprinos. Los mismos resultados fueron reportados por Hill *et al.* (2000), al comparar fibroblastos fetales y adultos en bovino. Kato *et al.* (2000) también reportaron que no había diferencia significativa en el desarrollo embrionario al utilizar diferentes tipos celulares provenientes de bovinos adultos, recién nacidos y fetales, incluso tampoco encontraron diferencia significativa entre machos y hembras. De igual forma Hosseini *et al.* (2008) al trabajar con fibroblastos de ovinos adultos de macho y hembra, no encontraron diferencia significativa en el desarrollo de los embriones. De acuerdo a los resultados de los estudios anteriores se puede concluir que la edad y el sexo del individuo de quien provienen las células donadoras de núcleo, no influyen en el desarrollo de los embriones clonados.

2.1.2 OBTENCIÓN DE OVOCITOS

Los ovocitos que serán utilizados como células receptoras de núcleo, pueden ser obtenidos a partir de animales vivos o de animales sacrificados. A partir de animales vivos pueden obtenerse por laparoscopia y recuperación transvaginal, también conocida como OPU (Ovum pick up) o a partir de animales muertos provenientes de rastros o plantas procesadoras de carne (Pereira *et al.*, 2013).

En animales vivos, los ovocitos se pueden obtener por laparoscopia, técnica que ha mostrado buenos resultados, sin embargo, presenta varios inconvenientes, ya que se requiere el uso de anestesia, la presencia de un médico cirujano veterinario e instalaciones y equipos adecuados para la realización de una cirugía. También en animales vivos se utiliza la OPU, desarrollada con el fin de recolectar los ovocitos de una manera menos traumática, ya que es menos invasiva y puede ser realizada en cualquier momento del ciclo estral, incluso en estados de gestación temprana (Bols, 1997).

Otra opción para obtener ovocitos, es a partir de individuos muertos, en este caso, se realiza mediante punción folicular de ovarios obtenidos de animales sacrificados en rastros o plantas procesadoras de carne, estos ovocitos son una buena opción cuando no se requiere el uso de animales con una genética particular. Sin embargo, los animales obtenidos de esta fuente generalmente son extremadamente heterogéneos, en términos de calidad (Díaz *et al.*, 2013).

2.1.3 MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS

Para alcanzar la maduración del ovocito es necesario considerar las condiciones de maduración, así como los medios de cultivo y sus suplementos. Existen diversos medios de cultivo que pueden ser utilizados en la MIV de ovocitos, sin embargo, el medio más utilizado es el medio de cultivo de tejidos 199 (TCM-199) (Camargo *et al.*, 2006). Este medio generalmente es suplementado con las hormonas gonadotropinas hipofisarias LH, FSH o la combinación de ambas (Choi *et al.*, 2001). También se han utilizado, la gonadotropina menopáusica humana, la gonadotropina de yegua preñada y la gonadotropina coriónica humana (Wani, 2002).

El suero fetal bovino (SFB) ha mostrado ser un componente básico en la maduración del ovocito y la expansión de las células del cúmulo, esto es de gran importancia, debido a que estas células tienen un papel significativo en los mecanismos de maduración del ovocito (Krisher, 2004; Wani, 2002). Otros componentes importantes, son los factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el cual ha demostrado que aumenta el porcentaje de embriones en etapa de blastocisto en ovinos (Grazul-Bilska *et al.* 2000).

Las condiciones ambientales también son importantes para alcanzar la maduración del ovocito. La MIV generalmente se realiza en una incubadora que mantenga una atmósfera y temperatura constantes, a 39°C con 5% de CO₂, 95% de aire y humedad a saturación (Zhu *et al.*, 2007).

2.1.4 DENUDACIÓN Y ENUCLEACIÓN DE OVOCITOS

Una de las características particulares de la clonación manual, es que para enuclear los ovocitos es necesario retirar las células del cúmulo y la zona pelúcida, dichos procesos en este trabajo son considerados como denudación. Las células del cúmulo pueden ser retiradas por pipeteo o agitación en vortex (Taylor-Robinson *et al.*, 2014a) o mediante un tratamiento con hialuronidasa (Vajta *et al.*, 2003). La zona pelúcida se puede retirar utilizando proteasa o pronasa (Vajta *et al.*, 2004).

La enucleación tiene como objetivo retirar el material genético del ovocito receptor. De manera tradicional los ovocitos con zona pelúcida, se enuclean por micromanipulación utilizando pipetas, con las cuales se perfora la zona pelúcida y posteriormente se aspira el corpúsculo polar y el citoplasma adyacente. En este tipo de enucleación los ovocitos deben ser teñidos para poder visualizar el material genético, esto se logra exponiendo al ovocito a intercalantes de ADN fluorescentes como el Hoechst y posteriormente a luz ultravioleta (UV) (Critser *et al.*, 1986). Sin embargo, la exposición a luz UV puede generar cambios estructurales y funcionales en la célula y sus organelos, debido a sus efectos ionizantes sobre macromoléculas como el ADN, la membrana lipídica y las proteínas (Smith, 1993). Además, aunque en la enucleación se retire el ADN nuclear del ovocito aún persiste el ADN mitocondrial (ADNmt) el cual también puede resultar dañado por la luz UV. Por tal motivo, la viabilidad de los ovocitos y los embriones clonados se ve comprometida (Tsunoda *et al.*, 1998). Debido al daño que puede provocar la luz UV, se han desarrollado alternativas menos invasivas, como la enucleación química, la centrifugación por gradiente de densidades y la enucleación manual (Fulka y Moor, 1993; Tatham *et al.*, 1995 y Vajta *et al.*, 2001).

El primer reporte de enucleación química fue realizado por Fulka y Moor (1993), mediante un tratamiento químico con etopósido, fármaco que inhibe la separación de los cromosomas durante la mitosis y expulsa el total de la cromatina del ovocito al interior del primer cuerpo polar, dejando al ovocito sin material genético (Elsheikh, 2007). Otro reactivo utilizado para enuclear químicamente los ovocitos, es la demecolcina (Tani *et al.*, 2006), debido a su capacidad de inhibir los microtúbulos durante la mitosis e inducir la formación de una protrusión visible que contiene al pronúcleo del ovocito y puede ser fácilmente removida sin necesidad de exponerlos a luz UV. Este tipo de enucleación ha mostrado tasas de desarrollo similares a las obtenidas con ovocitos expuestos a luz UV, pero sin el daño que ésta pueda causar en ellos (Moro *et al.*, 2010).

Vajta *et al.* (2001) desarrollaron una técnica de enucleación mecánica, la cual se realizó manualmente con ayuda de micronevajas. La técnica desarrollada por Vajta *et al.* (2001) en combinación con un tratamiento con demecolcina, ha mostrado ser más eficaz para remover el material genético de los ovocitos, ya que mediante un “corte transversal” es posible retirar el corpúsculo polar y la región del ovocito donde se localiza la placa metafásica. Entonces, la fracción de los ovocitos que presentaban el primer corpúsculo polar se desecha y solo se mantiene la fracción restante, obteniendo así un ovocito sin material genético (Vajta *et al.*, 2006). Hosseini *et al.* (2013) desarrollaron una versión modificada de la enucleación manual, en la cual en lugar de utilizar micronevajas para enuclear los ovocitos, usaron una pipeta Pasteur elongada, acoplada a una manguera y manipulada mediante pipeteo con la boca. Ellos demostraron que esta forma de enucleación alternativa mostraba la misma tasa de eficiencia que la enucleación manual con micronevajas.

2.1.5 FUSIÓN CELULAR

En la TNCS, la fusión celular tiene como objetivo transferir el material genético de la célula donante (carioplasto) al interior del ovocito enucleado (citoplasto) (Elsheikh, 2007). En la CT, esto se realiza introduciendo el carioplasto en el espacio perivitelino del ovocito enucleado, seguido de la fusión de ambas células o bien, por inyección directa en el citoplasma. La fusión celular se realiza aplicando pulsos eléctricos, los cuales inducen la formación de poros en la membrana celular. La velocidad de cierre de los poros depende de la temperatura, siendo mayor a temperaturas cercanas a las fisiológicas en la que se asegura mayor fluidez de los lípidos y proteínas de la membrana. La eficiencia de la fusión depende de los parámetros de fusión como son: dirección de corriente, duración del pulso, número de pulsos, amplitud de pulsos y el medio de fusión (Zakhartchenko *et al.*, 1999).

En la CT, la zona pelúcida mantiene al carioplasto junto al citoplasto. En el caso de la clonación manual, al no haber zona pelúcida, los citoplastos y la célula donadora son expuestos a fitohemaglutinina (PHA). La PHA es una proteína que presenta la capacidad de aglutinar distintos tipos celulares, por tal motivo se utiliza para mantener unidos al citoplasto con el carioplasto (Du *et al.*, 2006). En ambos casos la fusión celular ha mostrado buenos resultados. Sin embargo, en la clonación manual la eficiencia en la fusión celular es mayor (90%), comparada con el 60-80% obtenido por la técnica de clonación tradicional (Selokar *et al.*, 2012).

Una vez fusionadas las células, se forma un “embrión clonado” que será activado químicamente para fomentar su división y subsecuente desarrollo embrionario.

2.1.6 ACTIVACIÓN DE EMBRIONES CLONADOS

De forma natural, la activación del ovocito inicia con la penetración del espermatozoide durante la fecundación del ovocito detenido en metafase II de la meiosis. El espermatozoide induce oscilaciones de calcio (Ca^{++}) intracelular, las cuales desencadenan la exocitosis de los gránulos corticales ubicados en la periferia del citoplasma del ovocito maduro, el reinicio y la conclusión de la meiosis. La culminación de la meiosis se caracteriza por la extrusión del segundo corpúsculo polar (Zakhartchenko y Alberio, 2001).

En el caso de los embriones clonados, es necesario simular de manera artificial el efecto del espermatozoide en el ovocito para iniciar el desarrollo embrionario (Elsheikh, 2007). En la clonación, la activación se ha realizado mediante pulsos eléctricos (Vajta *et al.*, 2001), etanol (Elsheikh, 1997) y mediante una combinación de ionomicina o ionóforo de calcio seguido de un tratamiento con 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) siendo este último el más aplicado actualmente. La ionomicina y el ionóforo de Ca^{++} , inducen la liberación de Ca^{++} intracelular, provocando que se suprima el factor promotor de la maduración (MPF), posteriormente el 6-DMAP inhibe la MAP cinasa, que promueve la desorganización del huso mitótico de los ovocitos en MII, con lo cual se evita el reinicio del MPF y se reanuda la meiosis (Patel *et al.*, 2014).

Patel *et al.* (2014) al comparar la tasa de activación entre la ionomicina y el ionóforo de Ca^{++} , reportaron una mayor tasa de activación con ionóforo de Ca^{++} (83.5%), respecto a la ionomicina (73%) ambos utilizados a 5 μM por 5 minutos.

2.1.7 CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIONES CLONADOS

Las condiciones de cultivo son uno de los factores más importantes en el desarrollo de los embriones *in vitro*, por lo tanto es necesario utilizar medios y sistemas de cultivo *in vitro* (CIV) que brinden a los embriones los requerimientos necesarios para su óptimo desarrollo.

El medio de CIV de embriones tiene como objetivo simular las condiciones fisicoquímicas del fluido oviductal. Generalmente los embriones se cultivan a 38-39°C con 5% de CO₂ (Díaz *et al.*, 2013). El medio de cultivo más empleado en el desarrollo de embriones clonados, es el fluido oviductal sintético (SOF) el cual se basó originalmente en el análisis bioquímico del fluido oviductal del ovino (Tervit *et al.*, 1972). Este medio y sus diversas modificaciones se ha utilizado en el desarrollo de embriones de bovino (Hall *et al.*, 2006), equinos (Galli *et al.*, 2008; Lagutina *et al.*, 2005), porcinos (Lagutina *et al.*, 2006) y ovinos (Zhang *et al.*, 2013).

Otros medios de CIV que se han utilizado son el medio Research Vitro Cleave (RVCL), el medio modificado por Charles Rosenkrans 2 (mCR2), el SOF modificado (mSOF) y el medio de desarrollo embrionario (EDM) (Shah *et al.*, 2008; Jena *et al.*, 2012).

Shah *et al.* (2008) al cultivar embriones clonados de bovino, observaron que el medio RVCL presentó mayores porcentajes de embriones divididos y blastocistos (82.7 y 40.3%) en comparación con los obtenidos con los medios mSOF (61.3 y 4.6%) y mCR2 (52.0 y 0.0%), respectivamente. Jena *et al.* (2012) compararon los medios de cultivo RVCL, mSOF y EDM en embriones de caprinos obtenidos por HMC a partir de fibroblastos de individuos adultos y fetos. En el caso de los embriones obtenidos a partir de fibroblastos de individuos adultos, no hubo diferencia significativa en los porcentajes de división embrionaria, mórulas y blastocistos entre los medios RVCL (74.0, 33.1 y 14.1%), mSOF (76.2, 26.2 y 9.6%) y EDM (66.0, 20.8 y 9.7%), respectivamente. Al utilizar fibroblastos obtenidos de fetos, se

observaron porcentajes mayores con el medio RVCL (78.6, 39.0 y 15.5%), en comparación con los medios mSOF (72.6, 33.8 y 11.0%) y EDM (74.0, 26.2 y 10.7%), respectivamente, pero sin ser las diferencias significantes. Por lo tanto, sus resultados mostraron que no hubo diferencia significativa en el desarrollo embrionario entre los medios de cultivo evaluados.

Los sistemas de cultivo también son fundamentales para un óptimo desarrollo embrionario. En el caso de los embriones obtenidos por HMC, al no presentar zona pelúcida, están propensos a sufrir daños mecánicos que afecten su desarrollo (Elsheikh *et al.*, 1997). Para evitar este daño, se han propuesto diversos métodos de cultivo, entre estos destaca el sistema de cultivo Well of the Well (WOW), en el cual los embriones son cultivados individualmente dentro de micropozos de aproximadamente 250 µm de profundidad, localizados en el fondo de una caja de cuatro pozos (Vajta *et al.*, 2000).

Shah *et al.* (2008) evaluaron tres métodos de cultivo en embriones bovinos: sistema de cultivo WOW, en microgotas y sobre una superficie plana (en este sistema los embriones solamente se colocaron en el fondo de una caja de cuatro pozos). Sus resultados mostraron un porcentaje mayor de embriones divididos y blastocistos en los embriones cultivados en una superficie plana (82.7 y 40.3%) respecto a los cultivados en el sistema WOW (73.6 y 19.1%) y en microgotas (34.7 y 0.7%), respectivamente.

Jena *et al.* (2012) evaluaron el desarrollo de embriones de caprino en dos sistemas de cultivo: sistema WOW y en una superficie plana. En el sistema WOW los porcentajes de embriones divididos, mórulas y blastocistos fueron de 78.3, 32.9 y 14.0%, y en la superficie plana los porcentajes de desarrollo para los mismos estadios fueron de 73.2, 30.9 y 14.1%, respectivamente. Sus resultados no mostraron una diferencia significativa.

2.1.8 EVALUACIÓN DE EMBRIONES CLONADOS

Normalmente la calidad y etapa de desarrollo embrionarias se evalúan morfológicamente de acuerdo a los parámetros de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS), quienes proponen cuatro parámetros principales para evaluar la calidad de los embriones: simetría de los blastómeros, color del citoplasma, presencia de vesículas y que el desarrollo esté de acuerdo con la edad del embrión. De acuerdo a estos parámetros los embriones se clasifican en: 1-Excelente, 2-Bueno, 3-Regular y 4-No transferible (Stringfellow y Seidel, 1990). Recientemente Bo y Mapletoft (2013) evaluaron morfológicamente a los embriones utilizando como referencia el estadio de desarrollo. Estas clasificaciones se han aplicado eficientemente para evaluar los embriones y así seleccionar a los mejores, antes de congelarlos o transferirlos a hembras receptoras (Bo y Mapletoft, 2013). En el caso de los embriones sin zona pelúcida en etapa de blastocisto, se pueden evaluar siguiendo los mismos parámetros y comparando su tamaño y morfología con los blastocistos con zona pelúcida intacta (Verma *et al.*, 2015).

Aunque un análisis morfológico ha mostrado ser un buen parámetro para evaluar la calidad de los embriones desarrollados *in vitro*, un análisis morfométrico representa un método más objetivo para evaluar las diferentes estructuras de la célula (Pivko *et al.*, 2003). En este caso se han utilizado tinciones intracelulares como la bisbenzimidida y el yoduro de propidio (Hosseini *et al.* 2007).

Debido a la propiedad que tiene la bisbenzimidida de atravesar la membrana celular y su afinidad por los ácidos nucleicos específica para adenina y timina, es posible observar y contar los núcleos de las células teñidas de color azul cuando se observan con un microscopio de epifluorescencia, permitiendo determinar el número de blastómeros de cada

embrión. Por otro lado, el yoduro de propidio es un colorante vital que se utiliza para identificar células muertas. Éste colorante no presenta la capacidad de atravesar la membrana plasmática de las células, sin embargo, cuando la membrana presenta alteraciones como las que ocurren durante necrosis celular o daños severos en la membrana, puede atravesarla y llegar al núcleo donde se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN y emite un color rojo cuando es observado con un microscopio de epifluorescencia (Hosseini *et al.*, 2007). Por lo tanto, con ambas tinciones es posible contar la cantidad total de las células e identificar las células muertas de cada embrión.

2.2 EL RESVERATROL EN LA MIV DE OVOCITOS

El resveratrol al utilizarse durante la MIV de ovocitos ha mostrado diversos efectos, destacando su actividad antioxidante, su capacidad de regular la expresión de genes relacionados con la apoptosis, así como la capacidad de activar la SIRT1 (Kwak *et al.*, 2012; Itami *et al.*, 2015).

Kwak *et al.* (2012) demostraron que a 2 μM de resveratrol durante la MIV de ovocitos porcinos, se obtuvo un porcentaje mayor de maduración nuclear (88.3%) respecto al control (0 μM) donde se obtuvo un 84.1%. También a 2 μM se observó una reducción en las ERO y un aumento en los niveles de GSH, así como una disminución en la expresión de genes relacionados con la apoptosis (*Bax*, *Bak* y *Caspase-3*) en los ovocitos y células del cúmulo. Sin embargo, el tratamiento con 10 μM redujo la tasa de maduración nuclear (75.0%) respecto al control.

Itami *et al.* (2015) estudiaron el efecto del resveratrol durante la MIV de ovocitos porcinos obtenidos de folículos antrales tempranos. Concluyendo que a una concentración de 2 μM el

resveratrol aumenta la función mitocondrial y el contenido de ATP a través de la regulación de la SIRT1, mejorando así el desarrollo de los ovocitos. En cuanto a la maduración nuclear, ésta fue similar entre 2 μM (57.8%) y con el control (0 μM) donde se obtuvo un 56.9%.

Pocar *et al.* (2004) al trabajar con ovocitos de bovino, observaron que a 10 μM de resveratrol durante la MIV, el porcentaje de maduración nuclear (76.7%) fue mayor en comparación con los obtenidos a concentraciones de 20 y 40 μM (56.6% y 35.0%, respectivamente). Trabajando también con bovinos, Wang *et al.* (2014) concluyeron que el resveratrol promovía la maduración nuclear de los ovocitos, debido a que durante la MIV aumentó la secreción de progesterona y disminuyó la secreción de estradiol en las células del cúmulo, esto posiblemente debido a la expresión de la SIRT1. Sus resultados mostraron que a 1 μM el porcentaje de maduración nuclear fue de 93.4%, además se observó un aumento significativo en la expansión de las células del cúmulo, una reducción de ERO y un aumento en las de GSH.

Mukherjee *et al.* (2014) estudiaron el efecto del resveratrol durante la MIV de ovocitos de cabra. Sus resultados mostraron un porcentaje mayor de maduración nuclear a 0.25 y 0.5 μM (76.9% y 76.5%, respectivamente) en comparación con el control (0 μM) donde obtuvieron un 72%, sin embargo esta diferencia no fue significativa. También observaron que a 0.25 y 0.5 μM , disminuyeron los niveles intracelulares ERO y aumentaron los de GSH.

2.3 EL RESVERATROL EN EL DESARROLLO DE EMBRIONES PRODUCIDOS *IN VITRO*

Una vez transcurrida la MIV de los ovocitos con resveratrol, se han evaluado los efectos de este compuesto en el subsecuente desarrollo de embriones obtenidos *in vitro*. En la mayoría de los casos, los embriones evaluados se han obtenido por fertilización *in vitro* (Lee *et al.*,

2010; Kwak *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014) y solo en dos casos se ha evaluado el efecto del resveratrol en el desarrollo de embriones obtenidos por TNCS (Mukherjee *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015). A continuación se describen los resultados obtenidos en dichos trabajos.

Lee *et al.* (2010) reportaron que a 0.5 μM de resveratrol durante el cultivo de embriones de porcino obtenidos por fertilización *in vitro*, se obtuvo un porcentaje de embriones divididos de 67.1% y de blastocistos 13.3%, los cuales fueron mayores que el control (0 μM) (56.5 y 8.6%, respectivamente). A 0.5 μM , también observaron una mejora en la calidad embrionaria en términos del número de células en los blastocistos, así como una reducción en la expresión de los genes relacionados con la apoptosis, *Bcl-2* y *Caspasa-3*.

Kwak *et al.* (2012) observaron que en ovocitos de porcino tratados con 2 μM de resveratrol durante la MIV, se obtuvo 65.0% de embriones divididos y 20.5% en blastocistos, en comparación con el control donde obtuvieron 65.9 y 11.0%, respectivamente. Concluyeron que a 2 μM hubo un efecto benéfico sobre la formación de blastocistos obtenidos por FIV, debido a que se alcanzó una correcta maduración citoplasmática y se observó una disminución en la expresión de genes relacionados con la apoptosis celular. Sin embargo, observaron que a 10 μM el porcentaje de formación de blastocistos disminuyó significativamente (11.7%) respecto al obtenido con 2 μM (20.5%).

Wang *et al.* (2014) reportaron que el resveratrol a 1 μM durante la MIV de ovocitos bovinos, después de ser fertilizados *in vitro*, se obtuvo un porcentaje de embriones divididos de 69.2%, de mórulas de 54.5% y un aumento significativo en la formación de blastocistos (30.0%), en comparación con el control (0 μM), donde obtuvieron: 70.7, 59.1 y 21.9%, respectivamente. Los autores concluyeron que el resveratrol a 1 μM promueve el desarrollo embrionario, induciendo la secreción de progesterona y la expresión de la SIRT1.

Mukherjee *et al.* (2014) evaluaron el efecto del resveratrol en la MIV de ovocitos de cabra, así como en el subsecuente desarrollo de embriones clonados mediante la técnica de HMC. Observaron que a 0.25 y 0.5 μM se obtuvieron mayores porcentajes de embriones divididos (73.8 y 73.1%), formación de mórulas (24.6 y 25.3%) y blastocistos (21.5 y 22.3%) en comparación con el control (0 μM) (71.6, 22.3 y 16.4%), respectivamente. Sin embargo, a 5 μM se observó una disminución significativa en el porcentaje de embriones divididos (63.0%), formación de mórulas (43.7%) y blastocistos (15.9%), respecto al control (0 μM). Concluyeron que el resveratrol a 0.25 y 0.5 μM durante la MIV produce un microambiente benéfico para los ovocitos, debido a que disminuye las concentraciones intracelulares de ERO y aumenta las de GSH en el ovocito, con lo cual se estimula el desarrollo embrionario y se regula la expresión de genes proapoptóticos.

Lee *et al.* (2015) observaron que en los ovocitos de cerdo tratados con 2 μM de resveratrol durante la MIV utilizados en la TNCS, se obtuvo un porcentaje de embriones divididos de 80.3% y una formación de blastocistos de 38.0%, en comparación con el control (71.1 y 22.4%, respectivamente). También observaron que a 2 μM disminuyó la expresión de los genes *Bax/Bcl-2*, *Caspasa-3* y *Bak*, genes relaciones con la apoptosis celular.

3. JUSTIFICACIÓN

Con la finalidad de reproducir individuos genéticamente valiosos, se requieren desarrollar proyectos de investigación en los cuales se apliquen biotecnologías que aumenten el conocimiento científico relacionado con ellas y que sean la base para futuras investigaciones. Entre las biotecnologías que se aplican con este objetivo, se encuentran: el seguimiento del ciclo estral por métodos no invasivos, criopreservación de gametos, embriones y tejidos, inseminación artificial, fertilización *in vitro* y clonación de embriones por transferencia nuclear de células somáticas (TNCS).

La clonación por TNCS tiene el potencial para contribuir de manera eficaz en la producción animal, la generación de individuos genéticamente modificados, la preservación de especies en riesgo de extinción y en el desarrollo de investigación básica (Niemann *et al.*, 2008). Sin embargo, en México no hay reportes de la producción de embriones mediante clonación. Por tal razón, es importante realizar estudios relacionados al tema.

Aunque a nivel mundial se han logrado clonar individuos de forma exitosa, la eficiencia de la TNCS aún es baja, debido a que el procedimiento es complejo e involucra diversos factores que aún deben ser estudiados. Entre estos factores se encuentran la maduración *in vitro* (MIV), la cual tiene un gran impacto para obtener un óptimo desarrollo embrionario *in vitro* (Rizos *et al.*, 2005; Camargo *et al.*, 2006). Por tal motivo, se considera que es útil evaluar el efecto de sustancias químicas que la literatura ha reportado como benéficas, debido a que evitan el daño oxidativo al que están expuestas las células durante su cultivo. Tal es el caso del resveratrol, el cual al ser suplementado en el medio de MIV de ovocitos, ha mejorado el desarrollo embrionario en porcinos, bovinos y caprinos (Kwak *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014; Mukherjee *et al.*, 2014).

Al revisar la bibliografía no se encontraron reportes del efecto del resveratrol durante la MIV de ovocitos de ovino (*Ovis aries*), ni tampoco en el desarrollo temprano de embriones de ovino clonados. Por lo tanto, se considera importante evaluar el efecto del resveratrol en la MIV de ovocitos de ovino y su impacto en el desarrollo embrionario posterior.

Como modelo experimental se eligió a esta especie, esperando que cuando la técnica de clonación de embriones se realice de manera exitosa, en un futuro pueda extrapolarse a ovinos silvestres, como el borrego cimarrón mexicano (*Ovis canadensis mexicana*), contribuyendo de esta forma con los programas nacionales para la reproducción y conservación de mamíferos silvestres en alguna categoría de riesgo de extinción.

4. HIPÓTESIS

El resveratrol en el medio de maduración *in vitro*, aumentará la tasa de maduración nuclear de ovocitos de ovino (*Ovis aries*), el desarrollo temprano y la calidad de los embriones producidos *in vitro* mediante clonación manual.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de resveratrol en la maduración *in vitro* de ovocitos de ovino y su impacto en el desarrollo embrionario temprano de los embriones obtenidos por clonación manual.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de distintas concentraciones de resveratrol durante la maduración *in vitro* sobre el porcentaje de maduración nuclear de ovocitos de ovino.
2. Determinar las ERO intracelulares de los ovocitos madurados *in vitro* con resveratrol.
3. Evaluar el desarrollo embrionario temprano de los embriones obtenidos por clonación manual a partir de los ovocitos madurados *in vitro* con diferentes concentraciones de resveratrol.
4. Evaluar la calidad morfológica de los embriones obtenidos por clonación manual a partir de los ovocitos madurados *in vitro* con diferentes concentraciones de resveratrol.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Reproducción Animal Asistida de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. A menos que se especifique lo contrario, todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). Los reactivos y las soluciones se esterilizaron mediante filtración con membranas de 0.22 μm (Millex-GV), se alicuotaron y conservaron de acuerdo a las especificaciones indicadas por el proveedor hasta su uso. Todas las técnicas se realizaron bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar horizontal (Veco, S.A de C.V). Todos los procedimientos de incubación se llevaron a cabo a 38°C con 5% de CO₂, 95% de aire y humedad a saturación. Los medios se suplementaron 24 h antes del cultivo, se filtraron y preincubaron en las condiciones antes mencionadas.

6.1 OBTENCIÓN DE LOS OVARIOS Y COMPLEJOS CÚMULO-OVOCITO

Los ovarios se obtuvieron de ovejas tipo criollo, recién sacrificadas en un rastro ubicado en el Bordo de Xochiaca, Estado de México y fueron colocados y transportados al laboratorio dentro de un termo con solución salina [NaCl al 0.9% y 1% de antibióticos (10,000 UI de penicilina, 10 mg de sulfato de estreptomicina y 25 μg de anfotericina B, por mL) (Antibac-Antifun 100x, In Vitro, S.A.)] a una temperatura de 28-35°C en un lapso menor a 2 h. En el laboratorio los ovarios se lavaron isotérmicamente tres veces con solución salina.

Los complejos cúmulo-ovocito (COC) se obtuvieron por punción y aspiración de los folículos ováricos de 2 a 6 mm de diámetro, con una aguja hipodérmica calibre 20 y una jeringa estéril de 10 mL con 1 mL de medio de cultivo de tejidos 199 (TCM-199) (In Vitro, S.A.) con 25 mM de HEPES (In Vitro, S.A.) y 100 UI/mL de heparina. A partir del líquido folicular recuperado

se seleccionaron los COC que presentaron ovocitos con un citoplasma uniforme y que estuvieran rodeados de al menos 3 capas de células del cúmulo. Los COC seleccionados fueron lavados tres veces con TCM-199 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Microlab), 1% de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 5 µg/mL de hormona folículo estimulante (FSH) (Folltropin-V, Bioniche), 5 UI/mL de hormona gonadotropina coriónica (CG) (Loeffler) y 0.6% de antibióticos (Robledo-Verduzco *et al.*, 2009).

6.2 MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS TRATADOS CON RESVERATROL

Grupos de 25 a 30 COC fueron cultivados en cajas de cuatro pozos, con 500 µL de medio de maduración TCM-199 suplementado (10% de SFB, 1% de EGF, 5 µg/mL de FSH, 5 UI/mL de CG y 0.6% de antibióticos) cubiertos con 300 µL de aceite mineral e incubados durante 24 horas (Robledo-Verduzco *et al.* (2009).

Durante la MIV los COC fueron tratados con distintas concentraciones de resveratrol (0, 0.5, 2 y 5 µM). El resveratrol fue disuelto en dimetil sulfoxido (DMSO) y se obtuvo una solución stock a 500 µM, la cual fue almacenado a -20°C hasta su uso (Mukherjee *et al.*, 2014).

6.3 CLONACIÓN MANUAL

6.3.1 PREPARACIÓN DE LOS CITOPLASTOS

Transcurrido el tiempo de MIV, se seleccionaron los COC que presentaron al menos 4 capas de células del cúmulo (Fig. 6a) y fueron desprovistos de dichas células (Fig. 6b) mediante incubación con hialuronidasa (0.5 mg/mL en TCM-199 con HEPES) durante 1 min y

agitándolos con un agitador tipo vórtex a máxima velocidad por 3 min. Posteriormente fueron colocados en T2 (TCM-199 con HEPES y 2% de SFB) e incubados en demecolcina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en TCM-199) por 40 min y lavados dos veces en T2 (Vajta *et al.*, 2006).

Para retirar la zona pelúcida, los ovocitos se colocaron en una gota de 30 μL de pronasa [2 mg/mL en T10 (TCM-199 con HEPES con 10% de SFB)] durante 5-10 min. Posteriormente fueron transferidos a una gota de 20 μL de T20 (TCM-199 con HEPES con 20% de SFB) (Vajta *et al.*, 2006).

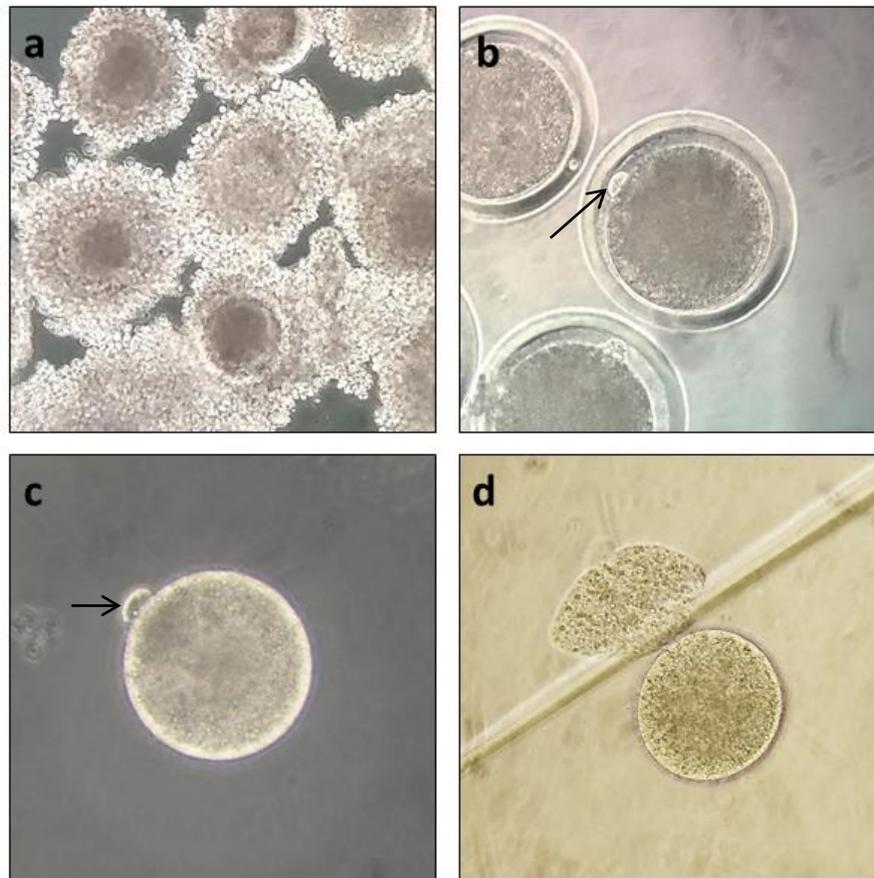


Figura 6. Denudación y enucleación del ovocito. (a) Complejos cúmulo-ovocito (100x). (b) Ovocito denudado; se observa el primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino (flecha) (200x). (c) Ovocito con primer corpúsculo polar (flecha) y sin zona pelúcida (200x). (d) Ovocito biseccionado manualmente (200x).

Los ovocitos ya sin zona pelúcida, se evaluaron en un microscopio estereoscópico y se seleccionaron aquellos que presentaron un citoplasma homogéneo y la extrusión del primer corpúsculo polar (Fig. 6c). Los ovocitos seleccionados fueron colocados en gotas de 20 μ L de T10, y se enuclearon por bisección manual con una micronavaja ultra fina (Ultra-Sharp Splitting Blade. Bioniche) con la cual se retiró el corpúsculo polar mediante un corte transversal en la cuarta parte del ovocito próxima al corpúsculo polar (Fig. 6d). La fracción de los ovocitos que presentaron el primer corpúsculo polar fueron desechados y solo se mantuvieron las fracciones restantes, considerando a éstas como ovocitos enucleados (citoplastos) y fueron transferidos a una gota de 20 μ L de T20 donde se mantuvieron hasta concluir la enucleación de los ovocitos restantes (Vajta *et al.*, 2006).

6.3.2 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS CARIOPLASTOS

Se obtuvo una biopsia de 1 cm² de piel de la oreja de un feto hembra de ovino tipo criollo de aproximadamente 5 meses de gestación, proveniente de un rastro localizado en el Bordo de Xochiaca, Estado de México. La biopsia se colocó y transportó al laboratorio en un tubo Eppendorf con 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos de Dulbecco (DPBS) con antibióticos al 2% dentro de un termo con hielo, en un lapso menor a 2 h. En el laboratorio la biopsia se desinfectó con cloro al 1% por 3 minutos y alcohol al 70% por 3 segundos, luego fue lavada tres veces en DPBS. Posteriormente se fragmentó mecánicamente y disgregó con colagenasa tipo I (2 mg/mL, Gibco) y tipo II (2 mg/mL, Gibco) en una estufa de secado a 37°C, donde estuvo en oscilación constante por 1 h. Pasado este tiempo, la acción de las enzimas se detuvo con 5 mL de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (In Vitro, S.A.) suplementado (10% de SFB y 2% de antibióticos). La solución obtenida se centrifugó a 500 x g por 10 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se recuperó e incubó durante 7

días en una caja de Petri de 35 mm con 3 mL de DMEM-suplementado, hasta alcanzar la confluencia celular (Navarro-Maldonado *et al.*, 2015).

Cuando las células (fibroblastos) alcanzaron el 100% de confluencia (7 días) (Fig. 7a), se realizó un pasaje celular. Para ello, a las cajas Petri se les retiró el medio de cultivo, se agregó 700 μ L de tripsina (tripsina-verseno, 0.05/0.05%, In Vitro, S.A.) y se incubaron durante 5 min. Pasado este tiempo la acción de la tripsina se inactivó con 700 μ L de DMEM-suplementado. La suspensión celular se centrifugó a 150 x g por 4 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla fue recuperada y dividida a la mitad. Una mitad se resuspendió en 3 mL de DMEM-suplementado e incubó por 7 días, hasta alcanzar nuevamente la confluencia celular y realizar otro pasaje (Navarro-Maldonado *et al.*, 2015). La otra mitad fue resuspendida en 500 μ L de DMEM y mantenida a temperatura ambiente hasta el momento de la fusión celular y ser utilizados como carioplastos (Fig. 7b) (Vajta *et al.*, 2001).

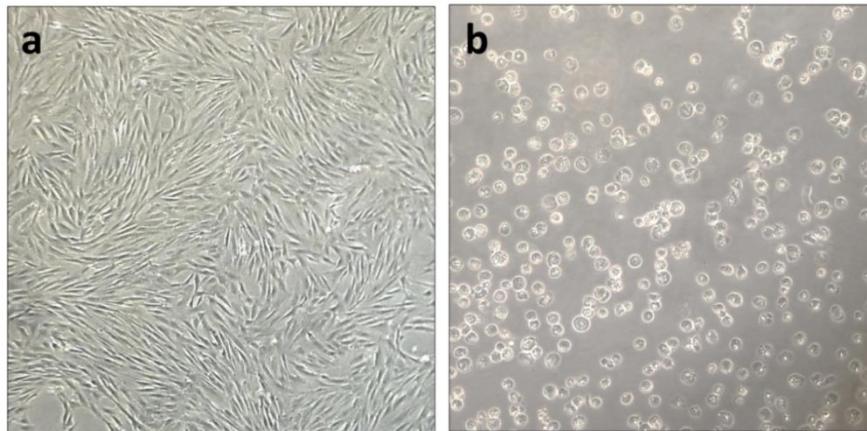


Figura 7. (a) Fibroblastos (carioplastos) en 100% de confluencia (40x). (b) Carioplastos previo al proceso de fusión celular (100x).

6.3.3 FUSIÓN CELULAR

Para compensar el citoplasma retirado durante la enucleación, dos citoplastos se colocaron en una gota de 15 μL de fitohemaglutinina (PHA) (5 mg/mL en TCM-199 con HEPES) por 5-10 segundos y fueron transferidos a una gota de 15 μL de T2, en la cual previamente se colocaron en promedio 30 carioplastos. Dentro de la gota, los dos citoplastos se unieron a un carioplasto formando así un “tripleto celular” (Fig. 8a). El triplete fue transferido a una gota de 15 μL de medio de fusión (5.46 g de D-Mannitol y 0.1 g de polivinil alcohol en 98 mL de H_2O) y después colocado entre los dos electrodos de la cámara de fusión (BTX Microslide. Model 450; BTX, San Diego, CA) la cual, previamente fue cubierta con 200 μL de medio de fusión y conectada al electrofusor (BLS, Electrofusion instrument CF-150/B. Budapest, Hungría). Una vez acoplados la cámara de fusión y el electrofusor, el triplete fue alineado entre los electrodos con un pulso de 9 V (AC) y se aplicó un pulso de 105 V (DC) durante 9 μs para fusionarlos (Fig. 8b). Los tripletes que posterior al pulso eléctrico retomaron una forma esférica se consideraron como embriones reconstruidos (Fig. 8c) y fueron transferidos a medio SOF (In Vitro, S.A.) suplementado con 5% de SFB e incubados 2 h, para reprogramación (Vajta *et al.*, 2006).

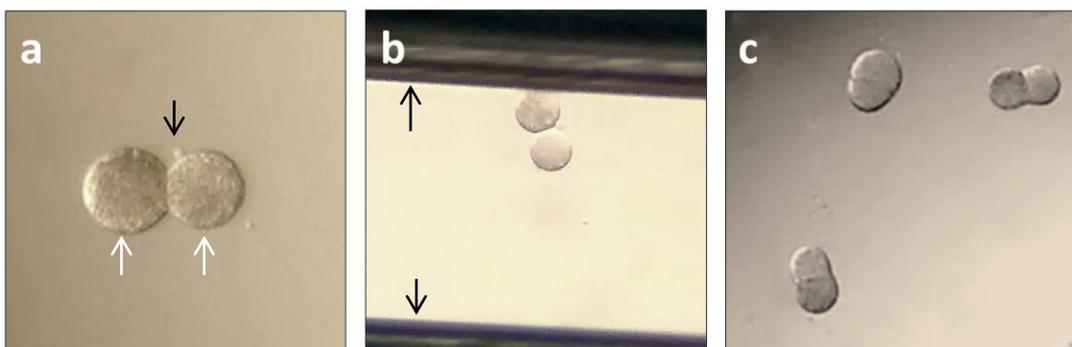


Figura 8. Fusión celular. (a) Triplete celular. Se observan dos citoplastos (flechas blancas) y un carioplasto (flecha negra) (100x). (b) Triplete alineado entre los dos electrodos de la cámara fusión (flechas) (40x). (c) Tripletes en proceso de fusión después de pulso eléctrico (40x).

6.3.4 ACTIVACIÓN Y CULTIVO *IN VITRO* DE LOS EMBRIONES CLONADOS

Transcurrido el tiempo de reprogramación, los embriones reconstruidos se incubaron en 1 mL de T2 con 8 μ L de ionóforo de Ca^{++} (5 μ M) durante 5 min y fueron lavados tres veces en T20. Posteriormente se incubaron individualmente en gotas de 2 μ L de SOF suplementado con 5% de SFB y 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) durante 4 h y fueron lavados tres veces en SOF con 5% de SFB (Vajta *et al.*, 2006 y Mukherjee *et al.*, 2014).

El cultivo *in vitro*, se realizó en micropozos de acuerdo al sistema WOW (Vajta *et al.*, 2000), el cual consiste en perforaciones milimétricas hechas con un punzón en el fondo de una caja de cuatro pozos (Fig. 9). Una vez colocados en los micropozos, los embriones reconstruidos fueron incubados en 500 μ L de SOF suplementado con 15% de SFB y cubiertos con aceite mineral durante 7 días.

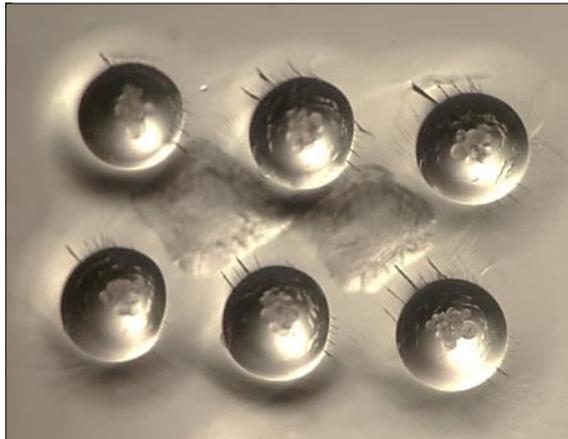


Figura 9. Sistema de cultivo WOW. Se observan seis micropozos con embriones en cultivo (40x).

6.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL RESVERATROL EN LA MIV

Para evaluar la tasa de maduración nuclear a las distintas concentraciones de resveratrol, luego de la MIV los ovocitos fueron examinados con un microscopio estereoscópico para identificar la presencia del primer corpúsculo polar. Considerando como maduros aquellos que alcanzaron la metafase II (fase caracterizada por la extrusión del primer corpúsculo polar) y como inmaduros aquellos en los que el corpúsculo polar no estuvo presente (Rienzi *et al.* 2012). El porcentaje de maduración nuclear se obtuvo mediante la proporción de ovocitos maduros sobre el total de ovocitos evaluados.

6.5 DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Transcurrido el tiempo de MIV, en promedio 6 ovocitos de cada una de las distintas concentraciones de resveratrol evaluadas, fueron incubados en oscuridad a 37°C durante 30 min en TCM-199 con 10 µM de H₂DCFDA (diacetato 2',7'-diclorodihidrofluoresceína), el cual se ha utilizado como indicador de ERO en células. Transcurrido ese tiempo fueron lavados tres veces en gotas de 100 µL de TCM-199 con HEPES y fijados en un portaobjetos (Kwak *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2014).

Para determinar las ERO, los ovocitos fueron observados y fotografiados a través de un microscopio de epifluorescencia equipado con un filtro UV de 460 nm. Las fotografías se guardaron en el formato digital JPG, a partir de las cuales se determinó la intensidad de fluorescencia con el software Image J (Versión 1.41; National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA) y normalizadas con el grupo control (Kwak *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2014).

6.6 EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

El desarrollo embrionario se evaluó a las 48, 120 y 168 h de cultivo *in vitro*. A las 48 h se registró el número y porcentaje de embriones divididos, a las 120 h se registró el número y porcentaje de embriones en estadio de 8-16 blastómeros y a las 168 h se registró el número y porcentaje de mórulas y mórulas compactas. El porcentaje en cada uno de los estadios se obtuvo con respecto al total de los embriones cultivados.

6.7 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MORFOLÓGICA EMBRIONARIA

La calidad de los embriones se determinó con base en los siguientes criterios (Stringfellow y Seidel, 1990):

Calidad 1. Excelente. Embrión compacto, no existen defectos visibles, esférico, color claro, pocas vesículas, sin desechos celulares, ni blastómeros extruidos.

Calidad 2. Bueno. Embrión compacto o con una leve descompactación, su forma es ligeramente irregular, color uniforme, presencia de pocas vesículas y blastómeros extruidos, pocos desechos celulares.

Calidad 3. Regular. Descompactación muy marcada, desechos celulares, color oscuro o zonas claras y oscuras, vesículas, blastómeros extruidos y masa pequeña.

Calidad 4. Malo o no transferible. Embrión con una degeneración muy marcada, masa pequeña, color oscuro, descompactación, presencia de vesículas e irregularidades en los blastómeros.

El análisis de la calidad embrionaria se realizó a las 120 y 168 h de cultivo *in vitro*. Se evaluaron los embriones de 8-16 blastómeros y las mórulas de acuerdo a los criterios establecidos. Los embriones de 2 y 4 blastómeros fueron excluidos por carecer del criterio de calidad, el cual indica que los embriones deben presentar un estadio de desarrollo relacionado con su edad (Stringfellow y Seidel, 1990). Para obtener los porcentajes de calidad se consideró el número de embriones clasificados con calidad 1, 2, 3 o 4 sobre el total de embriones evaluados.

6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar si hubo diferencia significativa, los resultados fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido por la prueba de comparación múltiple de Duncan. Considerando como significativa las diferencias si el valor de P fue menor que 0.05. El análisis estadístico se realizó utilizando el software NCSS 2007 (NCSS, LLC. Kaysville, Utah, EUA).

7. RESULTADOS

7.1 EFECTO DEL RESVERATROL EN LA MIV DE OVOCITOS DE OVINO

En la tabla 1 se muestra el efecto de las diferentes concentraciones de resveratrol (0, 0.5, 2 y 5 μM) sobre el porcentaje de MIV de ovocitos de ovino. Se aprecia que no hubo diferencia significativa ($P>0.05$) entre los grupos tratados con 0.5 y 2 μM (81.3 y 72.0%, respectivamente) comparadas con el control (74.2%). En tanto que en el grupo con 5 μM el porcentaje de maduración (56.0%) disminuyó significativamente ($P<0.05$) (Fig. 10).

Tabla 1. Efecto de diferentes concentraciones de resveratrol sobre la MIV de ovocitos de ovino.

| Resveratrol (μM) | Ovocitos (n) | % de maduración (n) |
|-------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| 0 (Control) | 274 | 74.2 \pm 9.5 (202) ^a |
| 0.5 | 261 | 81.3 \pm 6.7 (215) ^a |
| 2 | 193 | 72.0 \pm 5.9 (140) ^a |
| 5 | 184 | 56.0 \pm 5.2 (103) ^b |

^(a,b) Subíndices diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($P<0.05$). Los datos se presentan como el promedio de las medias \pm desviación estándar. Se realizaron ocho repeticiones.

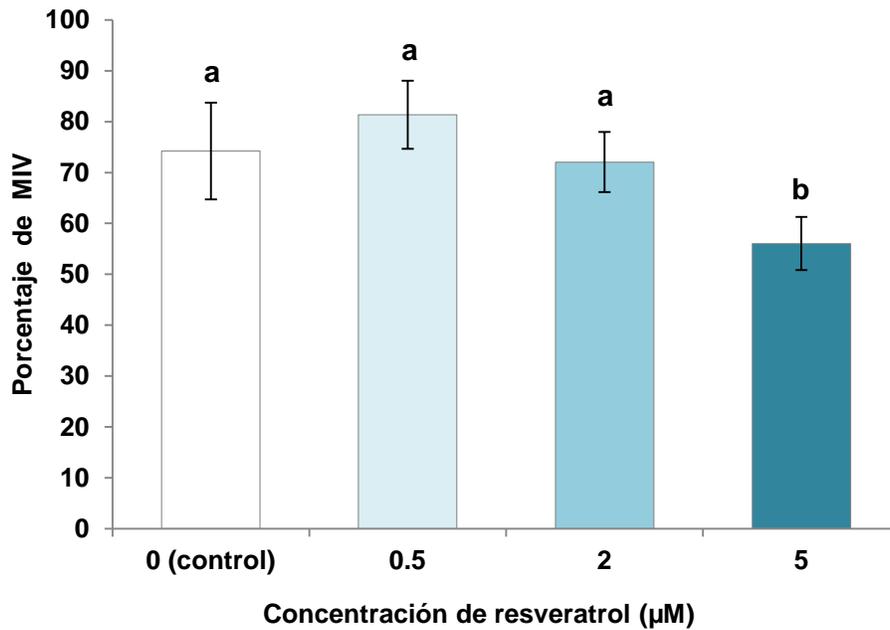


Figura 10. Efecto del resveratrol sobre el porcentaje de MIV de ovocitos de ovino. Literales diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Se realizaron ocho repeticiones.

7.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LOS OVOCITOS TRATADOS CON RESVERATROL

Los niveles intracelulares de ERO en los ovocitos sometidos a MIV con diferentes concentraciones de resveratrol (0, 0.5, 2 y 5 µM) se muestran en las figuras 11 y 12. Se aprecia que no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre grupos. Sin embargo, el efecto antioxidante del resveratrol presentó una tendencia a disminuir la cantidad de ERO en ovocitos a concentraciones de 0.5 y 2 µM, pero esta diferencia no fue significativa ($P > 0.05$).

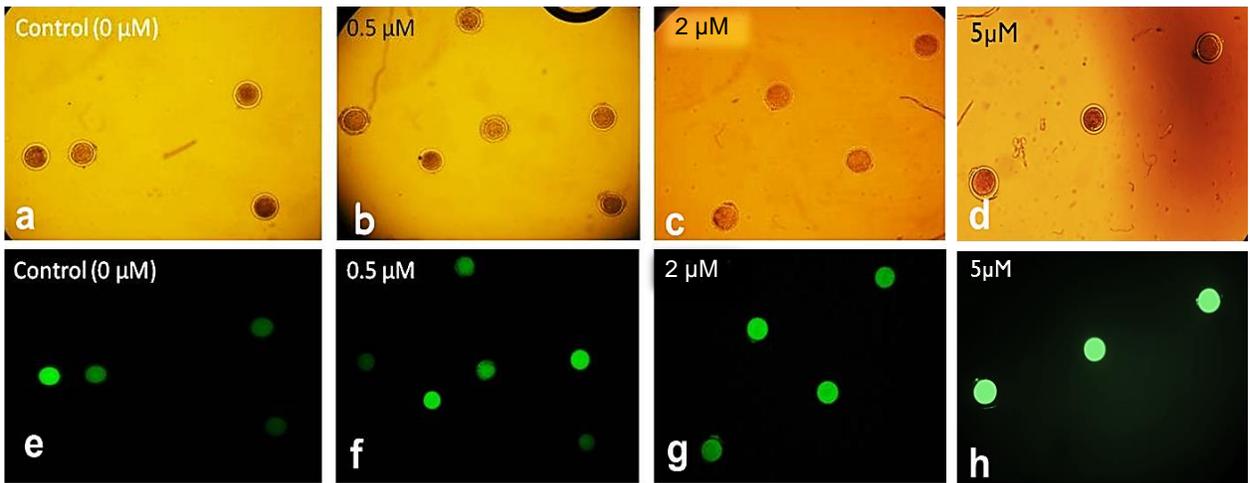


Figura 11. Fotografías en microscopio de epifluorescencia de ovocitos de ovino sometidos a MIV a distintas concentraciones de resveratrol, teñidos con 2',7'-diclorodihidrofluoresceina. En campo claro (a-d) y con filtro UV a 460 nm (e-h). (10X).

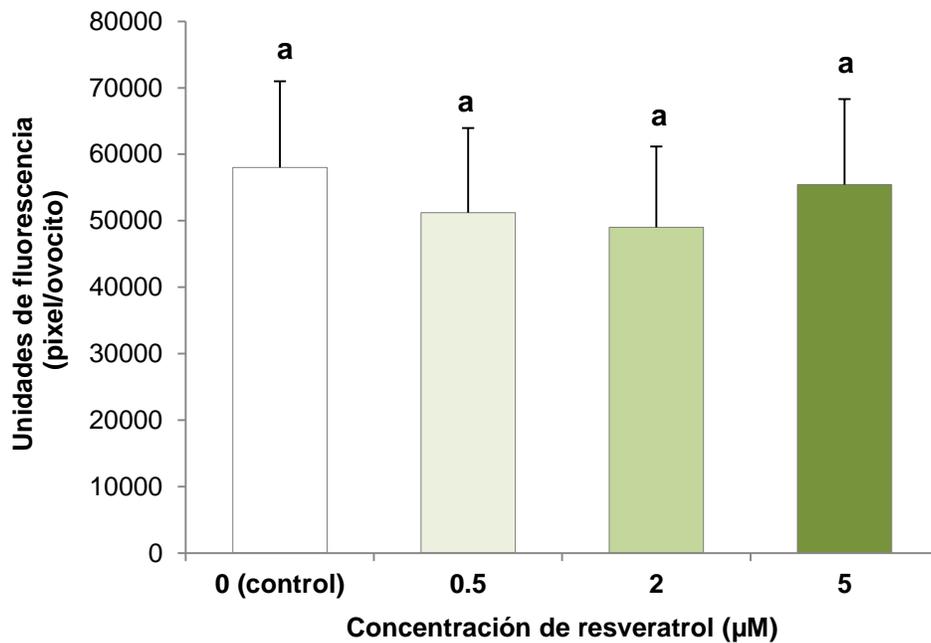


Figura 12. ERO en ovocitos madurados *in vitro* en presencia de diferentes concentraciones de resveratrol. Literales diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Se realizaron cinco repeticiones.

7.3 DESARROLLO TEMPRANO DE LOS EMBRIONES CLONADOS A PARTIR DE OVOCITOS TRATADOS CON RESVERATROL

Para cada concentración de resveratrol, los embriones fueron clasificados considerando cuatro grupos: embriones divididos (Fig. 13a-d), embriones de 8-16 blastómeros (Fig. 13e-h), mórulas (Fig. 13i-l) y mórulas compactas (Fig. 13m-p).

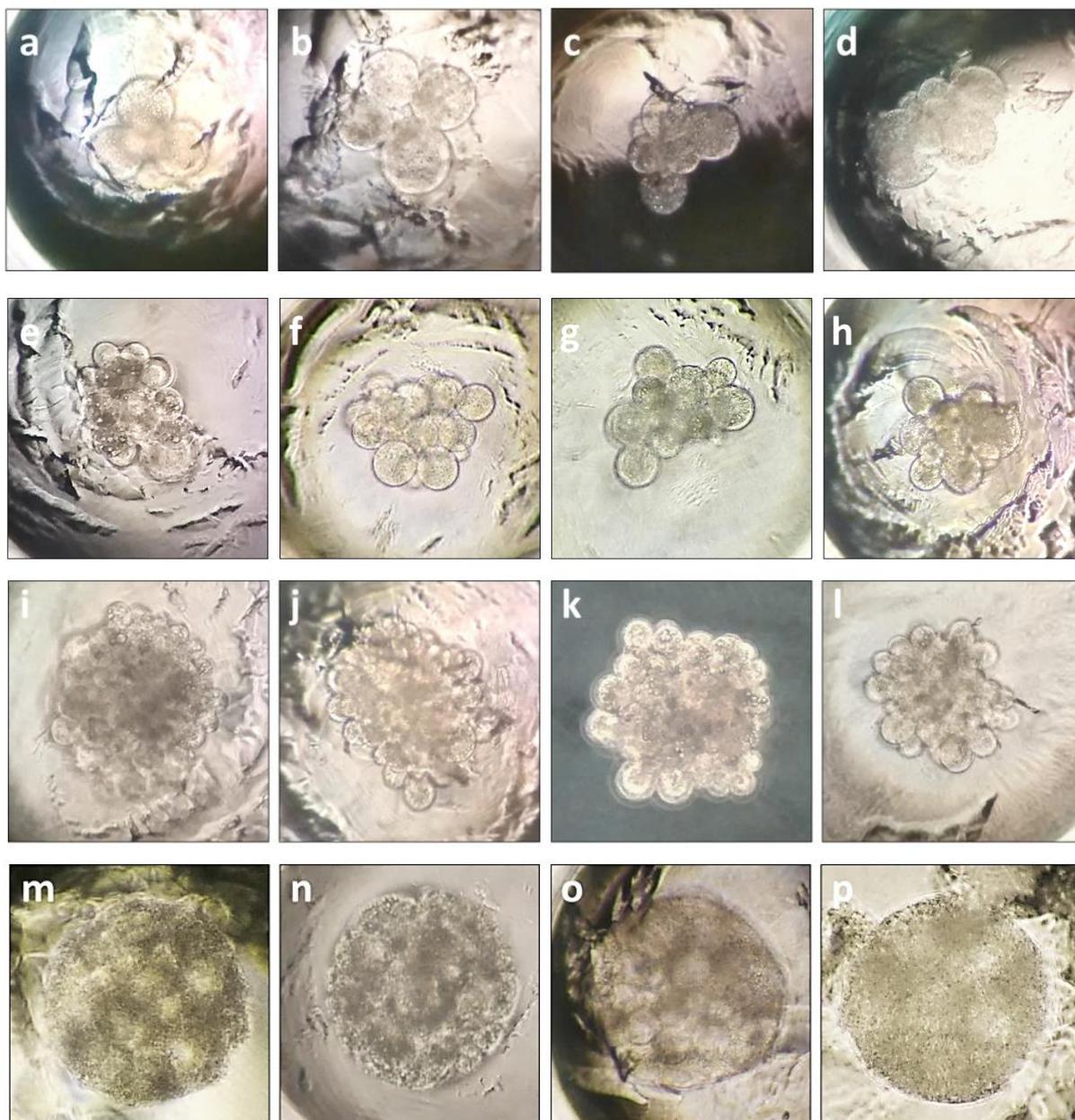


Figura 13. Diferentes estadios de desarrollo de embriones de ovino obtenidos por HMC cultivados en el sistema de cultivo WOW. Embriones divididos (a-d), embriones de 8-16 blastómeros (e-h), mórulas (i-l) y mórulas compactas (m-p) (200x).

Al evaluar el desarrollo de los embriones obtenidos por clonación manual, se obtuvo que el porcentaje de embriones divididos no mostró diferencia significativa ($P>0.05$) entre los grupos tratados con resveratrol a concentraciones de 0, 0.5, 2 y 5 μM (81.2, 84.4, 80.1 y 77.2%, respectivamente). En los embriones de 8-16 blastómeros, tampoco no se observó diferencia significativa ($P>0.05$) entre grupos (65.6, 70.2, 64.3 y 63.6%, respectivamente). En las mórulas, a 5 μM el porcentaje (6.8%) disminuyó significativamente ($P<0.05$) en comparación con 0, 0.5 y 2 μM (32.8, 35.1 y 28.7%, respectivamente). En las mórulas compactas, se observó que el grupo tratado con 0.5 μM tuvo un porcentaje de 10.7%, el cual fue significativamente mayor ($P<0.05$) que el control (6.2%), en tanto que a 2 y 5 μM no hubo mórulas compactas (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del resveratrol en el desarrollo temprano de embriones de ovino obtenidos por clonación manual.

| Resveratrol (μM) | Embriones cultivados | % Embriones divididos (n) | % 8-16 blastómeros (n) | % Mórulas (n) | % Mórulas compactas (n) |
|-------------------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| 0 (Control) | 64 | 81.2 \pm 5.1 (52) ^a | 65.6 \pm 3.6 (42) ^a | 32.8 \pm 7.8 (21) ^a | 6.2 \pm 0.0 (4) ^a |
| 0.5 | 57 | 84.4 \pm 9.9 (48) ^a | 70.2 \pm 6.2 (40) ^a | 35.1 \pm 5.9 (20) ^a | 10.7 \pm 4.1 (6) ^b |
| 2 | 45 | 80.1 \pm 8.1 (36) ^a | 64.3 \pm 7.5 (29) ^a | 28.7 \pm 3.0 (13) ^a | 0.0 \pm 0.0 (0) ^c |
| 5 | 44 | 77.2 \pm 5.2 (34) ^a | 63.6 \pm 7.4 (28) ^a | 6.8 \pm 4.5 (3) ^b | 0.0 \pm 0.0 (0) ^c |

(^{a,b,c}) Subíndices diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($P<0.05$). Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar. Se realizaron cinco repeticiones para cada concentración.

7.4 CALIDAD MORFOLÓGICA DE LOS EMBRIONES CLONADOS A PARTIR DE OVOCITOS TRATADOS CON RESVERATROL

En los embriones de 8-16 blastómeros no hubo diferencia significativa ($P>0.05$) entre los grupos con 0, 0.5, 2 y 5 μM de resveratrol con respecto al porcentaje de calidad 1 (21.5, 24.8, 20.2 y 18.6%), calidad 2 (31.1, 32.4, 27.3 y 32.4%), calidad 3 (19.3, 22.8, 24.4 y 25.2%) y calidad 4 (28.6, 14.2, 27.3 y 25.2%), respectivamente. Observándose que a 0.5 μM se presentó una tendencia a aumentar el porcentaje de embriones de calidad excelente (24.8%) y disminuir el porcentaje de embriones de calidad mala (14.2%), pero esta diferencia no fue significativa ($P>0.05$) (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto del resveratrol sobre la calidad morfológica de los embriones de 8 a 16 blastómeros obtenidos por clonación manual.

| Concentración de resveratrol (μM) | Embriones evaluados | % Calidad embrionaria (n) | | | |
|--|---------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| | | 1 (Excelente) | 2 (Buena) | 3 (Regular) | 4 (Mala) |
| 0 (Control) | 42 | 21.5 (9) ^a | 31.1 (13) ^a | 19.3 (8) ^a | 28.6 (12) ^a |
| 0.5 | 40 | 24.8 (10) ^a | 32.4 (13) ^a | 22.8 (9) ^a | 14.2 (8) ^a |
| 2 | 29 | 20.2 (6) ^a | 27.3 (8) ^a | 24.4 (7) ^a | 27.3 (8) ^a |
| 5 | 28 | 18.6 (5) ^a | 32.4 (9) ^a | 25.2 (7) ^a | 25.2 (7) ^a |

Subíndices diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($P<0.05$).

En las mórulas, el porcentaje de calidad 1 (excelente) fue significativamente menor ($P < 0.05$) a 5 μM de resveratrol (0%) con respecto a las concentraciones 0, 0.5 y 2 μM (23.8, 30.1 y 23.3%, respectivamente). En la calidad 2 no se observó diferencia significativa ($P > 0.05$) a concentraciones 0, 0.5, 2 y 5 μM (28.5, 39.6, 30.0 y 33.3%, respectivamente). En la calidad 3 tampoco hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre grupos (23.8, 19.8, 19.8 y 33.3%, respectivamente). En la calidad 4 (mala) a 0.5 μM , el porcentaje (4.7%) fue significativamente menor ($P < 0.05$) que a 0, 2 y 5 μM (23.8, 23.3 y 33.3%, respectivamente) (Tabla 4). Se observó que el resveratrol a 0.5 μM , nuevamente aumentó el porcentaje de los embriones de calidad excelente (30%) y disminuyó el porcentaje de embriones de calidad mala (4.7%), sin embargo, esta diferencia no fue significativa ($P > 0.05$).

Tabla 4. Efecto del resveratrol sobre la calidad morfológica de las mórulas obtenidas por clonación manual.

| Concentración de resveratrol (μM) | Embriones evaluados | % Calidad embrionaria (n) | | | |
|--|---------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | 1 (Excelente) | 2 (Buena) | 3 (Regular) | 4 (Mala) |
| 0 (Control) | 21 | 23.8 (5) ^a | 28.5 (6) ^a | 23.8 (5) ^a | 23.8 (5) ^a |
| 0.5 | 20 | 30.1 (6) ^a | 39.6 (8) ^a | 19.8 (4) ^a | 4.7 (2) ^b |
| 2 | 13 | 23.3 (3) ^a | 30.0 (4) ^a | 19.8 (3) ^a | 23.3 (3) ^a |
| 5 | 3 | 0.0 (0) ^b | 33.3 (1) ^a | 33.3 (1) ^a | 33.3 (1) ^a |

Subíndices diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Finalmente, en la figura 14 se presenta un concentrado de los resultados obtenidos en la presente tesis, donde resulta evidente que el efecto del resveratrol aumenta conforme transcurre el tiempo del desarrollo embrionario. El efecto deletéreo de la concentración 5 μM de resveratrol aumenta en gran magnitud en el estado de mórula, debido a que en este momento la organización celular de ese estado de desarrollo requiere de un óptimo funcionamiento de la expresión génica embrionaria (Beaujean *et al.*, 2004). En tanto, el efecto benéfico de la concentración de 0.5 μM de resveratrol durante la MIV de ovocitos ovinos aumenta paulatinamente alcanzando un máximo en el estado de mórula compacta.

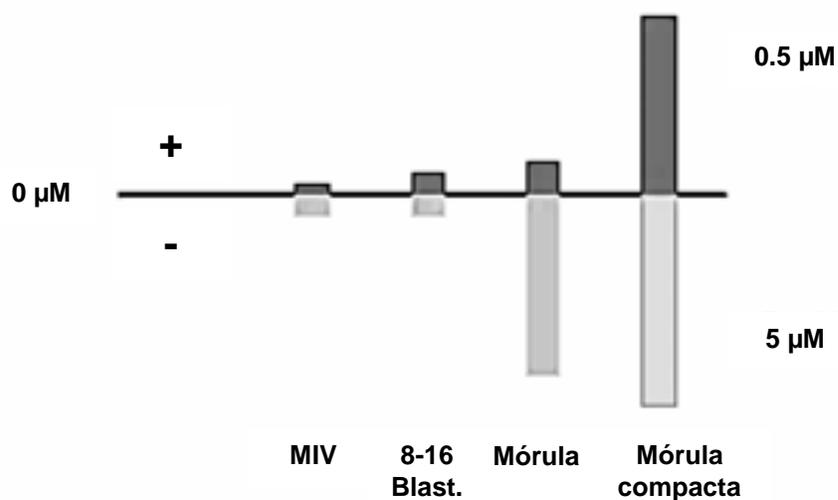


Figura 14. Concentrado de resultados. Se describe el impacto de la MIV con 0, 0.5 y 5 μM de resveratrol, sobre el desarrollo embrionario temprano. En el eje de las abscisas se representa el valor obtenido de tasa MIV y de desarrollo embrionario a 0 μM (Control). Arriba del eje de las abscisas se presenta lo obtenido con la concentración 0.5 μM de resveratrol y por debajo del eje lo obtenido a 5 μM . Las columnas representan la diferencia porcentual de los valores de cada grupo (0.5 y 5 μM) comparadas con el control (0 μM).

8. DISCUSIÓN

Las técnicas de reproducción animal asistida han permitido el nacimiento y la conservación de germoplasma de individuos genéticamente valiosos, lo cual es de gran importancia para su protección y estudio (Folch *et al.*, 2009). A diferencia de la inseminación artificial y la fertilización *in vitro*, la clonación por TNCS actualmente presenta poca aceptación, debido a la complejidad intrínseca de la técnica, con una manipulación intensa de los ovocitos y las células somáticas, así como a la dificultad de entender a profundidad cada parte de su proceso. Además, las reducidas tasas de eficiencia, desde ovocito hasta blastocisto y de ahí a crías viables, así como las anomalías durante el proceso de desarrollo embrionario y fetal, han contribuido de manera reiterada a la limitada aceptación de esta técnica (Meissner *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2003).

Sin embargo, mediante la TNCS se han logrado avances exitosos reconocidos a nivel mundial. Por citar algunos, se menciona el nacimiento de la oveja “Dolly”, considerada como el primer mamífero clonado a partir de una célula somática adulta (Wilmut *et al.*, 1997). Otro ejemplo, es el nacimiento de la cabra bucardo, clonada a partir de células somáticas obtenidas y criopreservadas del último espécimen vivo de su especie y que al morir, con dichas células se obtuvo por primera vez el nacimiento de un individuo de una especie ya extinta (Folch *et al.*, 2009). Este tipo de reportes, demuestran que es posible lograr el nacimiento y la recuperación de individuos genéticamente valiosos por medio de esta metodología. Años después, cuando fue encontrado un cadáver de una cría de mamut en buen estado de conservación (Kosintsev *et al.*, 2010) se reactivó la discusión sobre las posibilidades y alcances de la clonación para recuperar especies extintas, e incluso hubo reportes del nacimiento del primer ser humano clonado, los cuales no fueron científicamente comprobados (Shuster, 2003). Reanudándose así la discusión sobre la posibilidad de la

clonación en humanos (Jaenisch, 2004), concluyendo en una legislación internacional que prohíbe la aplicación de ésta técnica en humanos, por considerarla éticamente inaceptable y contraria a la integridad humana y a la moral (Trejo-García, 2006).

En cuanto al debate sobre la clonación animal, actualmente en el parlamento de la Unión Europea, está en proceso una iniciativa de ley que prohíbe la clonación animal, así como su importación, la de embriones clonados, descendientes de clones y alimentos producidos a partir de ellos. Dicha prohibición se ampara en las resoluciones de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), que indican que la clonación pone en peligro el bienestar de los animales, debido a las malformaciones que sufren los individuos concebidos con este método y la elevada tasa de mortalidad (EFSA, 2012). Sin embargo, esta resolución está siendo apelada, argumentándose que la clonación es una técnica más en el campo de la reproducción asistida, la cual no debe prohibirse, sino regularse y garantizar que se realice en centros especializados, por personal responsable que den un trato adecuado a los animales utilizados en estas técnicas.

Aunque la eficiencia de la clonación animal aún no es la óptima, es necesario continuar con su estudio, debido a que mediante ella, se puede contribuir en el desarrollo de investigación básica, ya que permite el estudio de diversos procesos del desarrollo embrionario y de reprogramación nuclear (Niemann *et al.*, 2008). Además hay que considerar los reportes recientes que han mostrado que los individuos nacidos por clonación, han llegado al estado adulto mostrando un desarrollo normal (Folch *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013).

En cuanto a los aspectos prioritarios que se han sugerido para mejorar las tasas de desarrollo y evitar malformaciones en los individuos nacidos por clonación, se encuentran la calidad de los ovocitos y la maduración *in vitro* (MIV) (Camargo *et al.*, 2006). Los cuales son

fundamentales, debido a que los ovocitos recibirán el núcleo de la célula somática del individuo que se desee clonar. Por lo tanto, se requiere establecer estrategias que mejoren la calidad de los ovocitos y contribuir así, a un mejor desarrollo embrionario.

Durante la maduración *in vitro* los ovocitos están involucrados en diversos procesos que son responsables para alcanzar una correcta maduración nuclear y citoplasmática (Ali *et al.*, 2006). Un factor importante que puede afectar la MIV de los ovocitos, es el estrés oxidativo, el cual provoca un desequilibrio entre la cantidad de oxidantes y antioxidantes naturales dentro de la célula, pudiendo causar daños en el ovocito (Combelles *et al.*, 2009). Para reducir el daño oxidativo y aumentar la calidad de los ovocitos se ha propuesto el uso durante la MIV de diversas sustancias químicas con propiedades antioxidantes (De Matos *et al.*, 2000; You *et al.*, 2010; Tao *et al.*, 2010). De entre estas sustancias se ha reportado que el resveratrol (*trans-resveratrol*) al ser utilizado durante la MIV de ovocitos mejora el desarrollo embrionario *in vitro* en porcinos, bovinos y caprinos (Kwak *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

El resveratrol (3,4',5-trihidroxi estilbeno) es un polifenol natural presente en plantas como poligonum (*Polygonum cuspidatum*) y la vid (*Vitis vinífera*). Se ha utilizado como antioxidante, antiinflamatorio, cardioprotector y anticancerígeno (Gambini *et al.*, 2013). En condiciones *in vitro* se ha usado por su capacidad de mantener en balance la cantidad de oxidantes y antioxidantes dentro de las células, siendo un eficiente eliminador de radicales libres y ERO (Hussein, 2011). Además se ha reportado, que el resveratrol regula la expresión de genes relacionados con la apoptosis como *Bax*, *Bak* y *Caspasa-3* (Kwak *et al.* 2012) y presenta la capacidad de activar la SIRT1, aumentando la función mitocondrial y el contenido de ATP en los ovocitos (Itami *et al.* 2015). De manera que el efecto del resveratrol

durante la MIV, no solo se presente durante el proceso de maduración, si no que continúe durante el desarrollo embrionario temprano.

Después de una revisión bibliográfica, no se encontraron reportes del efecto del resveratrol durante la MIV de ovocitos de ovino, ni tampoco sobre el desarrollo temprano de embriones de ovino clonados, lo cual hace inédito el estudio que ésta tesis presenta. Sin embargo, se encontraron estudios donde se evaluó el efecto de este antioxidante sobre la tasa de MIV y su impacto en el desarrollo embrionario, en porcinos (Kwak *et al.*, 2012), bovinos (Pocar *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2014) y caprinos (Mukherjee *et al.*, 2014). Al no haber reportes en ovino, en este trabajo se evaluó el efecto de distintas concentraciones de resveratrol (0, 0.5, 2 y 5 μM) sobre la tasa de MIV y se determinaron las ERO intracelulares en ovocitos de ovino y su impacto en el desarrollo y calidad de los embriones clonados.

MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente tesis, se determinó que el tratamiento con resveratrol durante la MIV, presentó un efecto que es dependiente de la concentración. Si bien, los resultados no mostraron diferencias significativas sobre los porcentajes de maduración nuclear a 0, 0.5 y 2 μM de resveratrol (74.2, 81.3 y 72%, respectivamente, $P > 0.05$), se consideró como óptima la concentración 0.5 μM , debido a que ésta tendió a aumentar el porcentaje de maduración nuclear. Por otro lado, la concentración 5 μM disminuyó significativamente ($P < 0.05$) el porcentaje de maduración nuclear (56.0%) en comparación con las otras concentraciones, lo que coincide con lo reportado por Mukherjee *et al.* (2014) quienes concluyeron que el resveratrol a 5 μM durante la MIV de ovocitos caprinos, disminuye la maduración nuclear, debido a un desequilibrio entre los niveles de

oxidantes y antioxidantes intracelulares. Posiblemente la disminución en el porcentaje de maduración nuclear, también esté relacionado con la capacidad que presenta el resveratrol de inhibir la actividad de las fosfodiesterasas, lo que se traduce en un aumento en la concentración de AMPc (Tennen *et al.*, 2012); ya que, como se ha descrito, niveles altos de AMPc inhiben la progresión de la meiosis, mientras que niveles bajos la activan (Tarazona *et al.*, 2010).

En esta tesis, el porcentaje de MIV del grupo control (74.2%) fue similar al obtenido por Fernández-Reyes *et al.* (2012) con el 70%, pero menor al obtenido por Accado *et al.* (2004) con el 84%, Shirazi *et al.* (2007) con el 82% y Salas (2014) con el 80%. El porcentaje obtenido posiblemente se atribuye a que en las técnicas de clonación, hay una manipulación excesiva de los ovocitos que provoca que no todos sobrevivan, por lo tanto es necesario contar con el mayor número posible de ellos, de tal forma que se colectan hasta 4 o 5 por ovario, a pesar de que no todos ellos provengan de los folículos más desarrollados como los que se utilizan en la fertilización *in vitro*, razón por la cual los trabajos de clonación reportan menores tasas de MIV. Al respecto Mukherjee *et al.* (2014) quienes obtuvieron por clonación embriones caprinos, reportaron un 72.6% de MIV en el grupo control, además también evaluaron distintas concentraciones de resveratrol sobre el porcentaje de MIV, observando un efecto benéfico a 0.25 y 0.5 μM (76.9 y 76.5%), pero a 5 μM (65.5%) el resveratrol resultó perjudicial, similar a lo obtenido en la presente tesis. Por su parte Kwak *et al.* (2012) quienes evaluaron el resveratrol en la MIV de ovocitos porcinos, reportaron para las concentraciones 0, 0.5, 2 y 10 μM , porcentajes de maduración de 84.1, 84.1, 88.3 y 75%, respectivamente, donde, similar a lo observado en esta tesis, hay un efecto que depende de la concentración, en el cual a 2 μM de resveratrol, aumentó el porcentaje de MIV de los ovocitos, pero con la concentración mayor (10 μM) disminuyó significativamente. Si bien los porcentajes de MIV

obtenidos en esta tesis no son altos, es importante recordar que no basta con tener mayores índices de maduración nuclear, sino que el efecto del resveratrol a través de un óptimo balance de óxido-reducción, repercute en otras funciones tales como la maduración citoplasmática y especialmente en la regulación de la expresión de genes apoptóticos (*Bax*, *Bak* y *Caspasa-3*), lo cual podría contribuir a mediano y largo plazo, en un mejor desarrollo embrionario y fetal (Kwak *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2014).

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Al determinar las ERO intracelulares en los ovocitos madurados *in vitro* con resveratrol, se obtuvieron los valores más altos con las concentraciones 0 y 5 μM (58,000 y 55,000 unidades de fluorescencia), en tanto que a 0.5 y 2 μM hubo una reducción de 13.7 y 18.9%, con respecto al control, sin embargo esta diferencia no fue significativa. Lo cual difiere con lo reportado por Mukherjee *et al.* (2014), quienes al determinar las ERO en ovocitos de caprino, si encontraron diferencias significativas, reportando los niveles más altos a 0 y 5 μM y los menores a 0.25 y 0.5 μM , pero con una diferencia entre ellas del 30%. Por su parte, Kwak *et al.*, (2012) en ovocitos porcinos, obtuvieron los valores más altos a 0 y 10 μM y los menores a 0.2 y 2 μM , con disminución de 30 y 60% respectivamente, en comparación al control, lo cual también difiere con lo reportado aquí.

Tanto Mukherjee *et al.* (2014), como Kwak *et al.* (2012) reportan que el resveratrol disminuye los niveles de ERO en los ovocitos, debido a que el resveratrol a concentraciones óptimas aumenta los niveles de GSH intracelulares, lo que se traduce en un efecto benéfico en la maduración de los ovocitos.

Si bien, en el presente trabajo las diferencias no fueron significativas, se consideraron como óptimas las concentraciones a 0.5 y 2 μM de resveratrol, debido a que estas concentraciones no afectaron la MIV de los ovocitos, a diferencia de la concentración 5 μM en la cual disminuyó significativamente el porcentaje de maduración. Al no haber diferencia en los niveles intracelulares de ERO en los ovocitos, se propone que el efecto antioxidante del resveratrol no fue suficiente para disminuir significativamente las ERO y que posiblemente se estén afectando otras vías de señalización, dando como resultado una ineficiente maduración de los ovocitos. Lo cual podría explicar por qué los niveles de ERO en los grupos tratados con 0 y 5 μM son semejantes, pero los porcentajes de MIV entre ellos son opuestos, evidenciando que no hay relación directa entre ambas variables.

DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO*

En cuanto al desarrollo de los embriones clonados a partir de ovocitos madurados *in vitro* tratados con resveratrol, en la presente tesis no se hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) entre tratamientos (0, 0.5, 2 y 5 μM), sobre el porcentaje de embriones divididos (81.2, 84.4, 80.1 y 77.2%, respectivamente). Sin embargo a 5 μM de resveratrol, hubo una tendencia a reducir la tasa de desarrollo embrionario a la etapa de mórulas (32.8, 35.1, 28.7 y 6.8%) siendo más marcada esta reducción en la etapa de mórula compacta (6.2, 10.7, 0 y 0%). Esto evidencia que el tratamiento de 5 μM de resveratrol durante la MIV de ovocitos de ovino, efectivamente tiene un impacto deletéreo a largo plazo que se manifiesta durante el desarrollo embrionario temprano. En contraparte, el efecto positivo del tratamiento a 0.5 μM durante la MIV, se mantuvo durante el desarrollo embrionario. El impacto a largo plazo, posiblemente se deba a que el resveratrol a bajas concentraciones durante la MIV,

disminuye la expresión de genes proapoptóticos como *Bax* en los ovocitos (Mukherjee *et al.*, 2014). Posiblemente el resveratrol también está fomentando una óptima maduración citoplasmática, la cual ha demostrado ser fundamental para alcanzar un óptimo desarrollo embrionario (Kwak *et al.*, 2012)

Mukherjee *et al.* (2014) reportan en ovocitos caprinos madurados *in vitro* con resveratrol y luego clonados manualmente, porcentajes de embriones divididos (71.6, 73.1, 73.5 y 63 %), mórulas (22.3, 25.3, 23.5 y 16.9%) y blastocistos (16.4, 22.3, 14.7 y 9.2%) entre tratamientos (0, 0.5, 2 y 5 μ M, respectivamente). Sus resultados muestran que en caprinos, a semejanza de lo obtenido en ovinos en esta tesis, la concentración de 0.5 μ M favorece el desarrollo embrionario, en tanto que a 5 μ M se reduce. Resulta evidente que los resultados obtenidos en la presente tesis y los de Mukherjee *et al.* (2014) son semejantes en cuanto a la tasa de MIV, sin embargo en los porcentajes de mórulas son menores en estos autores, pero superiores en la formación de blastocistos, estadio que en el presente trabajo no se logró obtener. Esto probablemente obedezca a las particularidades de la especie utilizada o a la excesiva manipulación empleada en esta metodología, la cual aún debe revisarse y en su caso, mejorarse.

Por su parte Wang *et al.* (2014) utilizando resveratrol en la MIV de ovocitos de bovino a concentraciones de 0, 0.1, 1 y 10 μ M y luego fertilizados *in vitro*, reportaron que en los porcentajes de formación de blastocistos (15, 15, 30 y 18%, respectivamente), hubo una eficiencia mayor a concentraciones de 1 μ M. Ellos mencionan que el efecto benéfico del resveratrol no se debe solo a su actividad antioxidante, e indican que el principal efecto del resveratrol se debe a la capacidad que éste tiene de regular la expresión de la SIRT1. La cual participa en la regulación de la biogénesis mitocondrial, incluyendo la generación de ATP y la regulación de AMPK, el cual incrementa la β -oxidación y por tanto, el consumo de

ácidos grasos (Itami *et al.*, 2015) beneficiando el desarrollo embrionario. En contraste, la concentración óptima (1 μM) reportada por Wang *et al.* (2014) difiere con lo ya mencionado en ovinos y caprinos en los cuales la concentración de resveratrol más eficiente fue 0.5 μM .

Por otro lado, Kwak *et al.* (2012) utilizaron el resveratrol a concentraciones 0, 2 y 10 μM durante la MIV de ovocitos porcinos y fertilizados *in vitro*. Ellos encontraron una tasa mayor de blastocistos a 2 y 10 μM (20.5% y 11.7%), respecto a 0 μM (11%), donde 2 μM resultó ser la más eficiente, contrastando con lo reportado en bovinos por Wang *et al.* (2014), en caprinos por Mukherjee *et al.* (2014) y lo reportado en esta tesis para ovinos.

Es claro que las concentraciones óptimas de resveratrol para cada especie son distintas, posiblemente debido a la sensibilidad que cada especie tiene a este antioxidante. Sin embargo, es evidente que hay una mayor similitud entre los resultados obtenidos en el presente trabajo en ovinos y los obtenidos por Mukherjee *et al.* (2014) en caprinos, estas similitudes posiblemente se deben a que estas dos especies (*Ovis aries* y *Capra hircus*), filogenéticamente son muy cercanas, ya que ambas pertenecen a la subfamilia *Caprinae* (Groves y Shields, 1996), además de que presentan muchas similitudes anatómicas y morfológicas entre ellas (Halstead y Collins, 2002).

CALIDAD MORFOLÓGICA EMBRIONARIA

La calidad embrionaria ha sido un tema recurrente e importante por definir, debido a que lo más utilizado para su entendimiento y estudio, ha sido mediante la observación de características morfológicas sin necesidad de tinciones. Recordemos que al teñir y fijar los embriones para evaluar su calidad, se reduce el número de embriones disponibles para su posible transferencia a madres subrogadas para continuar su desarrollo. Por esta razón es

común que en ciertas ocasiones se prefiera basarse en criterios morfológicos como parte importante de la evaluación de la calidad embrionaria (Bo y Mapletoft, 2013). Entre los criterios utilizados para evaluar morfológicamente los ovocitos, se encuentran; la simetría de los blastómeros, el color del citoplasma, la presencia de vesículas, el tamaño de la masa celular en relación al espacio perivitelino y que el desarrollo esté de acuerdo con la edad del embrión (Stringfellow y Seidel, 1990).

Con respecto a lo reportado en esta tesis, en la evaluación morfológica de la calidad en embriones de 8 a 16 blastómeros, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre calidades, sin embargo, se observó una tendencia a que los embriones que procedieron de ovocitos MIV con $0.5 \mu\text{M}$ de resveratrol, tuvieron mayor valor en la calidad 1 (excelente) y menor en calidad 4 (mala).

En tanto que, la calidad morfológica de las mórulas mostró, a $0.5 \mu\text{M}$, una tendencia a mejorar los ovocitos de calidad excelente y una reducción significativa en los embriones de calidad mala. Estos resultados confirman que el tratamiento con $0.5 \mu\text{M}$ de resveratrol durante la MIV de ovocitos de ovino, presenta un impacto positivo que se mantiene durante el desarrollo embrionario y repercute en la calidad de los embriones.

Todo lo anterior muestra que la suplementación con resveratrol durante la MIV de ovocitos, a bajas concentraciones mejora la maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos, a través de la reducción de los niveles intracelulares de ERO, manteniendo así un equilibrio oxidativo dentro del ovocito. Y en conjunto con la reducción de la expresión de genes proapoptóticos, se alcanza un mejor desarrollo embrionario.

9. CONCLUSIONES

El tratamiento con resveratrol durante la MIV de ovocitos de ovino, presentó un efecto que es dependiente de la concentración, debido a que se observó una tasa mayor de maduración nuclear en los ovocitos tratados con 0.5 μM , en tanto que a 5 μM ésta disminuyó significativamente.

El resveratrol no redujo las concentraciones intracelulares de ERO en los ovocitos de ovino madurados *in vitro*. Sin embargo, se observó una tendencia a disminuir la cantidad de ERO en los ovocitos a concentraciones de 0.5 y 2 μM , pero esta diferencia no fue significativa.

El tratamiento con 0.5 μM de resveratrol en la MIV de ovocitos de ovino, aumentó el porcentaje de mórulas compactas. En tanto que a 5 μM disminuyeron la tasa de desarrollo y la calidad de los embriones de ovino clonados.

De lo anterior se concluye que, el resveratrol adicionado en el medio de MIV, no aumentó significativamente la tasa de maduración nuclear, ni redujo las ERO intracelulares en ovocitos de ovino. Sin embargo, con el tratamiento con 0.5 μM de resveratrol durante la MIV, promovió la compactación y calidad de las mórulas clonadas. En tanto que a 5 μM , disminuyó el porcentaje de MIV de los ovocitos, así como el subsecuente desarrollo y calidad embrionaria.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abeydeera, L.R., Wang, W.H., Cantley, T.C., Prather, R.S., Day, B.N. 1998. Presence of β -mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology*. 50(5):747-756.
- Abou-Zeid, L.A., El-Mowafy, A.M. 2004. Differential recognition of resveratrol isomers by the human estrogen receptor-alpha: molecular dynamics evidence for stereoselective ligand binding. *Chirality*. 16:190-195.
- Accardo, C., Dattena, M., Pilichi, S., Mara, L., Chessa, B., Cappai, P. 2004. Effect of recombinant human FSH and LH on in vitro maturation of sheep oocytes; embryo development and viability. *Animal Reproduction Science*. 81(1):77-86.
- Agarwal, B., Baur, J.A. 2011. Resveratrol and life extension. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1215(1):138-143.
- Akshey, Y.S., Malakar, D., De, A.K. 2008. Production of handmade cloned goat blastocysts using fetal fibroblast cells. *Reproduction, Fertility and Development*. 20:91-92.
- Ali, A.A., Bilodeau, J.F., Sirard, M.A. 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology*. 59(3):939-949.
- Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D.T., Pollock, J.S., Destrempe, M.M., Cammuso, C. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology*. 17(5):456-61.
- Beaujean, N., Taylor, J., Gardner, J., Wilmut, I., Meehan, R., Young, L. 2004. Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction*. 71(1):185-193.
- Beyhan, Z., Milatipova, M., Chang, T.C., First, N. 2002. Donor cell passage number, starvation period and fusion-activation interval affect preimplantation development of bovine nuclear transfer embryos. *Theriogenology*. 57:396.
- Bó, G.A., Mapletoft, R.J. 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction Science*. 10(3):344-348.
- Bols, P.E., Vandenheede, J.M., Van Soom, A., De Kruif, A. 1995. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology*. 43(3):677-687.

- Bowers, J.L., Tyulmenkov, V.V., Jernigan, S.C., Klinge, C.M. 2000. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 141:3657-3667.
- Bren, L. 2003. Cloning: revolution or evolution in animal production. *Food and Drug Administration*. 37(3):28-33.
- Briggs, S.R., King, T.J. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs eggs. *Zoology*. 38:455-563.
- Camargo, L.S., Viana, J.H., Sá, W.F., Ferreira, A.M., Ramos, A.A. 2006. Factors influencing in vitro embryo production. *Animal Reproduction*. 3(1):19-28.
- Campbell, K.H., Loi, P., Otaegui, P.J., Wilmut, I. 1996. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Reviews of Reproduction*. 1:40-46.
- Catalgol, B., Batirel, S., Taga, Y., Ozer, N.K. 2012. Resveratrol: French paradox revisited. *Frontiers in Pharmacology*. 3(141):1-18.
- Chesne, P., Adenot, P.G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L., Renard, J.P. 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotechnology*. 20:366-369.
- Choi, Y.H., Carnevale, E.M., Seidel, G.E., Squires, E.L. 2001. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology*. 56(4):661-670.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A., Robl, J.M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*. 280:1256-1258.
- Combelles, C.M., Gupta, S., Agarwal, A. 2009. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes?. *Reproductive biomedicine online*. 18(6):864-880.
- Cornejo, G.V. 2009. Fisiología de la reproducción humana. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*. 1(4):115-130.
- Cotterill, M., Harris, S.E., Fernandez, E.C., Lu, J., Huntriss, J.D., Campbell, B.K., Picton, H.M. 2013. The activity and copy number of mitochondrial DNA in ovine oocytes throughout oogenesis in vivo and during oocyte maturation in vitro. *Molecular Human Reproduction*. 19(7):444-450.
- Critser, E.S., First, N.L. 1986. Use of a fluorescent stain for visualization of nuclear material in living oocytes and early embryos. *Stain Technology*. 61:1-5.

- De Loos, F., Kastrop, P., Van Maurik, P., Van Beneden, T.H., Kruip, T.A.M. 1991. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Molecular Reproduction and Development*. 28:255-259.
- De Matos, D.G., Furnus, C.C. 2000. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*. 53(3):761-771.
- Diaz, A.M., Bustos, J.E., Ulloa, S.M., Jaramillo, L.C. 2013. Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 4(1):65-80.
- Driancourt, M.A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55:1211-1239.
- Du, F., Shen, P.C., Xu, J., Sung, L.Y., Jeong, B.S., Nedambale, T.L., Yang, X. 2006. The cell agglutination agent, phytohemagglutinin-L, improves the efficiency of somatic nuclear transfer cloning in cattle (*Bos taurus*). *Theriogenology*. 65(3):642-657.
- Du, Y., Kragh, P.M., Zhang, Y., Li, J., Schmidt, M., Bogh, I.B. 2007. Piglets born from handmade cloning, an innovative cloning method without micromanipulation. *Theriogenology*. 68:1104-1110.
- Dutta, R., Malakar, D., Akshey, Y.S., Sahu, S., Jena, M.K., Banerjee, D. 2011. Production and characterization of putative ntES cells from handmade cloned goat embryos derived from adult fibroblast donor cells. *Journal of Reproductive Biotechnology and Fertility*. 2:64-76.
- EFSA. 2012. Animal Health and Welfare and Environmental Impact of Animals derived from SCNT cloning and their Offspring, and Food Safety of Products Obtained from those Animals. *European Food Safety Authority Journal*. 10(7):2794.
- Elsheikh, A.S. 2007. Handmade cloning of mammals. *African Journal of Biotechnology*. 6(16):1862-1868.
- Elsheikh, A.S., Takahashi, Y., Hishinuma, M., Nour, M.S.M., Kanagawa, H. 1997. Effect of encapsulation on development of mouse pronuclear stage embryos in vitro. *Animal Reproduction Science*. 48(2):317-324.
- Elsheikh, A.S., Takahashi, Y., Katagiri, S., Kanagawa, H. 2006. Sucrose exposed chemically enucleated mouse oocytes support blastocyst development of reconstituted embryos. *Reproduction, Fertility and Development*. 18:697-701.
- Eppig, J.J., Downs, S.M. 1984. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biology of Reproduction*. 30:1-11.

- Fernández-Reyez, F., Ducolomb, Y., Romo, S., Casas, E., Salazar, Z., Betancourt, M. 2012. Viability, maturation and embryo development in vitro of immature porcine and ovine oocytes vitrified in different devices. *Cryobiology*. 64(3):261-266.
- Ferreira, E.M., Vireque, A.A., Adona, P.R., Meirelles, F.V., Ferriani, R.A., Navarro, P.A.A.S. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 71(5):836-848.
- Florman, H., Ducibella, T. 2006. Fertilization in Mammals. En: *The Physiology of Reproduction*, Knobil y Neill. Editado por Neill, J. Tercera Edición. Elsevier. Academic Press. USA. 2:56-75.
- Folch, J., Cocero, M.J., Chesne, P. 2009. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*. 71:1026-1034.
- Forcada, F., Casao, A., Abecia, J. 2009. Producción "in vivo" de embriones ovinos: implicaciones de I+D. PR: Pequeños Ruminantes. 10(2):14-19. Trabajo presentado en el segundo congreso internacional de ciencias veterinarias. Puebla, México.
- Fortune, J.E., Rivera, G.M., Evans, A.C., Turzillo, A.M. 2001. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of Reproduction*. 65:648-654.
- Fulka, J., Moor, R.M. 1993. Non invasive chemical enucleation of mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 34:427-430.
- Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N., Duchi, R., Lazzari, G. 2003. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature*. 424(6949):635-635.
- Galli, C., Lagutina, I., Duchi, R., Colleoni, S., Lazzari, G. 2008. Somatic cell nuclear transfer in horses. *Reproduction in Domestic Animals*. 43(s2):331-337.
- Gambini, J., López-Grueso, R., Olaso-González, G., Inglés, M., Abdelazid, K., El Alami, M., Viña, J. 2013. Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*. 48(2):79-88.
- Gehm, B.D., McAndrews, J.M., Chien, P.Y., Jameson, J.L. 1997. Resveratrol a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94:14138-14143.
- George, A., Sharma, R., Singh, K.P., Panda, S.K., Singla, S.K., Palta, P. 2011. Production of cloned and transgenic embryos using buffalo (*Bubalus bubalis*) embryonic stem cell-like cells isolated from in vitro fertilized and cloned blastocysts. *Cellular Reprogramming*. 13:263-272.

- Gibbons, J., Arat, S., Rzucidlo, J., Miyoshi, K., Waltenburg, R., Respass, D. 2002. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biology of Reproduction*. 66:895-900.
- Gómez, M.C., Earle Pope, C., Giraldo, A., Lyons, L.A., Harris, R.F., King, A.L., Dresser, B. L. 2004. Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning and Stem Cells*. 6(3):247-258.
- Grazul-Bilska, A.T., Choi, J.T., Bilski, J. J., Weigl, R. M., Kirsch, J. D., Kraft, K.C., Redmer, D.A. 2003. Effects of epidermal growth factor on early embryonic development after in vitro fertilization of oocytes collected from ewes treated with follicle stimulating hormone. *Theriogenology*. 59(5):1449-1457.
- Groves, P., Shields, G. F. (1996). Phylogenetics of the Caprinae based on cytochrome b sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 5(3):467-476.
- Hadi, S.M., Ullah, M.F., Azmi, A.S., Ahmad, A., Shamim, U., Zubair, H. 2010. Resveratrol mobilizes endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for chemoprevention of cancer. *Pharmaceutical Research*. 27:979-988.
- Hall, V.J., Ruddock, N.T., Cooney, M.A., Korfiatis, N.A., Tecirlioglu, R.T., Downie, S. 2006. Production of a cloned calf using zona-free serial nuclear transfer. *Theriogenology*. 65:424-440.
- Halstead, P., Collins, P., Isaakidou, V. 2002. Sorting the sheep from the goats: Morphological distinctions between the mandibles and mandibular teeth of adult Ovis and Capra. *Journal of Archaeological Science*. 29(5):545-553.
- Han, Y.M., Kang, Y.K., Koo, D.B., Lee, K.K. 2003. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced in vitro. *Theriogenology*. 59:33-44.
- Hill, J.R., Winger, Q.A., Long, C.R., Looney, C.R., Thompson, J.A., Westhusin, M.E. 2000. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biology of Reproduction*. 62(5):1135-1140.
- Hosseini, S. M., Hajian, M., Asgari, V., Forozanfar, M., Abedi, P., Nasr-Esfahani, M. H. 2007. Novel approach of differential staining to detect necrotic cells in preimplantation embryos. *Iranian Journal of Fertility and Sterility*. 1(3):103-106.
- Hosseini, S.M., Hajian, M., Moulavi, F., Asgari, V., Forozanfar, M., Nasr-Esfahani, M.H. 2013. Cloned sheep blastocysts derived from oocytes enucleated manually using a pulled pasteur pipette. *Cellular Reprogramming*. 15(1):15-23.

- Hosseini, S.M., Moulavi, F., Foruzanfar, M., Hajian, M., Abedi, P., Rezazade-Valojerdi, M., Nasr-Esfahani, M. H. 2008. Effect of donor cell type and gender on the efficiency of in vitro sheep somatic cell cloning. *Small Ruminant Research*. 78(1):162-168.
- Hsieh, T.C., Wu, J. M. 1999. Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Experimental Cell Research*. 249(1):109-115.
- Hussein, M.A. 2011. A convenient mechanism for the free radical scavenging activity of resveratrol. *International Journal of Phytomedicine*. 3(4):459-469.
- Itami, N., Shirasuna, K., Kuwayama, T., Iwata, H. 2015. Resveratrol improves the quality of pig oocytes derived from early antral follicles through sirtuin 1 activation. *Theriogenology*. 83(8):1360-1367.
- Jaenisch, R. 2004. Human cloning the science and ethics of nuclear transplantation. *The New England Journal of Medicine*. 351(27):2787-2791.
- Jang, G., Kim, M.K., Oh, H.J., Hossein, M.S., Fibrianto, Y.H., Hong, S.G. Lee, B.C. 2007. Birth of viable female dogs produced by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*. 67(5):941-947.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., Adrian, M. 2002. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:2731-2741.
- Jena, M.K., Malakar, D., De, A.K., Garg, S., Akshey, Y.S., Dutta, R. Kaushik, J.K. 2012. Handmade cloned and parthenogenetic goat embryos A comparison of different culture media and donor cells. *Small Ruminant Research*. 105(1):255-262.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H., Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
- Kato, Y., Tani, T., Tsunoda, Y. 2000. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 120(2):231-237.
- Keefer, C.L., Keyston, R., Lazaris, A., Bhatia, B., Begin, I., Bilodeau, A.S. 2002. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biology of Reproduction*. 66:199-203.
- Khan, F.A., Bhat, M.H., Yaqoob, S.H., Waheed, S.M., Naykoo, N.A., Athar, H. 2014. In vitro development of goat-sheep and goat-goat zona-free cloned embryos in different culture media. *Theriogenology*. 81:419-423.

- Kim, M.K., Jang, G., Oh, H.J., Yuda, F., Kim, H.J., Hwang, W.S. 2007. Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells*. 9(1):130-137.
- Kim, Y., Choi, B.T., Lee, Y.T., Park, D.I., Rhee, S.H., Park, K.Y., Choi, Y.H. 2004. Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells. *Oncology Reports*. 11(2):441-446.
- Kosintsev, P.A., Lapteva, E.G., Trofimova, S.S., Zanina, O.G., Tikhonov, A.N., Van der Plicht, J. 2010. The intestinal contents of a baby woolly mammoth (*Mammuthus primigenius* Blumenbach, 1799) from the Yuribey River (Yamal Peninsula). *Doklady Biological Sciences*. 432(1):209-211.
- Kragh, P.M., Vajta, G., Corydon, T.J., Purup, S., Bolund, L., Callesen, H. 2004. Production of transgenic porcine blastocysts by hand-made cloning. *Reproduction, Fertility and Development*. 16(3):315-318.
- Krisher, R.L. 2004. The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*. 82(13):E14-E23.
- Kruip, T.A., Dieleman, S.J. 1982. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reproduction Nutrition Development*. 22:465-473.
- Kubota, C., Yamakuchi, H., Todoroki, J., Mizoshita, K., Tabara, N., Barber, M., Yang, X. 2000. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(3):990-995.
- Kwak, S.S., Cheong, S.A., Jeon, Y., Lee, E., Choi, K.C., Jeung, E.B., Hyun, S.H. 2012. The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology*. 78(1):86-101.
- Lagutina, I., Lazzari, G., Duchi, R., Colleoni, S., Ponderato, N., Turini, P. 2005. Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction*. 130:559-567.
- Lagutina, I., Lazzari, G., Galli, C. 2006. Birth of cloned pigs from zona-free nuclear transfer blastocysts developed in vitro before transfer. *Cloning Stem Cells*. 8:283-293.
- Lanza, R.P., Cibelli, J.B., Diaz, F., Moraes, C.T., Farin, P.W., Farin, C.E., Damiani, P. 2000. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning*. 2(2):79-90.
- Lee, B.C., Kim, M.K., Jang, G., Oh, H.J., Yuda, F., Kim, H.J., Hossein, M.S., Kim, J.J., Kang, S.K., Schatten, G., Hwang, W.S. 2005. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*. 436:641.

- Lee, K., Wang, C., Chaille, J.M., Machaty, Z. 2010. Effect of resveratrol on the development of porcine embryos produced in vitro. *Journal of Reproduction and Development*. 56(3):330-335.
- Lee, S., Park, E.J., Moon, J.H., Kim, S.J., Song, K., Lee, B.C. 2015. Sequential treatment with resveratrol-trolox improves development of porcine embryos derived from parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*. 84(1):145-154.
- Li, Z., Sun, X., Chen, J., Liu, X., Wisely, S.M., Zhou, Q., Renard, J.P., Leno, G.H., Engelhardt, J.F. 2006. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Developmental Biology*. 293:439-448.
- Liu, G.S., Zhang, Z.S., Yang, B., He, W. 2012. Resveratrol attenuates oxidative damage and ameliorates cognitive impairment in the brain of senescence-accelerated mice. *Life Sciences*. 91(17):872-877.
- Loi, P., Ptak, G., Barboni, B., Fulka, J., Cappai, P., Clinton, M. 2001. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nature biotechnology*. 19(10):962-964.
- Malik, H.N., Dubey, A.K., Singhal, D.K., Saugandhika, S., Mohapatra, S.K. Malakar, D. 2014. Generation of handmade cloned embryos from adipose tissue derived mesenchymal stem cells in goat. *Small Ruminant Research*. 121(2):340-350.
- Máximo, D.M., Da Silva, I.M., Mondadori, R.G., Neves, J.P., Lucci, C.M. 2012. Ultrastructural characteristics of sheep oocytes during in vitro maturation (IVM). *Small Ruminant Research*. 105(1):210-215.
- Meena, C.R. Das, S.K. 2006. Development of water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos from in vitro matured oocytes reconstructed with fetal skin fibroblast cells as donor nuclei. *Animal Reproduction Science*. 93:258-267.
- Meissner, A., Jaenisch, R. 2006. Mammalian nuclear transfer. *Developmental Dynamics*. 235:2460-2469.
- Mohapatra, S.K, Sandhu, A., Neerukattu, V.S., Singh, K.P., Selokar, N.L., Singla, S.K. 2015. Buffalo embryos produced by handmade cloning from oocytes selected using brilliant cresyl blue staining have better developmental competence and quality and are closer to embryos produced by in vitro fertilization in terms of their epigenetic status and gene expression pattern. *Cellular Reprogramming*. 17(2):141-150.
- Moor, R.M., Mattioli, M., Ding, J., Nagai, T., Cole, D.J., Foxcroft, G.R. Weir, B.J. 1990. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*. 40:197-210.

- Moro, L.N., Vichera, G., Olivera, R., Salamone, D. 2010. Evaluación de la enucleación asistida por demecolcina como método para evitar la exposición a luz UV en la producción de embriones bovinos por técnica de clonación. *InVet.* 12(2):195-204.
- Mukherjee, A., Malik, H., Saha, A. P., Dubey, A., Singhal, D. K., Boateng, S., Malakar, D. 2014. Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 31(2):229-239.
- Navarro-Maldonado, M.D.C., Hernández-Martínez, S., Vázquez-Avedaño, J.R., Martínez-Ibarra, J.L., Zavala-Vega, N.L., Vargas-Miranda, B., Rivera-Rebolledo, J.A., Ambríz-García, D.A. 2015. Deriva de células epiteliales de tejido de piel descongelado de *Ovis canadensis mexicana* para la formación de un banco de germoplasma. *Acta Zoológica Mexicana.* 31(2):275-282.
- Niemann, H., Tian, X.C., King, W.A., Lee, R.S.F. 2008. Epigenetic reprogramming in embryonic and fetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. *Reproduction.* 135:151-163.
- Oback, B. 2008. Climbing mount efficiency—small steps, not giant leaps towards higher cloning success in farm animals. *Reproduction in Domestic Animals,* 43(s2):407-416.
- Orallo, F. 2006. Comparative studies of the antioxidant effects of cis and trans resveratrol. *Current Medicinal Chemistry.* 13:87-98.
- Palacios, J.A., Herranz, D., De Bonis, M.L., Velasco, S., Serrano, M., Blasco, M.A. 2010. SIRT1 contributes to telomere maintenance and augments global homologous recombination. *The Journal of Cell Biology.* 191(7):1299-1313.
- Patel, H., Chougule, S., Chohan, P., Shah, N., Bhartiya, D. 2014. An ideal oocyte activation protocol and embryo culture conditions for somatic cell nuclear transfer using sheep oocytes. *Indian Journal of Experimental Biology.* 52(10):925-934.
- Pereira, A.F., Feltrin, C., Almeida, K.C., Carneiro, I.S., Avelar, S.R.G., Neto, A.A., Bertolini, M. 2013. Analysis of factors contributing to the efficiency of the in vitro production of transgenic goat embryos (*Capra hircus*) by handmade cloning (HMC). *Small Ruminant Research.* 109(2):163-172.
- Peura, T.T., Lewis, I.M., Trounson, A.O. 1998. The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle. *Molecular Reproduction and Development.* 50:185-191.
- Pivko, J., Landa, V., Kubovicova, E., Supova, A., Grafenau, P., Makarevic, A., Riha, L., Zibrin, M. 2003. Comparative morphometry of precompacted bovine embryos produced in vivo or in vitro after parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection (ICSI): ultrastructural analysis. *Zygote.* 11:207-217.

- Pocar, P., Augustin, R., Fischer, B. 2004. Constitutive expression of CYP1A1 in bovine cumulus oocyte-complexes in vitro: mechanisms and biological implications. *Endocrinology*. 145(4):1594-1601.
- Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., Dal, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L., Coleman, A., Campbell, K.H.S. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*. 407:86-90.
- Reggio, B.C., James, A.N., Green, H.L., Gavin, W.G., Behboodi, E., Echelard, Y. 2001. Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat: oocytes derived from both follicle stimulating hormone-stimulated and non stimulated abattoir-derived ovaries. *Biology of Reproduction*. 65:1528-1533.
- Ribeiro, E., Gerger, R.P., Ohlweiler, L.U., Ortigari, I., Mezzalana, J.C., Forell, F. 2009. Developmental potential of bovine hand-made clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. *Cloning and Stem Cells*. 11:377-386.
- Rienzi, L., Balaban, B., Ebner, T., Mandelbaum, J. 2012. The oocyte. *Human Reproduction*. 27(S1):i2-i21.
- Rizos, D., Burke, L., Duffy, P., Wade, M., Mee, J.F. 2005. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production in vitro. *Theriogenology*. 63(3):939-949.
- Robledo-Verduzco, J.M., Herrera-Camacho, J., Cajero-Juárez, M., Navarro-Maldonado, M.C., García-Valladares, A. 2009. Evaluación de dos medios de maduración in vitro para la producción de embriones ovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 10:95-99.
- Roh, S., Shim, H., Hwang, W.S., Yoon, J.T. 2000. In vitro development of green fluorescent protein (GFP) transgenic bovine embryos after nuclear transfer using different cell cycles and passages of fetal fibroblasts. *Reproduction, Fertility and Development*. 12(2):1-6.
- Saini, M., Selokar, N.L., Raja, A.K., Sahare, A.A., Singla, S.K., Chauhan, M.S. 2015. Effect of donor cell type on developmental competence, quality, gene expression, and epigenetic status of interspecies cloned embryos produced using cells from wild buffalo and oocytes from domestic buffalo. *Theriogenology*. 84:101-108.
- Salas, B.G. 2014. Momento del cambio de cultivo en un medio secuencial y el desarrollo temprano de embriones de ovinos in vitro. Tesis. Progrado en Producción Animal. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México. 62 pp.
- Sánchez, F., Smitz, J. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1822:1896-1912.

- Schrode, N., Xenopoulos, P., Piliszek, A., Frankenberg, S., Plusa, B., Hadjantonakis, A. K. 2013. Anatomy of a blastocyst: cell behaviors driving cell fate choice and morphogenesis in the early mouse embryo. *Genesis*. 51(4):219-233.
- Selokar, N.L., Shah, R.A., Saha, A.P., Muzaffar, M., Saini, M., Chauhan, M. S., Singla, S.K. 2012. Effect of post-fusion holding time, orientation and position of somatic cell-cytoplasts during electrofusion on the development of handmade cloned embryos in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 78(4):930-936.
- Senger, P. 2003. Pathways to pregnancy and parturition. Second Edition. Current Conceptions Inc. Pullman, Washington, USA. pp. 287-325.
- Shah, R.A., George, A., Singh, M. K., Kumar, D., Chauhan, M. S., Manik, R. Singla, S.K. 2008. Hand-made cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos: comparison of different media and culture systems. *Cloning and Stem cells*. 10(4):435-442.
- Shi, D., Lu, F., Wei, Y., Cui, K., Yang, S., Wei, J., Liu, Q. 2007. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biology of Reproduction*. 77:285-291.
- Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L., Westhusin, M. 2002. Cell biology: a cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*. 415(6874):859.
- Shirazi, A., Shams-Esfandabadi, N., Hosseini, S. M., Karimi, I. 2007. The presence of cumulus cells on nuclear maturation of sheep oocytes during in vitro maturation. *Small Ruminant Research*. 68(3):291-295.
- Shuster, E. 2003. Human cloning: category, dignity, and the role of bioethics. *Bioethics*. 17(5-6):517-525.
- Siemann, E.H., Creasy, L.L. 1992. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 43:49-52.
- Sinowatz, F., Topfer-Petersen, E., Kollé, S., Palma, G. 2001. Functional morphology of the zona pellucida. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 30(5):257-263.
- Smith, L.C. 1993. Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with H₂O₂ on bovine secondary oocytes matured in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*. 99:39-44.
- Soleas, G.J., Diamandis, E.P., Goldberg, D.M. 1997. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 11:287-313.
- Stringfellow, D., Seidel, S. 1990. Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. 2da. Edición. Illinois, EUA.

- Sudheer, S., Adjaye, J. 2007. Functional genomics of human pre-implantation development. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*. 6(2):120-132.
- Sun, X., Wang, S., Zhang, Y., Wang, H., Wang, L., Ying, L. 2008. Cell-cycle synchronization of fibroblasts derived from transgenic cloned cattle ear skin: effects of serum starvation, roscovitine and contact inhibition. *Zygote*. 16:111-116.
- Takeo, S., Sato, D., Kimura, K., Monji, Y., Kuwayama, T., Kawahara-Miki, R., Iwata, H. 2014. Resveratrol improves the mitochondrial function and fertilization outcome of bovine oocytes. *The Journal of Reproduction and Development*. 60(2):92-99.
- Tani, T., Shimada, H., Kato, Y., Tsunoda, Y. 2006. Demecolcine-assisted enucleation for bovine cloning. *Cloning and Stem Cells*, 8(1):61-66.
- Tao, Y., Chen, H., Tian, N.N., Huo, D.T., Li, G., Zhang, Y.H., Zhang, X.R. 2010. Effects of L-Ascorbic Acid, α -Tocopherol and Co-culture on In Vitro Developmental Potential of Porcine Cumulus Cells Free Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 45(1):19-25.
- Tarazona, A., López, A., Olivera-Ángel, M. 2010. La competencia del ovocito: qué, cómo y cuándo. *Acta Biológica Colombiana*. 15(3):3-18.
- Taylor-Robinson, A.W., Walton, S., Swain, D.L., Walsh KB, Vajta G. 2014a. The potential formodification in cloning and vitrification technology to enhance genetic progress in beef cattle in Northern Australia. *Animal Reproduction Science*. 148:91-96.
- Taylor-Robinson, A.W., Walton, S., Vajta, G. 2014. Production of a healthy farm-born calf by modified somatic cell nuclear transfer. *International Journal of Livestock Research*. 4(2):99-104.
- Tennen, R.I., Michishita-Kioi, E., Chua, K.F. 2012. Finding a target for resveratrol. *Cell*. 148(3):387-389.
- Tervit, H., Whittingham, D., Rowson, L. 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *Journal of Reproduction and Fertility*. 30(3):493-497.
- Trejo-García, E.C. 2006. Legislación internacional y estudio comparativo de la Clonación. Centro de Documentación, Información y Análisis. Dirección de Servicios de Investigación y Análisis. Subdirección de Política Exterior. 22 pp.
- Tsunoda, Y., Shioda, Y., Onodera, M., Nakamura, U. 1998. Differential sensitivity of mouse pronuclei and zygote cytoplasm to H₂O₂ staining and ultraviolet irradiation. *Journal of Reproduction and Fertility*. 82:173-178.
- Turner, R.T., Evans, G.L., Zhang, M., Maran, A., Sibonga, J.D. 1999. Is Resveratrol an estrogen agonist in growing rats?. *Endocrinology*. 140:50-54.

- Turrens, J.F. 2013. Reactive Oxygen Species. En: Encyclopedia of Biophysics. Springer Berlin Heidelberg. 2198-2200.
- Uribe, V.L., Correa-Orozco, A., Osorio, J.H. 2009. Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *BioSalud*. 8:117-131.
- Vajta, G. 2004. Production of a healthy calf by somatic cell nuclear transfer without micromanipulators and carbon dioxide incubators using the Handmade Cloning (HMC) and the Submarine Incubation System (SIS). *Theriogenology*. 62:1465-1472.
- Vajta, G., Holm, P., Greve, T., Callesen, H. 1996. Overall efficiency of in vitro embryo production and vitrification in cattle. *Theriogenology*. 45:683-689.
- Vajta, G., Lewis, I.M., Hyttel, P., Thouas, G.A., Trounson, A.O. 2001. Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning*. 3:89-95.
- Vajta, G., Lewis, I.M., Trounson, A.O., Purup, S., Maddox-Hyttel, P., Schmidt, M. 2003. Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. *Biology of Reproduction*. 68:571-578.
- Vajta, G., Maddox-Hyttel, P., Skou, C.T., Tecirlioglu, R.T., Peura, T.T., Lai, L., Callesen, H. 2006. Highly efficient and reliable chemically assisted enucleation method for handmade cloning in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*. 17(8):791-797.
- Vajta, G., Peura, T.T., Holm, P., Paldi, A., Greve, T., Trounson, A.O., Callesen, H. 2000. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: The Well of the Well (WOW) system. *Molecular Reproduction and Development*. 55(3):256-264.
- Van den Hurk, R., Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63(6):1717-1751.
- Verma, G., Arora, J. S., Sethi, R. S., Mukhopadhyay, C. S., Verma, R. 2015. Handmade cloning: recent advances, potential and pitfalls. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 6(1):1-10.
- Villavicencio, J.L., Pérez, R.O., Palacios-Espinosa, A., Méndez, J.V., Flores, C.F. 2007. Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *Interciencia: Revista de Ciencia y Tecnología de América*. 32(2):93-99.
- Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R., Yanagimachi, R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*. 394:369-374.
- Walker, K., Hill, L., Kleemann, O., Nancarrow, D. 1996. Development of ovine embryo in synthetic oviductal fluid containing amino acid at oviductal fluid concentrations. *Biology of Reproduction*. 55:703-708.

- Wang, F., Tian, X., Zhang, L., He, C., Ji, P., Li, Y., Liu, G. 2014. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 101(2):577-586.
- Wani, N.A. 2002. In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Research*. 44(2):89-95.
- Wani, N.A., Wernery, U., Hassan, F.A., Wernery, R., Skidmore, J.A. 2010. Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction*. 82:373-379.
- Wassarman, P. M. 2008. Zona pellucida glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*. 283(36):24285-24289.
- Watson, A., Barcroft, L. 2001. Regulation of blastocyst formation. *Bioscience*. 6:708-730.
- Watson, A.J., Natale, D.R., Barcroft, L.C. 2004. Molecular regulation of blastocyst formation. *Animal Reproduction Science*. 82:583-592.
- Wells, D.N., Misica, P.M., Tervit, H.R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biology of Reproduction*. 60(4):996-1005.
- Wilmut, I., Schnieke A.E., Mc Whir, J., Kind, A.J., Campbell, C.H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385:810-813.
- Woods, G.L., White, K.L., Vanderwall, D.K., Li, G.P., Aston, K.I., Bunch, T.D., Meerdo, L.N. Pate, B.J. 2003. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* 301:1063.
- Wu, G., Han, D., Gong, Y., Sebastiano, V., Gentile, L., Singhal, N., Schöler, H. R. 2013. Establishment of totipotency does not depend on Oct4A. *Nature Cell Biology*. 15(9):1089-1097.
- Wu, P.F., Xie, N., Zhang, J.J., Guan, X.L., Zhou, J., Long, L.H., Chen, J.G. 2013. Resveratrol preconditioning increases methionine sulfoxide reductases A expression and enhances resistance of human neuroblastoma cells to neurotoxins. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 24(6):1070-1077.
- Yin, X.J., Tani, T., Yonemura, I., Kawakami, M., Miyamoto, K., Hasegawa, R., Kato, Y., Tsunoda, Y. 2002. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biology of Reproduction*. 67:442-446.
- You, J., Kim, J., Lim, J., Lee, E. 2010. Anthocyanin stimulates in vitro development of cloned pig embryos by increasing the intracellular glutathione level and inhibiting reactive oxygen species. *Theriogenology*. 74(5):777-785.

- Yuan, Y., Krisher, R.L. 2012. In vitro maturation (IVM) of porcine oocytes. *Germline Development: Methods and Protocols*. 825:183-198.
- Zakhartchenko, V., Alberio, R. 2001. Clonación de animales de interés zootécnico. En: Palma, G. A. 2001. *Biotechnología de la reproducción*. Ediciones Reprobiootec.
- Zakhartchenko, V., Alberio, R., Stojkovic, M., Prella, K., Schernthaner, W., Stojkovic, P., Wolf, E. 1999. Adult cloning in cattle: potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures. *Molecular Reproduction and Development*. 54(3):264-272.
- Zhang, P., Zhang, Y., Dou, H., Yin, J., Chen, Y., Pang, X., Vajta, G., Bolund, L., Du, Y., Ma, R.Z. 2012. Handmade cloned transgenic piglets expressing the nematode fat-1 gene. *Cellular Reprogramming*. 14:258-266.
- Zhang, P., Liu, P., Dou, H., Chen, L., Chen, L., Lin, L., Tan, P., Vajta, G, Gao, J. Du, Y., Ma, R.Z. 2013. Handmade cloned transgenic sheep rich in omega-3 fatty acids. *PloS ONE*. 8(2):e55941.
- Zhang, Y. H., Song, E. S., Kim, E. S., Cong, P. Q., Lee, S. H., Lee, J. W. Park, C. S. 2009. Effects of donor cell passage, size and type on development of porcine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 22(2):194-200.
- Zhou, Q., Renard, J.P., Fries, G.L., Brochard, V., Beaujean, N., Cherifi, Y., Fraichard, A., Cozzi, J. 2003. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science*. 302:1179.
- Zhu, S.X., Sun, Z., Zhang, J. P. 2007. Ovine (*Ovis aries*) blastula from an in vitro production system and isolation of primary embryonic stem cells. *Zygote*. 15(01):35-41.

11. ANEXOS

COMPOSICIÓN TCM 199

| SALES INORGÁNICAS | mg/L | VITAMINAS | mg/L |
|---|----------|----------------------------|----------|
| CaCl ₂ H ₂ O | 265.00 | Ácido ascórbico | 0.050 |
| Fe(NO ₃) ₃ 9H ₂ O | 0.72 | Biotina | 0.010 |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 200.00 | Calciferol | 0.100 |
| KCL | 400.00 | Pantotenato de calcio | 0.010 |
| C ₂ H ₃ O ₂ Na | 50.00 | Cloruro de colina | 0.500 |
| NaCl | 6,800.00 | Ácido fólico | 0.010 |
| NaHCO ₃ | 2,200.00 | Inositol | 0.050 |
| NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O | 125.00 | Menadione | 0.010 |
| AMINOÁCIDOS | mg/L | Ácido nicotínico | 0.025 |
| L-alanina | 25.00 | Niacinamida | 0.025 |
| L-arginina.HCL | 70.00 | Ácido p-aminobenzóico | 0.050 |
| L-ácido aspártico | 30.00 | Piridoxal.HCL | 0.025 |
| L-cisteína.HCL.H ₂ O | 0.11 | Piridoxina.HCL | 0.025 |
| L-cistina | 26.00 | Riboflavina | 0.010 |
| L-ácido glutámico | 75.00 | Tiamina.HCL | 0.010 |
| L-glutamina | 100.00 | Acetato de retinol | 0.140 |
| Glicina | 50.00 | Fosfato de tocoferol Na | 0.01 |
| L-histidina.HCL.H ₂ O | 21.88 | OTROS COMPONENTES | mg/L |
| Hidroxiprolina | 10.00 | Adenina.sulfato | 10.00 |
| L-iso-leucina | 20.00 | Adenosina trifosfato -2 Na | 1.00 |
| L-lisina.HCL | 70.00 | Adenosina monofosfato -Na | 0.20 |
| L-fenilalanina | 25.00 | Colesterol | 0.20 |
| L-leucina | 60.00 | Deoxirribose | 0.50 |
| L-metionina | 15.00 | Glucosa | 1,000.00 |
| L-prolina | 40.00 | Glutathiona | 0.050 |
| L-serina | 25.00 | Guanina.HCL | 0.30 |
| L-treonina | 30.00 | Hipoxantina | 0.30 |
| L-triptofano | 10.00 | Rojo de fenol | 20.00 |
| L-tirosina | 57.70 | Ribosa | 0.50 |
| L-valina | 25.00 | Xantina na | 0.344 |
| | | Timina | 0.30 |
| | | Tween80 | 20.00 |
| | | Uracil | 0.30 |

Fuente: Vitrocell Embriolife, 2009 (<http://www.vitrocell.com.br>).

COMPOSICIÓN DMEM

| SALES INORGÁNICAS | | | |
|--|----------|-----------------------|----------|
| | mg/L | | |
| CaCl ₂ H ₂ O | 265.00 | L-serina | 42.00 |
| Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O | 0.10 | L-treonina | 95.00 |
| KCL | 400.00 | L-triptofano | 16.00 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 200.00 | L-tirosina | 104.20 |
| NaCL | 6,400.00 | L-valina | 94.00 |
| NaH ₂ PO ₄ H ₂ O | 125.00 | VITAMINAS | |
| NaHCO ₃ | 3,700.00 | | mg/L |
| AMINOÁCIDOS | | Cloruro de Colina | 4.00 |
| | mg/L | Pantotenato de calcio | 4.00 |
| L-arginina.HCL | 84.00 | Ácido fólico | 4.00 |
| L-cistina | 62.57 | Inositol | 7.20 |
| L-glutamina | 584.00 | Nicotinamida | 4.00 |
| Glicina | 30.00 | Piridoxal.HCL | 4.00 |
| L-histidina.HCL.H ₂ O | 42.00 | Riboflavina | 0.40 |
| L-isoleucina | 105.00 | Tiamina.HCL | 4.00 |
| L-leucina | 105.00 | OTROS COMPONENTES | |
| L-lisina.HCL | 146.00 | | mg/L |
| L-metionina | 30.00 | Glucosa | 1,000.00 |
| L-fenilalanina | 66.00 | Piruvato de sodio | 110.00 |
| | | Rojo de fenol | 15.00 |

Fuente: Vitrocell Embriolife, 2009 (<http://www.vitrocell.com.br>).

COMPOSICIÓN MEDIO SOF

| | |
|---------------------------------|------------|
| NaCl | 107.70 mM |
| KCl | 7.16 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1.19 mM |
| CaCl ₂ | 1.71 mM |
| MgCl ₂ | 0.49 mM |
| NaHCO ₃ | 25.07 mM |
| Lactato de Sodio | 3.30 mM |
| Piruvato de Sodio | 0.33 mM |
| Glucosa | 1.50 mM |
| Albúmina Sérica Bovina | 32 mg/ml |
| Penicilina (sal de sodio) | 100 U/ml |
| Estreptomina | 50 µg/ml |
| Osmoralidad | 270 mosmol |
| pH | 7.2 a 7.4 |

Fuente: Tervit *et al.*, 1972.