



## **ANÁLISIS DEL SECRETOMA DEL OVOCITO BOVINO (*Bos taurus*)**

**POR:**

**Q. B. P. BEATRIZ ELENA CASTRO VALENZUELA**

**Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias**


**Área Mayor: Reproducción y Genética Animal**

**Universidad Autónoma de Chihuahua**

**Facultad de Zootecnia y Ecología**


**Secretaría de Investigación y Posgrado**

Análisis del secretoma del ovocito bovino (*Bos taurus*). Tesis presentada por Beatriz Elena Castro Valenzuela como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, ha sido aprobada y aceptada por:



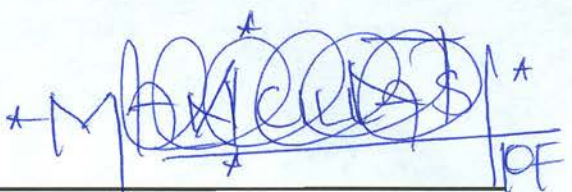
---

M. A. Luis Raúl Escárcega Preciado  
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología



---

M. C. Antonio Humberto Chávez Silva  
Secretario de Investigación y Posgrado



---

D. Ph. Pablo Fidel Mancillas Flores  
Coordinador Académico



---

D. Ph. María Eduviges Burrola Barraza  
Presidente

DICIEMBRE 17-2015

---

Fecha

Comité:

D. Ph. María Eduviges Burrola Barraza  
Ph. D. Juan Alberto Grado Ahuir  
D. Ph. Joel Domínguez Viveros  
Ph. D. Felipe Alonso Rodríguez Almeida

ii

© Derechos Reservados

**Beatriz Elena Castro Valenzuela**  
PERIFÉRICO FRANCISCO R.  
ALMADA KM. 1, CHIHUAHUA,  
CHIH., MÉXICO C.P. 31453

DICIEMBRE 2015

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por permitirme haber llegado a este momento de mi vida, por brindarme salud y fortaleza para superar todas las adversidades que se me han presentado; por poner en mi camino a personas maravillosas. Gracias Señor por permitirme cumplir un logro más en mi vida.

A mis hermanos, Lupita y Miguel, les agradezco la confianza depositada en mí, su amor y generosidad, la paciencia que siempre me han tenido. A mi mami y a mi papi les agradezco el haberme brindando las armas para salir adelante, por siempre impulsarme a realizar cosas nuevas, por contagiarme las ganas de triunfar.

A mi novio Alvaro le agradezco por nunca dejarme sola, por ser mi soporte, por apoyame en todo momento, por creer siempre en mí y que al igual que mis compañeros y amigos Danny, Edwin, Normando y Pollo, recorrimos juntos los estudios de posgrado. Gracias muchachos por brindarme su amistad. A Cynthia y Bertha les agradezco su orientación y apoyo incondicional. A mis amigos Karla, Cecy y César, que aunque se encuentran lejos siempre están dispuestos a ayudarme.

Agradezco al M. C. Ricardo Gámez y al Rastro Municipal TIF 366 de la Cd. de Chihuahua por facilitarme la obtención de muestras para llevar a cabo la presente investigación.

A la Dra. Leonor le agradezco haberme impulsado para ingresar al programa de Maestría en Ciencias. Gracias por el apoyo brindado para alcanzar esta meta!.

Agradezco al Ph. D. Felipe Rodríguez Almeida por los valiosos comentarios y recomendaciones realizados hacia el presente trabajo. A la Dra. Vicky le agradezco de todo corazón la confianza depositada en mí, por estar siempre al pie del cañón junto conmigo, por guiarme en la realización de este trabajo, por nunca abandonarme.

Finalmente, agradezco infinitamente al CONACYT por la beca número 292704 que me brindó para mis estudios de maestría, así como el financiamiento al proyecto de ciencia básica (número 168981): “Identificación de factores paracrinos involucrados en el proceso de competencia”; ya que sin estos apoyos económicos no hubiera sido posible realizar mis estudios de posgrado, ni hubiera culminado el presente proyecto de investigación. A todos los que participaron directa o indirectamente en este proyecto. Muchas Gracias!

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a los tres seres humanos más importantes en mi vida; a mis hermanos Lupita y Miguel, y a Alvaro, por estar siempre ahí cuando más los necesito. Los amo. A mis papás Alicia y Miguel, que aunque ya no están físicamente conmigo, siempre lo están en mis recuerdos y en mi corazón; porque Ustedes me enseñaron a ser la persona que soy, que las cosas más valiosas de la vida se obtienen con esfuerzo y dedicación; y que aunque nuestros sueños se vean lejanos, con perseverancia y trabajo se vuelven realidad; así como que lo más importante en la vida es enriquecer el alma y no los bolsillos.

## **CURRICULUM VITAE**

El autor nació el 14 de agosto de 1989 en la Ciudad de Delicias, Chihuahua, México.

2007 - 2011            Estudios de licenciatura en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, obteniendo el título de Química Bacterióloga Parasitóloga. Cd. Chihuahua, Chih.

2012 - 2013            Encargada del Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Cd. Chihuahua, Chih.

2013 - 2015            Estudiante graduada del programa de Maestría en Ciencias de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Cd. Chihuahua, Chih.

Feb - Mar 2015    Maestra de curso intensivo de Inmunología Veterinaria en la Escuela Veterinaria de Educación Profesional. Cd. Chihuahua, Chih.

2015 - a la fecha    Encargada del laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Cd. Chihuahua, Chih.

Miembro de:

Asociación Mexicana en Producción Animal

Society for the Study of Reproduction

## RESUMEN

### ANÁLISIS DEL SECRETOMA DEL OVOCITO BOVINO (*Bos taurus*)

POR:

Q. B. P. BEATRIZ ELENA CASTRO VALENZUELA

Maestría en Ciencias en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: D. Ph. María Eduvigis Burrola Barraza

La ganadería bovina genera importantes ingresos económicos al país, y la producción de embriones *in vitro* es una herramienta que puede ayudar a mejorarla. Dentro de este proceso, la maduración del ovocito (MIV) es esencial; por lo que mejorar la MIV puede aumentar la tasa de producción de embriones *in vitro*. Los factores de secreción del ovocito (OSFs) juegan un papel importante en la MIV es por ello que el objetivo del presente trabajo fue analizar el secretoma del ovocito bovino (*Bos taurus*) mediante herramientas bioinformáticas para identificar nuevos OSFs y analizar la expresión génica de éstos para dilucidar su posible acción sobre el desarrollo competente del ovocito. Así, de las 2167 secuencias EST del ovocito bovino, reportadas en el NCBI, se obtuvieron 1237 secuencias peptídicas diferentes, de las cuales el 1.37 % (17) son probables OSFs (*SDF2L1*, *CARTPT*, *OOSP1*, *TNFAIP6*, *PTGS2*, *POSTN*, *P4HA3*, *TNC*, *PTX3*, *PSAP*, *SERPINE2*, *SRGN*, *INHBA*, *SRPX*, *CTSK*, *TIMP1*, *MMP1*). La mayoría de los genes que codifican para éstos presentan un patrón de expresión generalizado en los tejidos evaluados,

excepto *mmp1* que sólo se encontró expresado en células de la granulosa. En ovocito inmaduro se logró confirmar la expresión de casi todos los genes que codifican para las proteínas identificadas, pero no fue así en ovocito maduro, donde no se expresó ningún gen analizado. Sin embargo con base al patrón de expresión en tejidos reproductivos y células foliculares, las proteínas que pueden mejorar el proceso de MIV y, de manera indirecta, la tasa de obtención de blastocistos bovinos por sistemas *in vitro* son aquellas involucradas en la expansión cumular: *TNFAIP6*, *PTX3*, *PTGS2* e *INHBA*.



## ABSTRACT

### ANALYSIS OF SECRETOME OF THE BOVINE OOCYTE (*Bos taurus*)

BY:

BEATRIZ ELENA CASTRO VALENZUELA

Cattle generates important income to the country, and the production of *in vitro* embryos is a tool that can help to improve it. Within this process, oocyte maturation (IVM) is essential; so improving the IVM can increase the rate of production of *in vitro* embryos. The oocyte-secreted factors (OSFs) play an important role in IVM. So the objective of the present study was to analyze the secretoma of the bovine oocyte (*Bos taurus*) using bioinformatics tools to identify new OSFs and analyze the gene expression of these to elucidate their possible action on competent oocyte development. Thus, from 2167 EST sequences of bovine oocyte reported by NCBI, 1237 different peptide sequences, in which the 1.37 % (17) are probable OSFs (*SDF2L1*, *CARTPT*, *OOSP1*, *TNFAIP6*, *PTGS2*, *POSTN*, *P4HA3*, *TNC*, *PTX3*, *PSAP*, *SERPINE2*, *SRGN*, *INHBA*, *SRPX*, *CTSK*, *TIMP1*, *MMP1*) were obtained. Most of the genes that code for these OSFs, do show a generalized pattern of expression for the evaluated tissues, except *mmp1* that found only in granulosa cells. In the immature oocyte, confirm expression of almost all the genes that code for the proteins identified was confirmed. This was not the case for the mature oocyte, where none of the analyzed gene, was expressed. However, based on the pattern of expression in reproductive tissues and follicular cells, proteins that could improve the IVM process and indirectly the rate of bovine blastocysts

under *in vitro* systems are those involved in the expansion of the cumulus:  
*TNFAIP6*, *PTX3*, *PTGS2* and *INHBA*.



## CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE CUADROS.....	xii
LISTA DE GRÁFICAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Ovogénesis-Foliculogénesis.....	4
Comunicación Bidireccional.....	12
Uniones GAP.....	12
Comunicación por receptores.....	14
Proyecciones transzonales.....	19
Factores de Secreción del Ovocito (OSFs).....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Análisis Bioinformático.....	25
Etapa I. Obtención de secuencias EST de ovocito bovino	25
Etapa II. Predicción de proteínas de secreción.....	27
Etapa III. Análisis de las proteínas de secreción.....	29
Análisis de la Expresión Génica en Diferentes Tejidos y Células	29
Recolección de tejidos.....	29
Obtención de células.....	30
Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	31
PCR en tiempo real.....	33
Análisis estadístico.....	34
RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	35
Análisis de las Secuencias EST del Genbank de Ovocito Bovino	35
Análisis de la Expresión Génica de los OSFs Identificados.....	45
Expresión de OSFs de Matriz Extracelular.....	45
<i>MMP1</i> .....	45



<i>TIMP1</i> .....	52
<i>TNFAIP6</i> .....	58
<i>PTX3</i> .....	62
<i>POSTN</i> .....	65
<i>P4HA3</i> .....	65
<i>TNC</i> .....	68
<i>CTSK</i> .....	71
<i>SERPINE2</i> .....	75
<i>SRGN</i> .....	79
Expresión de OSFs de Señalización.....	82
<i>CARTPT</i> .....	82
<i>SDF2L1</i> .....	85
<i>PTGS2</i> .....	85
<i>PSAP</i> .....	91
<i>INHBA</i> .....	91
Expresión de OSFs de Función no Identificada.....	97
<i>OOSP1</i> .....	97
<i>SRPX</i> .....	97
Análisis Global de la Expresión de OSFs en Tejidos Somáticos..	101
Análisis Global de la Expresión de OSFs en Células Foliculares.	101
Uso Potencial de los OSFs Identificados como Factores	
Paracrinós en MIV.....	103
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	113
LITERATURA CITADA.....	115



## LISTA DE CUADROS

Cuadrc		Página
1	Número máximo de células germinales alcanzadas en el ovario fetal durante la gestación en diferentes especies y el número de células germinales en los ovarios al nacimiento o cerca de éste.....	5
2	Diferencias entre especies para diámetro folicular, diámetro del ovocito y número de células de la granulosa.....	13
3	Secuencias de los OSFs identificados. ....	39
4	Proteínas de secreción identificadas, las rutas metabólicas en las que participan, su función y homología con otras especies.....	46
5	Clasificación de los OSFs de acuerdo a su función celular...	50
6	Expresión de los genes evaluados en los diversos tejidos y células analizados.....	51
7	Agrupación de los OSFs de acuerdo a su tendencia de expresión en las células foliculares.....	104
8	Selección de factores paracrinos potenciales para ser utilizados en los protocolos de MIV.....	106

**LISTA DE GRÁFICAS**

Gráfica		Página
1	Proteínas de ovocito bovino identificadas como proteínas de secreción por SignalP y SecretomeP.....	36
2	Proteínas de ovocito bovino identificadas como proteínas mitocondriales.....	37
3	Proteínas de secreción identificadas.....	38
4	Abundancia relativa mRNA de <i>mmp1</i> en tejidos somáticos...	53
5	Abundancia relativa mRNA de <i>mmp1</i> en las células foliculares.....	54
6	Abundancia relativa mRNA de <i>timp1</i> en tejidos somáticos....	56
7	Abundancia relativa mRNA de <i>timp1</i> en las células foliculares.....	57
8	Abundancia relativa mRNA de <i>tnfaip6</i> en tejidos somáticos.	60
9	Abundancia relativa mRNA de <i>tnfaip6</i> en las células foliculares.....	61
10	Abundancia relativa mRNA de <i>ptx3</i> en tejidos somáticos.....	63
11	Abundancia relativa mRNA de <i>ptx3</i> en las células foliculares.....	64
12	Abundancia relativa mRNA de <i>postn</i> en tejidos somáticos...	66
13	Abundancia relativa mRNA de <i>postn</i> en las células foliculares.....	67
14	Abundancia relativa mRNA de <i>p4ha3</i> en tejidos somáticos...	69
15	Abundancia relativa mRNA de <i>p4ha3</i> en las células foliculares.....	70
16	Abundancia relativa mRNA de <i>tnc</i> en tejidos somáticos.....	72
17	Abundancia relativa mRNA de <i>tnc</i> en las células foliculares.....	73
18	Abundancia relativa mRNA de <i>ctsk</i> en tejidos somáticos.....	74
19	Abundancia relativa mRNA de <i>ctsk</i> en las células foliculares.....	76
20	Abundancia relativa mRNA de <i>serpine2</i> en tejidos somáticos	77
21	Abundancia relativa mRNA de <i>serpine2</i> en las células foliculares.....	78
22	Abundancia relativa mRNA de <i>srgn</i> en tejidos somáticos.....	80
23	Abundancia relativa mRNA de <i>srgn</i> en las células foliculares.....	81
24	Abundancia relativa mRNA de <i>cartpt</i> en tejidos somáticos...	83
25	Abundancia relativa mRNA de <i>cartpt</i> en las células	84



	foliculares.....	
26	Abundancia relativa mRNA de <i>sdf2l1</i> en tejidos somáticos...	86
27	Abundancia relativa mRNA de <i>sdf2l1</i> en las células foliculares.....	87
28	Abundancia relativa mRNA de <i>ptgs2</i> en tejidos somáticos...	89
29	Abundancia relativa mRNA de <i>ptgs2</i> en las células foliculares.....	90
30	Abundancia relativa mRNA de <i>psap</i> en tejidos somáticos....	92
31	Abundancia relativa mRNA de <i>psap</i> en las células foliculares.....	93
32	Abundancia relativa mRNA de <i>inhba</i> en tejidos somáticos....	95
33	Abundancia relativa mRNA de <i>inhba</i> en las células foliculares.....	96
34	Abundancia relativa mRNA de <i>oosp1</i> en tejidos somáticos....	98
35	Abundancia relativa mRNA de <i>oosp1</i> en las células foliculares.....	99
36	Abundancia relativa mRNA de <i>srpx</i> en tejidos somáticos.....	100
37	Abundancia relativa mRNA de <i>srpx</i> en las células foliculares.....	102



## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Extrusión del primer cuerpo polar en ovocito de ratón.....	7
2	Control del arresto meiótico.....	9
3	Proceso de foliculogénesis.....	11
4	Uniones GAP.....	15
5	Descripción gráfica de las uniones GAP localizadas en un folículo maduro.....	16
6	Cascada de señalización activada por BMP15 y GDF9, mediada por receptores en folículos ováricos.....	18
7	Proyecciones transzonales en COCs de ratón.....	20
8	Diagrama de flujo para análisis bioinformático.....	26





## INTRODUCCIÓN

La ganadería es una de las principales actividades económicas en nuestro país, pues representa 43.8 % del valor del sector agropecuario y pesquero (SIAP, 2013). Dentro de este rubro, la producción de bovinos (carne y leche) es la más importante, ya que genera fuertes ingresos económicos; en el año 2012 se obtuvieron 123 mil millones de pesos (54 % corresponde a producción de carne en canal y 46 % a leche) mientras que en el 2013 se alcanzaron 134 mil millones de pesos (SIAP-SAGARPA, 2015). En lo que corresponde al estado de Chihuahua, éste ocupa el 5to. lugar nacional (5.1 %) en la producción de carne de bovinos, generando ganancias de más de 3,085 millones de pesos, y el 4to. lugar (9.0 %) en producción de leche bovina, con ganancias mayores a los 5,692 millones de pesos (SIAP-SAGARPA, 2012). Es por ello que mejorar la producción de este tipo de ganado es necesario y una de las técnicas con potencial para apoyar a su logro es la producción de embriones *in vitro* (Hall *et al.*, 2013).

En la actualidad, existen múltiples avances biotecnológicos que han mejorado la producción *in vitro* de embriones; sin embargo, la tasa de obtención de blastocistos a partir de ovocitos bovinos por estos métodos es baja, de 30 a 40 %, comparada con la tasa obtenida por métodos *in vivo*, 80 % (Nagai, 2000; Rizos *et al.*, 2002). Además, los embriones producidos *in vitro* poseen una calidad inferior comparados con los obtenidos *in vivo*, ya que tienen un citoplasma más oscuro y con menor densidad como consecuencia de su alto contenido de lípidos, una zona pelúcida más frágil, así como deficiencias en su metabolismo (Lonergan *et al.*, 2003).



La producción de embriones *in vitro* es un proceso que involucra esencialmente tres etapas: maduración del ovocito, fertilización del mismo y el consiguiente cultivo *in vitro* del cigoto obtenido (Lonergan *et al.*, 2003). Durante la maduración, el ovocito adquiere la competencia, proceso mediante el cual alcanza la capacidad de completar su primera división meiótica (Profase I a Metafase II), de soportar la fertilización, desarrollo embrionario y gestación exitosos. Por lo que el uso de este tipo de ovocitos durante la fertilización *in vitro* (FIV) es crucial para asegurar alta calidad embrionaria (Li *et al.*, 2008). La competencia está determinada por los factores que afectan al ovocito durante la foliculogénesis y la capacidad de éste para alcanzar el estado de blastocisto es adquirida dentro del folículo; así se tiene que diferentes condiciones foliculares pueden llevar a diferencias en la competencia del ovocito (Sirard y Blondin, 1996).

Anteriormente se creía que el ovocito desempeñaba un rol pasivo en el proceso de maduración; no obstante, hasta el día de hoy es ampliamente aceptado que esta célula juega un papel activo en la estimulación del crecimiento folicular y en la conducción de la diferenciación de células de la granulosa. De hecho, el ovocito es un regulador esencial de la foliculogénesis y existe una importante comunicación bidireccional entre éste y las células somáticas dentro del folículo (Gilchrist *et al.*, 2004). Esta comunicación se da por contacto celular directo y por factores paracrinós secretados por los ovocitos (Chang *et al.*, 2011). Dichos factores son popularmente conocidos como factores de secreción del ovocito u OSFs (Kathirvel *et al.*, 2013).



Los OSFs son de amplio interés, dado que se ha demostrado que son esenciales para que se de la competencia del ovocito. Sin embargo, a la fecha son pocos los OSFs debidamente identificados. De éstos, sobresalen *BMP15* y *GDF9*. Debido a que la mayoría de ellos permanecen desconocidos (Yan *et al.*, 2001), el objetivo general de este trabajo de investigación fue analizar el secretoma del ovocito bovino (*Bos taurus*) mediante herramientas bioinformáticas y análisis de expresión génica para identificar nuevos OSFs con una posible acción sobre el desarrollo de competencia del ovocito. Para lograr este objetivo general, se trazaron dos objetivos particulares: 1) analizar las secuencias EST del GenBank de ovocito bovino maduro e inmaduro mediante análisis bioinformático para seleccionar OSFs; y 2) analizar la expresión génica de los OSFs seleccionados en el objetivo 1, en diferentes tejidos y células foliculares para visualizar la forma global en que éstos se expresan en el bovino, así como para confirmar su expresión en el ovocito inmaduro y/o maduro.



## REVISIÓN DE LITERATURA

### Ovogénesis-Foliculogénesis

La ovogénesis se refiere al proceso por el cual un ovocito se desarrolla y madura, y sucede de manera simultánea con la foliculogénesis, proceso por medio del cual se desarrolla el folículo ovárico (Burrola-Barraza y González-Rodríguez, 2015). Ambas etapas comienzan antes del nacimiento, durante la gestación, donde se forman las células germinales primordiales, quienes originarán a los ovocitos dentro de arreglos celulares denominados folículos (Santos *et al.*, 2013). Las hembras de todos los mamíferos domésticos nacen con un número finito de ovocitos (Paulini *et al.*, 2014), el cual varía de acuerdo a la especie (Cuadro 1).

Durante la vida fetal, los ovocitos inician un proceso de división celular denominada meiosis (Conti *et al.*, 2012), que es un mecanismo por el cual se obtienen células haploides e involucra solamente una replicación de DNA junto con dos distintas y consecutivas reducciones nucleares (meiosis I y meiosis II). El proceso meiótico incluye los estadios de meiosis I (profase I, metafase I, anafase I, telofase I) y meiosis II (profase II, metafase II, anafase II y telofase II). A su vez, la profase se divide en varias etapas: leptoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis. En la profase de la meiosis I, los cromosomas homólogos son gradualmente liberados uno del otro y condensados; además, el nucléolo desaparece junto con la membrana nuclear. Durante la metafase I, los cromosomas homólogos se alinean a lo largo del plano ecuatorial, mientras que en la anafase I se acortan los microtúbulos del cinetocoro, colocando los



Cuadro 1. Número máximo de células germinales alcanzadas en el ovario fetal durante la gestación en diferentes especies y el número de células germinales en los ovarios al nacimiento o cerca de éste

Especie	Número máximo de células germinales (días de gestación)	Número de células germinales después del nacimiento (días de nacimiento)
Bovino	2,700,000 (110)	68,000 (13)
Cerdo	1,100,000 (50)	500,000 (0)
Búfalo	23,540 (210)	20,000 (0)
Rata	75,000 (18)	27,000 (2)
Humano	6,800,000 (150)	2,000,000 (0)

Paulini *et al.* (2014)



cromosomas homólogos en polos opuestos para que en la telofase I se formen dos grupos haploides. Al final de la meiosis I, el ovocito se divide en una célula hija y en un cuerpo polar. Al completar la meiosis I, comienza la meiosis II sin replicación del DNA. En la profase II los cromosomas se condensan nuevamente, el nucléolo desaparece, la membrana nuclear se disuelve y los centriolos se mueven a las regiones polares. Los cromosomas se colocan dentro del centro de la célula, formando un nuevo plano ecuatorial (metafase II), luego los cinetocoros se mueven hacia los polos (anafase II). El proceso termina con la telofase II, donde la célula se divide por última vez, concentrando las cromátides en polos opuestos, reformando la envoltura nuclear y descondensando los cromosomas (Brevini y Pennarossa, 2013).

En la vida fetal, la división celular de los ovocitos queda suspendida en el estado de diploteno de la profase I (Mehlmann, 2013), y se vuelve a activar durante la pubertad del individuo, cuando los ovocitos completan su maduración por acción de la hormona luteinizante (LH) o bajo circunstancias que llevan a la atresia folicular (Picton *et al.*, 1998). Entonces se completa la meiosis I y el primer cuerpo polar es extruido (Figura 1); posteriormente, la segunda división meiótica progresa hasta el estadio de metafase II y sucede un segundo arresto meiótico mientras el ovocito es liberado e ingresa a la tuba uterina (Edwards, 1965). La fertilización promueve el estímulo para completar la segunda división meiótica y la extrusión del segundo cuerpo polar (Wakayama y Yanagimachi, 1998).

El primer arresto meiótico que sufre el ovocito durante su desarrollo está bajo el control de las células somáticas del folículo, debido a que se ha

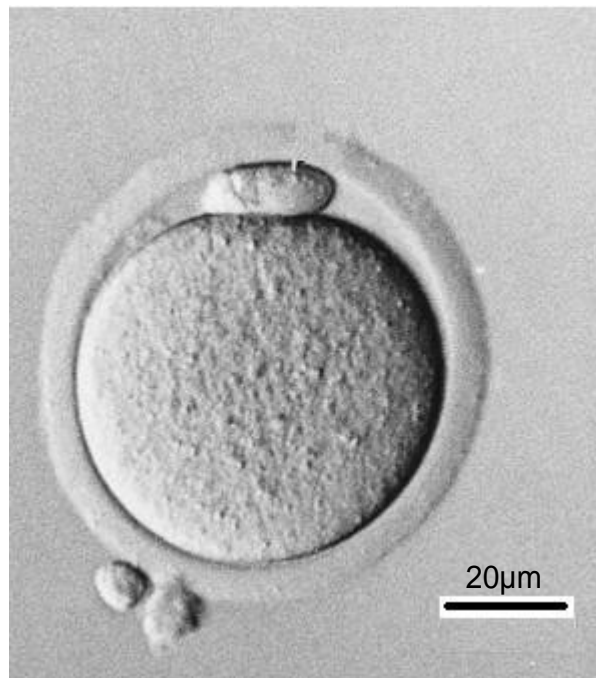


Figura 1. Extrusión del primer cuerpo polar en ovocito de ratón.  
Wakayama y Yanagimachi, 1998.



demostrado que los ovocitos o complejos ovocito-células cumulares (COCs), que son removidos de los folículos maduros, resurgen espontáneamente de la meiosis (Epigg y Downs, 1987). Además, el arresto meiótico es dependiente de altas concentraciones de un segundo mensajero, adenosín monofosfato cíclico, mejor conocido como cAMP, en células de la granulosa y de una disminución de éste en el ovocito (Dekel y Beers, 1978). De acuerdo a Conti *et al.* (2012), el arresto meiótico se mantiene mientras la enzima PDE3A se encuentra inactiva, Esto se logra gracias a que las células de la granulosa expresan el ligando NPPC, el cual es el precursor de la molécula CNP. El CNP se acumula en el espacio extracelular folicular y activa el ligando NPR2, lo que causa la acumulación de guanosín monofosfato cíclico, cGMP, en el compartimiento de las células de la granulosa; cGMP se difunde al ovocito y mantiene inactiva a la enzima PDE3A (Figura 2). Cuando surge una elevación en la concentración de LH y se une a su receptor acoplado a proteínas G, aumenta la concentración de cAMP, la enzima PDE3A es activada y resurge la meiosis.

La foliculogénesis es un proceso que implica la maduración de los folículos primordiales, presentes al nacimiento, hasta un estado donde el ovocito ha alcanzado la competencia (Chian *et al.*, 2002), es decir, la capacidad para que resurja del arresto meiótico en el que se encuentra y de esta manera pueda someterse a fertilización y desarrollar, después de ser fertilizado, el blastocisto consiguiente (Aerts *et al.*, 2010). La foliculogénesis es un proceso dinámico que involucra varios estados secuenciales definidos como reclutamiento, crecimiento, selección fisiológica, ovulación y luteinización folicular; sin embargo, en ciertas ocasiones después de la selección ocurre la



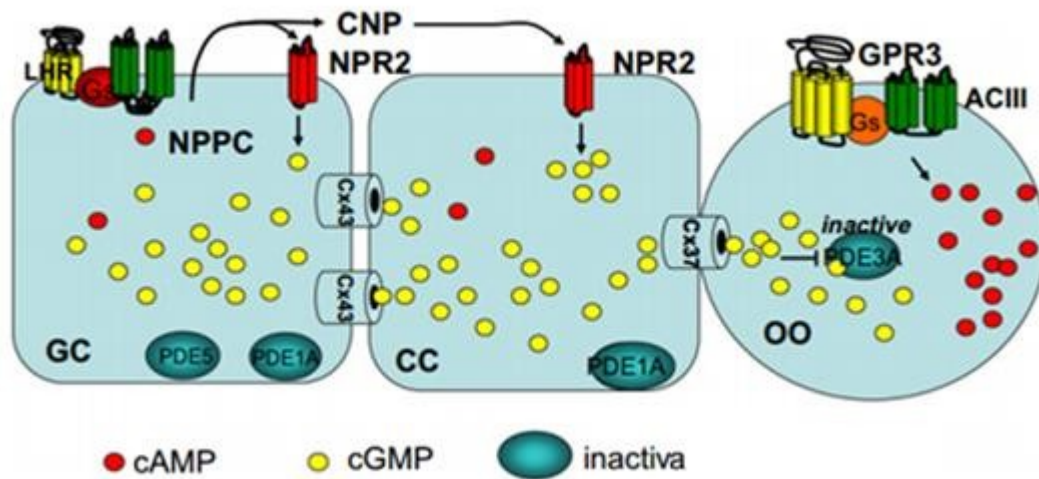


Figura 2. Control del arresto meiótico.  
GC, célula de la granulosa; CC, célula cumular; OO, ovocito.  
Conti *et al.*, 2012.



atresia (Palermo, 2007). En el caso de especies monovulatorias, el desarrollo folicular está caracterizado por la selección de un folículo dominante de un grupo de folículos en crecimiento (Adams y Pierson, 1995; Chian 2002).

Las diferentes etapas por las que cursa un folículo primordial hasta alcanzar su madurez involucran una serie de organizaciones celulares que van desde el folículo primario, pasando por el folículo secundario y terminando por el folículo terciario (Figura 3). Todas las hembras nacen con un número determinado de folículos primordiales, estructuras conformadas por ovocitos rodeados por una capa simple de células planas de la granulosa; luego estas células se convierten en cuboides, dando origen a un folículo primario, que se transformará en secundario donde las células de la granulosa proliferan rápidamente organizándose en dos a seis capas alrededor del ovocito. El inicio de la pubertad está marcada por el cambio en el patrón de secreción de GnRH que ocasiona la liberación por parte de la hipófisis de dos hormonas, FSH y LH, las cuales actúan de forma endocrina sobre las células foliculares provocando que el folículo se transforme en terciario o maduro cuando contiene un antro lleno de fluido folicular para que posteriormente ocurra la ovulación (Fawcett, 1995; Adams *et al.*, 2008), que es el proceso mediante el cual se libera un ovocito a través de la superficie del ovario por ruptura de los tejidos que lo rodean (Cunningham y Klein, 2007). Cada día, un gran número de folículos primordiales inicia el crecimiento, las células de la granulosa proliferan y los ovocitos comienzan a desarrollarse. La iniciación del crecimiento de los folículos comienza con una serie de cambios morfológicos que llegan a estados subsecuentes de desarrollo folicular, folículos preantrales (primarios y

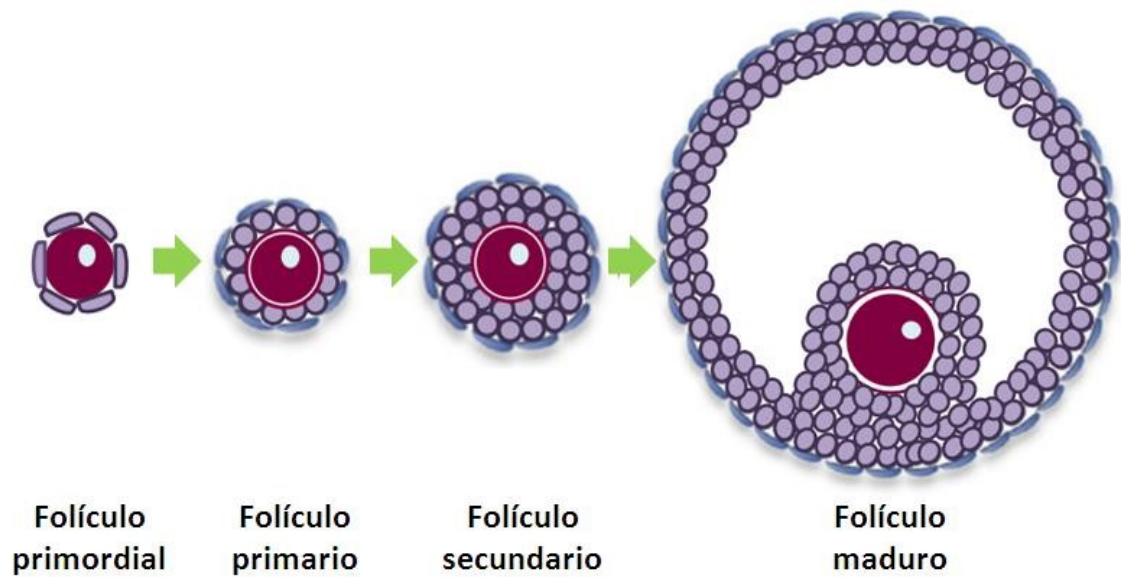


Figura 3. Proceso de foliculogénesis.  
Adaptado de Sánchez y Smitz, 2012.



secundarios), terciarios y finalmente los folículos preovulatorios (antrales). Esos cambios pueden observarse en el diámetro folicular correspondiente al tamaño del ovocito y al número de células de la granulosa (Cuadro 2). Al final, la formación del antro ocurre después en folículos con un diámetro de 120-160  $\mu\text{m}$  en bovinos, mientras que en los cerdos el folículo alcanza un diámetro de 400  $\mu\text{m}$  y en folículos ovinos de 220-300  $\mu\text{m}$  (Paulini *et al.*, 2014).

### **Comunicación Bidireccional**

Durante la foliculogénesis, las células de la granulosa (CGs) se diferencian en dos tipos, las granulosa cumulares (CCs), que rodean y están en íntimo contacto con el ovocito; y las células de la granulosa mural, que delimitan la pared folicular formando un epitelio estratificado con la lámina basal. A lo largo del desarrollo folicular, las células que componen el COC se comunican bidireccionalmente (Epigg, 2001). Este modo de comunicación involucra eventos de señalización autócrinos y parácrinos dentro del ovario (Su *et al.*, 2009) y es esencial para el desarrollo y fertilidad del ovocito, debido a que el soporte que le brindan las CCs es fundamental para su adecuada maduración (Picton *et al.*, 1998; Gilchrist *et al.*, 2004). Esta comunicación es un proceso bidireccional donde ambos tipos celulares comparten moléculas, las cuales, si son pequeñas, pueden transferirse por medio de las uniones GAP, mientras que si son moléculas grandes son transportadas por endocitosis mediada por receptores, o bien, ejercen su acción mediante la activación de señalización interna en el citosol de la célula estimulada (Gilchrist *et al.*, 2004).

**Uniones GAP.** Son colecciones de canales intracelulares que permiten el intercambio directo de moléculas entre células adyacentes. Estos canales



Cuadro 2. Diferencias entre especies en diámetro folicular, diámetro del ovocito y número de células de la granulosa

Especie	Diámetro folicular ( $\mu\text{m}$ )			Diámetro del ovocito ( $\mu\text{m}$ )			Número promedio de células de la granulosa		
	PL	PR	S	PL	PR	S	PL	PR	S
Bovino	36	49	88	28	32	44	7	15	62
Búfalo	35	42	53	25	27	29	4-8	8-20	-
Ovino	41	75	129	35	52	73	16	128	637
Caprino	20	24	44	16	17	25	6	11	31
Gato	28	41	75	23	30	41	7	13	46
Perro	28	43	102	22	28	48	6	15	62
Humano	35	42	77	32	32	48	13	52	360
Cerdo	34	40	85	26	27	39	5	8	50

PL, folículo primordial; PR, folículo primario; S, folículo secundario  
Paulini *et al.*, 2014.



intracelulares están compuestos de conexina (Figura 4); la conexina 37 (Cx37) forma uniones GAP entre CCs y el ovocito, y la conexina 43 (Cx43) forma uniones GAP entre CCs (Figura 5). Son requeridas para pasos específicos en la adquisición de competencia meiótica citoplasmática y nuclear, así como en el desarrollo del folículo ovárico hasta un folículo antral (Carabatsos, 2000). Los canales que constituyen las uniones GAP son formados por el posicionamiento directo de proteínas transmembranales, permitiendo el intercambio de iones y de pequeñas moléculas (<1 kDa) entre las células sin la participación del espacio extracelular. La comunicación por uniones GAP requiere el ensamble de canales intracelulares que abarquen dos membranas plasmáticas, las cuales están separadas por un espacio intracelular de aproximadamente 3 nm. Esto permite el intercambio de moléculas como metabolitos y aminoácidos, así como de moléculas reguladoras que controlan la maduración nuclear (cAMP), por lo que las uniones GAP son clave para la diseminación local y señalización endocrina hacia los ovocitos vía CCs (Gilchrist *et al.*, 2008). Dentro del folículo ovárico, este tipo de comunicación regula el crecimiento folicular, la ovogénesis, ovulación y luteinización, lo cual se ha demostrado en hembras de ratones KO homocigotas para Cx37, las cuales son infértiles, debido a la falta de señalización mediada por uniones GAP (Simon y Goodenough, 1998).

**Comunicación por receptores.** La mayoría de los OSFs identificados hasta la fecha son miembros de la familia de factores de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), pero poco se conoce acerca del sistema específico de receptor/señalización que emplean (Gilchrist *et al.*, 2006).

Varios factores de crecimiento miembros de TGF $\beta$ , junto con sus

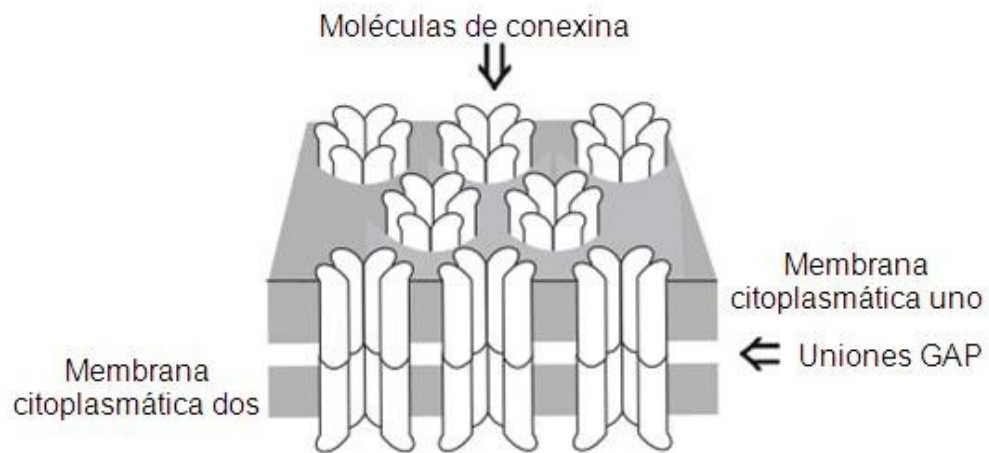


Figura 4. Uniones GAP. Son canales intracelulares formados por proteínas transmembranales localizadas en las membranas plasmáticas de dos células próximas.  
Simon y Goodenough, 1998.

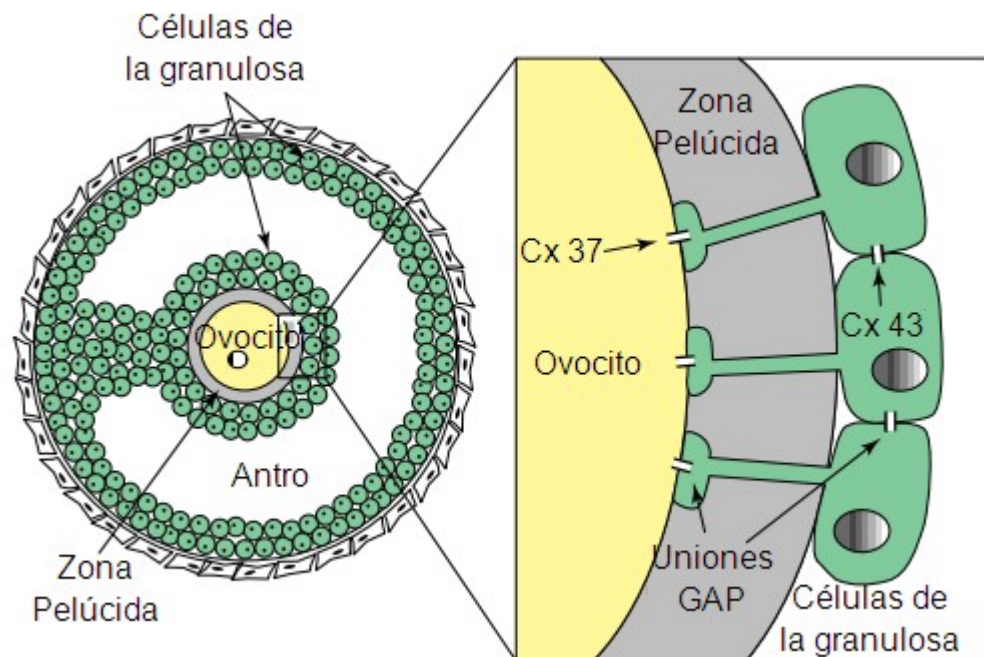


Figura 5. Descripción gráfica de las uniones GAP localizadas en un folículo maduro. Las uniones GAP entre células de la granulosa están conformadas por Cx43, mientras que las uniones que comunican al ovocito con las células de la granulosa contienen Cx37.

Simon y Goodenough, 1998.





receptores y moléculas de señalización intracelular, las SMADs, son indispensables para las funciones críticas del ovario como la formación del ovocito y el desarrollo folicular (Kaivo-oja *et al.*, 2006).

Los miembros de la familia TGF $\beta$ , *GDF9* y *BMP15*, activan la cascada intracelular SMAD. Estos factores de crecimiento en forma de homodímeros o heterodímeros se unen a un receptor tipo I, referido como receptor de activina parecido a una cinasa (ALK) o un receptor tipo II, y eso lleva a la fosforilación de ALK, seguido de fosforilación de otro receptor, llamado SMAD (Gilchrist *et al.*, 2008). La transcripción génica inducida por el ligando es mediada por un complejo heterodimérico de receptor regulador por SMADs y receptor independiente co-SMADs, como un SMAD4; entonces se translocan al núcleo, donde ellas regulan la transcripción a través de interacciones con elementos de regulación transcripcional. SMAD 6 y 7 son moléculas inhibidoras que previenen la activación de la vía de señalización SMAD. Esto indica que la activación de los receptores TGF $\beta$  pueden regular otra vía de señalización conocida como vía de las protein-cinasas mitógeno activadas o MAPK (Jueguel y McNatty, 2005).

La señalización intracelular por factores de crecimiento de la familia TGF $\beta$  pueden dividirse ampliamente en dos grupos distintos, los que utilizan la vía de señalización TGF $\beta$ /activina, que llevan a la activación de las proteínas SMAD2 y SMAD3, y aquella que usa la vía de BMP llevando a la activación de las moléculas SMAD1, SMAD5 y/o SMAD8 (Figura 6). Las CGs poseen un gran complemento del sistema de señalización de la superfamilia de TGF $\beta$ , incluyendo: la mayoría de los receptores tipo II y ALK tipo I y los mensajeros intracelulares SMAD y co-SMAD (Gilchrist *et al.*, 2008).

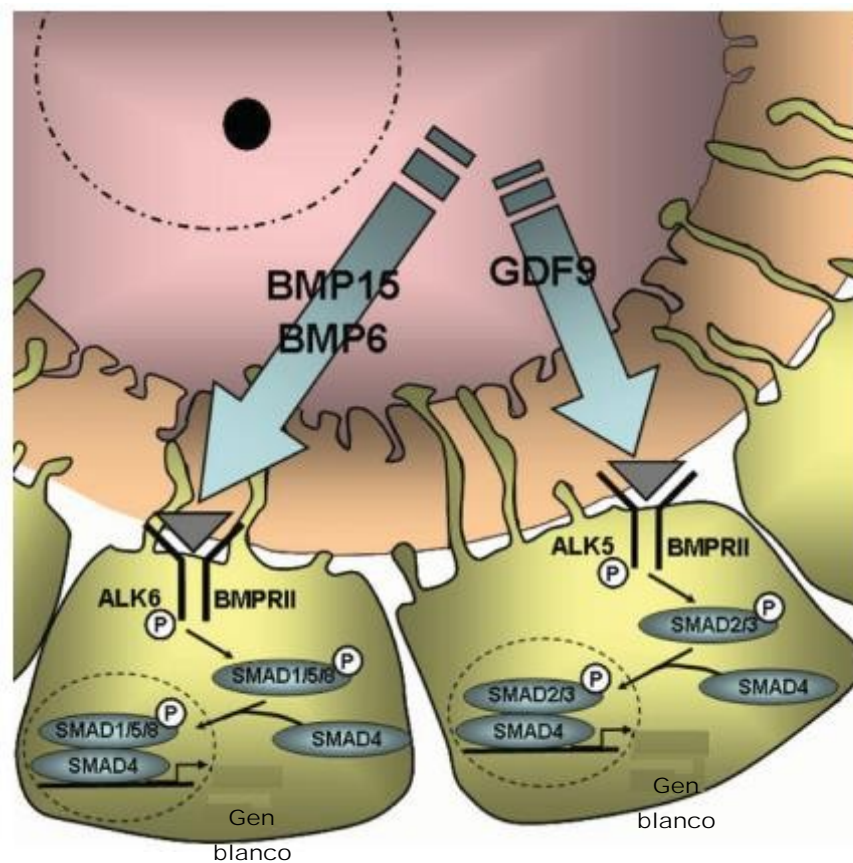


Figura 6. Cascada de señalización activada por *BMP15* y *GDF9* mediada por receptores en folículos ováricos.  
Gilchrist *et al.*, 2008.



**Proyecciones transzonales.** Las CGs han desarrollado estructuras dinámicas altamente especializadas, conocidas como proyecciones citoplasmáticas transzonales (TZPs) que penetran a través de la zona pelúcida y limitan con la membrana del ovocito (Figura 7), formando uniones adhesivas y GAP en el final de esas proyecciones. Así proporcionan un medio polarizado que orienta las secreciones de las células somáticas. Estas estructuras son conductos especializados para el transporte, procesamiento y recepción de factores paracrinos en la interfase entre el ovocito y las CGs; su estabilidad y función puede estar sujeta al desarrollo y regulación hormonal (Gilchrist *et al.*, 2008).

Las TZPs se extienden como profundas invaginaciones que llegan hasta la vesícula germinal durante períodos del crecimiento del ovocito; mientras que en los folículos preantrales son más numerosas y son ancladas por F-actina que producen extensiones celulares foliculares en la periferia de la zona pelúcida, pero sólo proyecciones solitarias y usualmente en forma de sacacorchos atraviesan dicha zona. Después del desarrollo folicular antral, las TZPs son retraídas y las conexiones terminales existentes con el ovocito son pocas; así, durante la ovulación las TZPs sufren una retracción activa (Albertini *et al.*, 2001).

### **Factores de Secreción del Ovocito (OSFs)**

Los ovocitos tienen ciertas deficiencias metabólicas como lo es el transporte de algunos aminoácidos, además son incapaces de llevar a cabo la glucólisis y la síntesis de colesterol. De esta manera, requieren que las CCs los provean de dichos nutrientes. Es por eso que los ovocitos promueven la

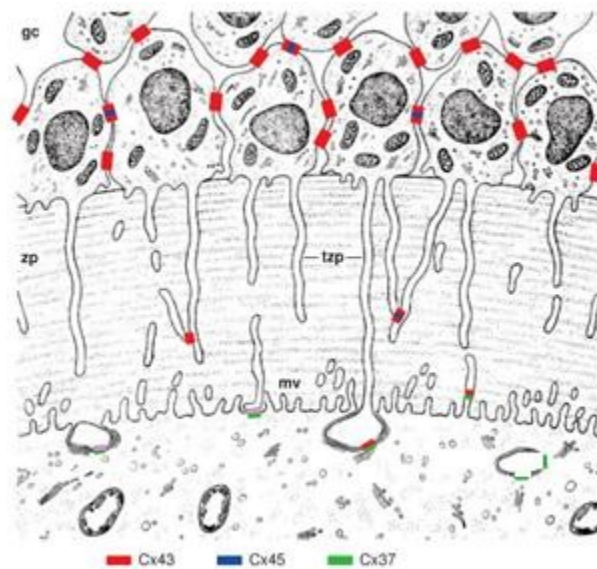


Figura 7. Proyecciones transzonales en COCs de ratón. Cx43 contribuye a la formación de las uniones transzonales desde las CGs y se une con el ovocito a través de la Cx37 para formar uniones heterotípicas. El contacto de esas uniones puede ocurrir sobre las microvellosidades del ovocito, al ras de la superficie del ovocito o en hendiduras de la membrana plasmática del ovocito.

Cx43, conexina 43, Cx45, conexina 45; Cx37, conexina 37; gc, células de la granulosa; zp, zona pelúcida; tzip, uniones transzonales; mv, microvellosidades. Kidder y Mhawi (2002).



expresión de determinados genes en las CCs que codifican para proteínas que actúan como transportadores de aminoácidos específicos y para la producción de enzimas necesarias para llevar a cabo los procesos metabólicos antes mencionados. Esta capacidad del ovocito de controlar el metabolismo de las CCs es provocada por los OSFs, que tienen acción parácrina sobre estas células (Su *et al.*, 2009).

Los OSFs son factores de crecimiento que son producidos por el ovocito, ya sea de forma exclusiva o de manera conjunta con otros tipos celulares como las CGs, de la teca y del estroma intersticial (Santos *et al.*, 2013); son proteínas de secreción que tienen una expresión inducida durante una respuesta celular específica, y como tal son expresadas sólo durante estados específicos de la foliculogénesis (Grimmond *et al.*, 2003). Los OSFs más estudiados hasta el momento son: el factor de diferenciación de crecimiento 9 (*GDF9*), la proteína morfogenética ósea 15 (*BMP15*), el factor de crecimiento de fibroblastos 8 (*FGF8*) e Intermedin/Adrenomedulina 2 también conocida como *IMD/ADM2* (Juenguel y McNatty, 2005; Su *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2011).

La *GDF9* es una proteína expresada por el ovocito y es miembro de la superfamilia TGF $\beta$ . Se ha demostrado que este factor es necesario para el desarrollo folicular ovárico normal y para la fertilidad de las hembras, ya que afecta la fisiología de las CGs (Pangas *et al.*, 2004; Juengel y McNatty, 2005; Sugiura *et al.*, 2008).

Al igual que *GDF9*, las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) son miembros de la superfamilia TGF $\beta$ ; las BMPs tienen importantes actividades biológicas en el control de la proliferación celular, diferenciación y apoptosis en



los tejidos reproductivos. El importante papel que juegan estas proteínas en la función reproductiva se pone de manifiesto cuando se presenta alguna mutación en ciertos genes de la familia BMPs, lo que conlleva a fenotipos reproductivos aberrantes en animales (Shimasaki *et al.*, 2004; Juengel y McNatty, 2005). Se ha demostrado que los factores secretados por los ovocitos, en particular *BMP15* y *BMP6*, mantienen la baja incidencia de la apoptosis de CCs (Hussein *et al.*, 2005).

Los factores *GDF9* y *BMP15* han sido localizados en los ovocitos para el crecimiento de folículos en todas las especies de mamíferos examinadas (bovinos, cerdos, humanos entre otros) hasta hoy, indicando que tienen un papel central en la regulación del desarrollo folicular (Teixeira *et al.*, 2002; Juengel y McNatty, 2005). Apoyando esta afirmación, Otsuka *et al.* (2011) identificaron que la presencia de mutaciones en los genes que codifican para *GDF9* y *BMP15* generalmente causan infertilidad en ovejas; por otra parte Teixeira *et al.* (2002) sugirieron que una alteración de la expresión de *GDF9* en el ovocito humano puede contribuir a una foliculogénesis aberrante en mujeres con síndrome del ovario poliquístico. De acuerdo a Palma *et al.* (2012), la supresión de *GDF9* lleva al bloqueo del desarrollo folicular, disminuyendo la proliferación de las CGs y causa anomalías en el crecimiento del ovocito.

Además, *BMP15* y *GDF9* controlan el metabolismo de las CCs, particularmente de la glucólisis y la biosíntesis de colesterol. Su *et al.* (2008) demostraron que los genes que codifican para las enzimas que se requieren en la síntesis de colesterol se expresan en niveles altos en CCs comparadas con



ovocitos; y los ovocitos, en ausencia de CCs, poseen niveles muy bajos de colesterol.

Además de *GDF9* y *BMP15*, existen otros OSFs conocidos como factores de crecimiento de los fibroblastos (*FGF*), los cuales se encuentran localizados en los ovocitos de los folículos primordiales y primarios, ayudan a la señalización paracrina entre los diferentes tipos celulares que conforman el folículo ovárico, promueven el desarrollo y la transición de los folículos primordiales porque tiene efecto sobre las CGs y de la teca (Palma *et al.*, 2012).

El factor *FGF8* es secretado por el ovocito y controla el metabolismo de las CCs. En el caso de bovinos, este mRNA, además de estar presente en el ovocito también lo está en células de la teca y de la granulosa (Portela *et al.*, 2010). Una de sus funciones es estimular la glucólisis en las CCs, para lo cual debe actuar conjuntamente con *BMP15*; *in vitro*, el tratamiento simultáneo con ambos OSFs promueve la glucólisis e incrementa la expresión de genes que codifican para enzimas glucolíticas (Sugiura *et al.*, 2008).

El factor *IMD/ADM2* es expresado en ratas, en los ovocitos de folículos primarios, secundarios antrales pequeños y grandes, así como en embriones de una y dos células. La presencia de este OSF ocasiona un aumento dosis-dependiente en la producción de cAMP, así como en la expresión de Cx43; lo que ayuda a mantener al ovocito en arresto meiótico y sugiere que este OSF puede actuar promoviendo la red de uniones GAP. Los tratamientos con *IMD/ADM2* llevan a una reducción de la actividad de las caspasas 3/7, es decir, es capaz de prevenir la apoptosis en CCs. Mantiene estable la conformación

tridimensional del COC, ya que el bloqueo de la señalización de *IMD/ADM2*



desintegra rápidamente la estructura terciaria de este complejo. El tratamiento con *IMD/ADM2* en protocolos de MIV de ovocitos, provoca una reducción de la expresión de ciclina D2, una limitante de la progresión del ciclo celular en folículos en crecimiento, por lo que favorece el desarrollo del ovocito (Chang *et al.*, 2011).

Para la identificación de OSFs se han utilizado diversos procedimientos. En el caso particular de *GDF9* se utilizaron oligonucleótidos degenerados correspondientes a las regiones conservadas de los miembros conocidos de la familia TGF $\beta$  como sondas para hibridación y cebadores para PCR (McPherron y Lee, 1993). Mientras que *IMD/ADM2* se identificó generando un conjunto de genes que incluían genes conocidos y los polipéptidos recientemente identificados como de secreción (por ejemplo, los que poseen péptido señal pero no tienen dominios transmembranales), luego se realizó la exploración de las bases de datos EST y de la expresión de genes Omnibus para identificar los transcritos que mostraran evidencia de alta representatividad en gametos femeninos (Chang *et al.*, 2011).





## MATERIALES Y MÉTODOS

### Análisis Bioinformático

El análisis bioinformático constó de tres etapas (Figura 8). La primera correspondió a la obtención de las secuencias EST (secuencias marcadas de expresión) del ovocito bovino; la segunda se centró en la predicción de las proteínas de secreción; y en la tercera se analizaron las proteínas del secretoma (Garg y Ranganathan, 2011; Garg y Ranganathan, 2012).

**Etapas I. Obtención de secuencias EST de ovocito bovino.** El transcriptoma completo del ovocito bovino se obtuvo de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés), a través del sitio Web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. En el sitio Web se utilizaron las herramientas de búsqueda de la base de datos, agregando información de género, especie y tejido del organismo en estudio (*Bos taurus* oocyte). Con los resultados obtenidos se adquirió la secuencia de mRNA a partir de las bases de datos de DNA, utilizando la opción RefSeq mRNA; posteriormente, se accedió a la opción ProteinID, para obtener la secuencia de aminoácidos producidas por el ovocito bovino en formato FASTA.

Algunas de las secuencias obtenidas de las bases de datos EST del NCBI sólo proporcionan la secuencia de bases de mRNA y no la secuencia de aminoácidos necesaria para la predicción de la proteína de secreción; sin embargo, esta última secuencia se puede adquirir con la ayuda de la herramienta bioinformática EMBOSSTranseq, disponible en la página web [http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss\\_transeq/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/) (Ingebriston *et al.*, 2010). Para esto se colocó la secuencia de bases de mRNA obtenida del NCBI en el

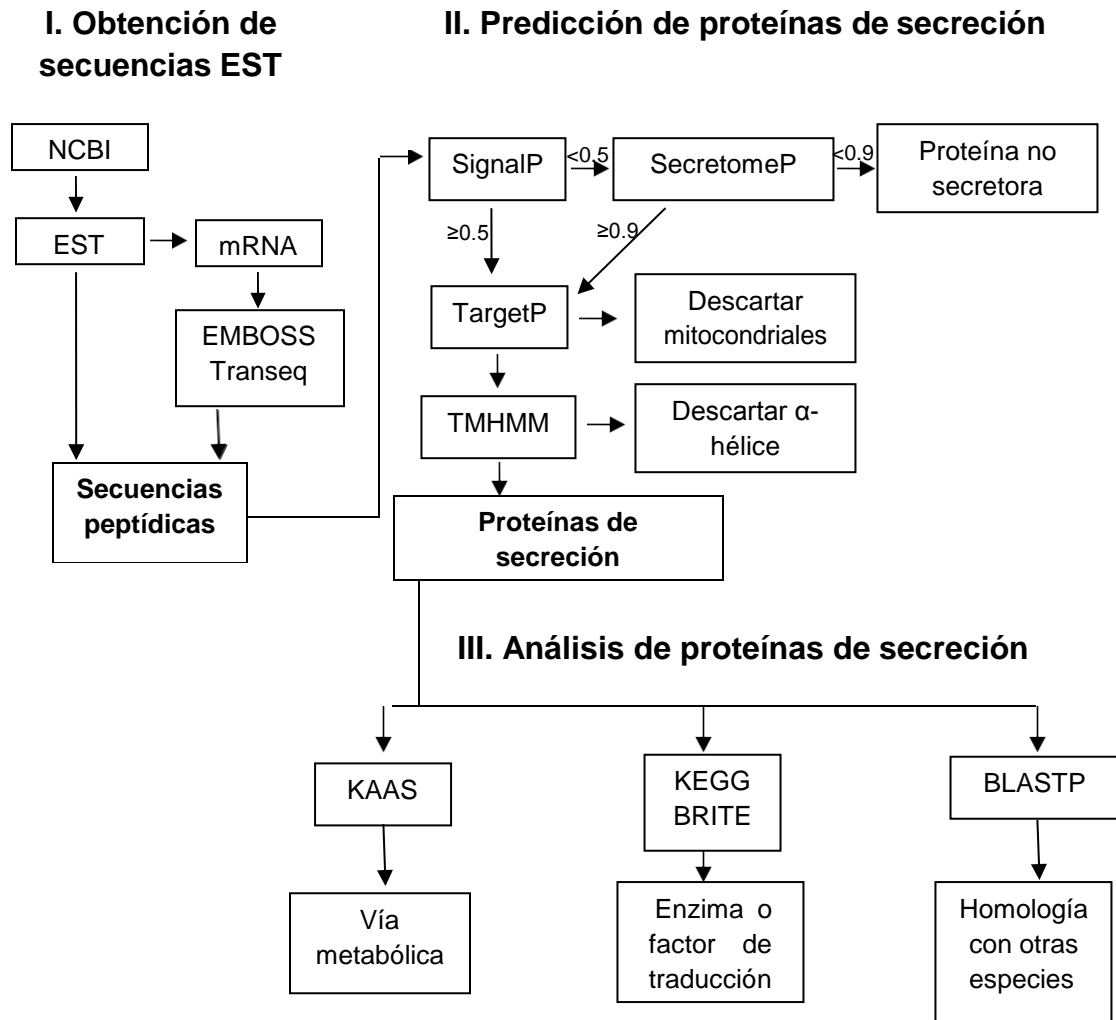


Figura 8. Diagrama de flujo para análisis bioinformático.



predictor en cualquier formato (FASTA u otro), con lo que se obtuvo la secuencia deseada.

**Etapla II. Predicción de proteínas de secreción.** Las proteínas de secreción fueron predichas utilizando una combinación de cuatro herramientas computacionales del Centro para el Análisis de Secuencias Biológicas (CBS): SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>), TargetP, localizado en <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/> (Emmanuelson *et al.*, 2007) y TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

SignalP fue utilizado para la predicción de proteínas que siguen la vía clásica de secreción, mientras que SecretomeP predijo las proteínas que son secretadas por vías no clásicas. El servidor TargetP se utilizó para predecir las proteínas que son mitocondriales y TMHMM identificó las proteínas transmembranales.

El servidor SignalP es el método más popular utilizado para la predicción de proteínas secretadas por la vía clásica; su funcionamiento se basa en el conjunto de dos algoritmos diferentes: redes neuronales y modelos ocultos de Markov. Es por esto que la predicción que realiza es el resultado de la correlación que existe entre los sitios de escición de la proteína y los aminoácidos que componen el péptido señal de ésta (Bendtsen *et al.*, 2004).

SecretomeP realiza su predicción tomando en cuenta 70 diferentes características de cada secuencia peptídica y examina cada una para asignarle un valor discriminatorio; los cuales finalmente se combinan en una red neuronal para emitir un resultado. Debido a que existen pocas proteínas de secreción



que siguen la vía no clásica, para validar el funcionamiento del servidor se examinan secuencias de aminoácidos, las cuales de antemano se sabe que son proteínas de secreción que no siguen la vía clásica (Bendtsen *et al.*, 2005).

Mediante TargetP es posible predecir la localización final de una proteína; debido a que funciona mediante una combinación de diferentes tipos de redes neuronales, los cuales generan una puntuación y con los soportes de maquinas de vectores (SVM por sus siglas en inglés) generan una predicción de ausencia o presencia de una presecuencia que indica la localización de la proteína evaluada (Emanuelsson *et al.*, 2007).

El predictor para topología de proteínas de membrana, TMHMM basa su funcionamiento en los modelos ocultos de Markov; puede discriminar entre proteínas solubles y proteínas membranales con una especificidad y sensibilidad del 99%. Es capaz de predecir hélices transmembranales con un 97-98% de confianza (Krogh *et al.*, 2001).

Continuando con la metodología, como primer paso de esta etapa se ingresaron las proteínas obtenidas de la base de datos EST y del predictor EMBOSS Transeq en el servidor SignalP4.1 para predecir si eran proteínas de secreción que siguen la vía clásica para su excreción. En él se activó la opción eucariota en la categoría de organismo, así como también se especificó el truncamiento de la secuencia de la proteína en 70 aminoácidos. Todas las proteínas, las cuales fueron predichas como no secretoras (proteínas que tienen una puntuación D y una probabilidad de péptido señal <0.5) fueron entonces analizadas con el servidor SecretomeP (versión 1.0) para la predicción de las proteínas de secreción que siguen la vía no clásica. En él se



trabajó utilizando la opción mamífero. Las proteínas que obtuvieron una puntuación de red neuronal (NN)  $\geq 0.9$  fueron consideradas como proteínas de secreción que siguen la vía de excreción no clásica. Todas las proteínas que conformaban el secretoma del ovocito, tanto las pertenecientes a la vía clásica como a la vía no clásica, fueron analizadas en el servidor TargetP (versión 1.1) donde se especificó el corte de 0.78 para la predicción de las proteínas mitocondriales y 0.73 para la localización celular inespecífica, y las que resultaron ser proteínas mitocondriales fueron omitidas del secretoma del ovocito bovino. Además, las proteínas del secretoma se analizaron en el servidor TMHMM con las opciones que se encuentran activas de manera predeterminada. Finalmente, las proteínas que se predijeron ausentes de hélices transmembranales fueron consideradas como proteínas de secreción (Garg y Ranganathan, 2011; Garg y Ranganathan, 2012).

**Etapas III. Análisis de las proteínas de secreción.** Las proteínas de secreción identificadas fueron sometidas a un análisis de vías metabólicas, utilizando el servidor KEGG PATHWAY (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), y se analizaron también en KEGG BRITE (<http://www.genome.jp/kegg/brite.html>) para identificar si son enzimas y/o factores de traducción. Además se buscó la homología de estas secuencias con otras mediante BLASTP, localizado en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (Garg *et al.*, 2013).

### **Análisis de la Expresión Génica en Diferentes Tejidos y Células**

**Recolección de tejidos.** Las muestras tisulares de corazón, riñón, pulmón, hígado, bazo, músculo, ovario y testículo adulto, así como de ovario y testículo fetal de bovinos, fueron colectadas del rastro TIF 366 ubicado en la



Cd. de Chihuahua, Chihuahua, México. Todas las muestras fueron colocadas en crioviales de plástico e inmediatamente inmersas en nitrógeno líquido para almacenarlas a -196 °C hasta la extracción de RNA total en el laboratorio.

**Obtención de células.** Para la adquisición de ovocitos maduros se llevó a cabo el protocolo de cultivo celular para maduración *in vitro* (MIV) utilizado en el laboratorio de Transgénesis Animal y Fertilización *in vitro* de la Facultad de Zootecnia y Ecología, UACH. Brevemente, se obtuvieron ovarios de vacas adultas del Rastro TIF de la Cd. de Chihuahua, Chihuahua y se transportaron en solución salina 0.15 M estéril a temperatura ambiente (21-25°C) al laboratorio. Una vez ahí, se enjuagaron con solución salina 0.15 M estéril para eliminar los residuos hematológicos que pudieran contener y se retiró el exceso de tejido mediante el uso de tijeras. Posteriormente se procedió a la aspiración de los COCs de folículos antrales menores a 10 mm de diámetro con una aguja de calibre 18G que se encontraba conectada a una bomba de vacío con presión de aproximadamente 5 mmHg. Finalizada la aspiración, se permitió que se sedimentara la pastilla celular obtenida para posteriormente seleccionar los ovocitos con más de 3 capas de CCs no expandidas y citoplasma homogéneamente granulado para MIV. Los COCs seleccionados se colocaron en el medio H-CDM con la finalidad de enjuagarlos y retirar cualquier remanente celular externo al COC. Después, para madurar, los COC obtenidos se agruparon de 50 en 50 y se colocaron en cajas de 4 pozos (Nunc). Cada pozo contenía 1 mL de medio para MIV suplementado con 0.5 % de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (FAF-BSA marca SIGMA), 15 ng/mL de hormona folículo estimulante porcina (Bethesda, MD), 1.0 µg/mL estradiol-17β



(SIGMA), 50 ng/ $\mu$ l de factor de crecimiento epidermal (EGF marca SIGMA) y 0.1 mM de cisteamina. Posteriormente se incubaron a 38.5°C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 23 h. Transcurrido este lapso, se retiraron las CCs de los presuntos ovocitos maduros mediante remoción mecánica, luego se colocaron en amortiguador fosfato-salino (PBS) en una caja Petri donde los ovocitos se observaron bajo el microscopio para cerciorarse de la presencia de un cuerpo polar, lo que indica que la primera meiosis ha concluido (el ovocito progresa hasta metafase II). Los ovocitos con cuerpo polar fueron desprovistos de zona pelúcida con el uso de la enzima pronasa (proteasa de *Streptomyces griseus*) y se enjuagaron tres veces con PBS para retirar cualquier contaminación. Por último, los 59 ovocitos maduros obtenidos se colocaron en 50  $\mu$ l de RNA Later (Applied Biosystems) a 4 °C hasta la extracción de RNA total.

Además de los tejidos y células mencionadas, se utilizarón ovocitos inmaduros y células de la granulosa, las cuales fueron amablemente donadas por la Q. B. P. Ana Karen Torres García y M. C. Concepción Martínez Lozoya.

**Extracción de RNA y síntesis de cDNA.** La extracción de RNA total se realizó utilizando el reactivo TRI Reagent (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, los tejidos congelados se maceraron en un mortero dentro de una hielera con nitrógeno líquido, hasta quedar totalmente pulverizados. Posteriormente se colocaron en un tubo estéril con capacidad de 1.5 mL y se homogeneizaron con 800  $\mu$ l de TRI Reagent (Invitrogen). Luego se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y se mezclaron con 200  $\mu$ l de cloroformo, nuevamente se volvió a incubar por 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a una velocidad de 13000 rpm a 4 °C durante 15 min. Después se



transfirió la fase acuosa a un tubo de 1.5 mL estéril, donde se agregaron 500 µl de isopropanol para precipitar el RNA, se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm a 4 °C por 10 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla obtenida se lavó con 1 mL de etanol grado biología molecular para después centrifugarse a 8500 rpm a 4 °C durante 5 min y finalmente se decantó el sobrenadante, se retiró el exceso de etanol y se resuspendió la pastilla obtenida en 30 µl de agua libre de nucleasas. El RNA obtenido se almacenó a -80 °C hasta la síntesis de cDNA.

En el caso particular de la extracción de RNA total de los ovocitos maduros, el procedimiento con TRI Reagent (Invitrogen) fue el mismo que se mencionó con los tejidos, sólo que aquí se agregaron 500 µl de TRI Reagent (Invitrogen) a los 50 µl de RNA later (Applied Biosystems) donde se encontraban los 59 ovocitos, por lo que los volúmenes de cloroformo, isopropanol y etanol que se utilizaron fueron ajustados a 125 µl, 312.5 µl y 625 µl, respectivamente, debido al número de células que se tenía como muestra.

Para las muestras tisulares y celulares se extrajo RNA a partir de un conjunto de la totalidad de las muestras. La concentración del RNA extraído fue determinada a través del Espectrofotómetro NanoDrop (ThermoScientific) mediante la absorbancia a 260 nm. La pureza de este ácido nucleico fue determinada calculando la relación de absorbancia entre 260 y 280 nm.

La síntesis de cDNA se realizó mediante el kit High-Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems), siguiendo las indicaciones del fabricante, para lo cual se realizó una mezcla de 2 µg de RNA (con excepción del RNA obtenido de ovocito maduro, donde se utilizó 1 µg), 10 µL del amortiguador 2X RT, 1 µL





de la enzima 20X RT y 8  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. Las reacciones se colocaron en un termociclador CORBETT bajo el siguiente programa: temperatura de 37 °C durante 60 min, seguida de la temperatura para la desactivación de la enzima, 5 min a 95 °C y por último se conservó el sistema a 4 °C. El cDNA obtenido se cuantificó en el Espectrofotómetro NanoDrop (ThermoScientific) mediante la absorbancia a 260 nm y la pureza de este ácido nucleico fue determinada calculando la relación de absorbancia entre 260 y 280 nm. El cDNA se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

**PCR en tiempo real.** Todas las reacciones se realizaron en el equipo Real Time StepOne (Applied Biosystems). Las regiones específicas para la amplificación se obtuvieron utilizando los reactivos TaqMan Universal Master Mix II y TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) que incluyen sonda específica con el reportero FAM para los genes cuantificados, además se utilizó el gen endógeno RNA18S. Se realizaron tres réplicas técnicas para cada ensayo, las reacciones se llevaron a cabo conforme las condiciones del fabricante. En la preparación de la reacción se adicionaron 50 ng de cDNA, 8  $\mu$ l de agua libre de nucleasas, 10  $\mu$ l de TaqMan Universal Master Mix II y 1  $\mu$ l de TaqMan Gene Expression Assays. Las sondas tipo TaqMan que se utilizaron amplificaron los genes correspondientes a las proteínas identificadas como secretoras por parte del ovocito (*SDF2L1*, *CARTPT*, *OOSP1*, *TNFAIP6*, *PTGS2*, *POSTN*, *P4HA3*, *TNC*, *PTX3*, *PSAP*, *SERPINE2*, *SRGN*, *INHBA*, *SRPX*, *CTSK*, *TIMP1*, *MMP1*). La cuantificación de la expresión de estos genes se normalizó tomando como referencia la amplificación del gen endógeno RNA18S.



### **Análisis Estadístico**

En el análisis bioinformático no se llevó a cabo análisis estadístico porque no lo requería. Para el análisis de la expresión génica se analizó la variable abundancia relativa de los mRNA de los genes evaluados, esta abundancia se calculó de acuerdo al método de  $\log 2^{-\Delta\Delta C_t}$  sugerido por Livak y Schmittgen (2001). Se corrió un análisis de varianza simple mediante el procedimiento GLM de SAS (Versión 9.0; SAS Institute, Inc., 2006), el cual incluyó en el modelo el efecto fijo de tejido, aunque sólo se tuvieron repeticiones técnicas y no de muestreo. La comparación de medias se realizó con una prueba Tukey con un valor de  $P < 0.05$ .

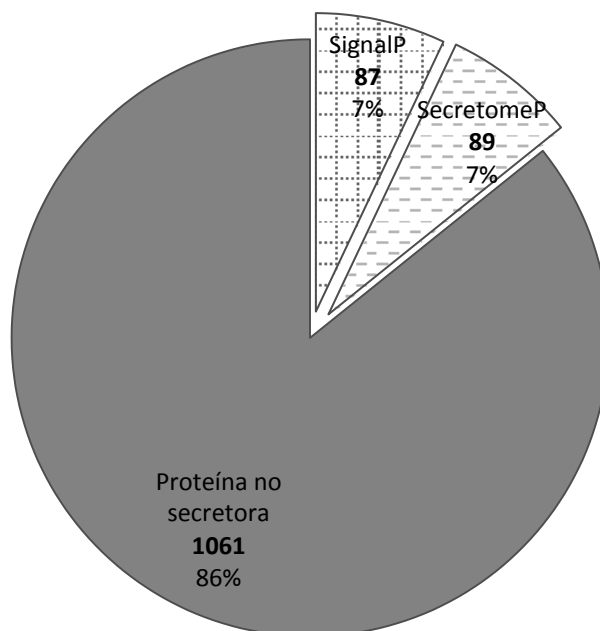


## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

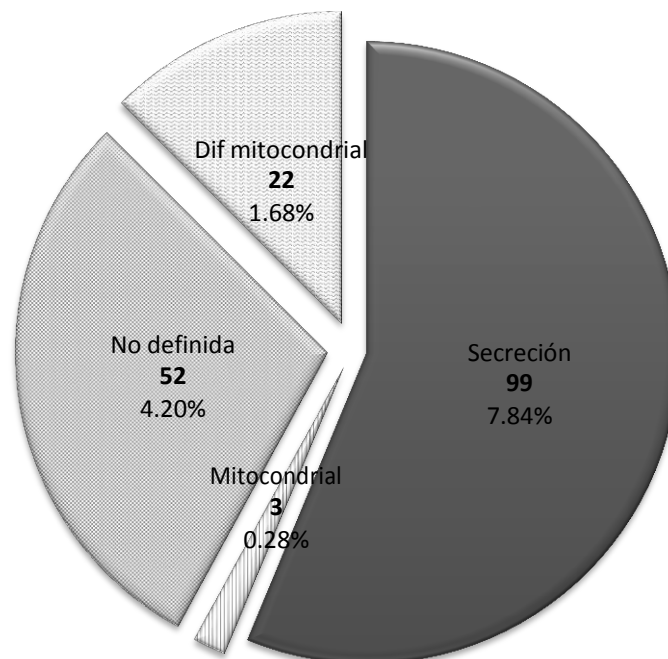
### Análisis de las Secuencias EST del Genbank de Ovocito Bovino

De las 2167 secuencias EST reportadas de ovocito bovino en el NCBI, se obtuvieron 1237 secuencias diferentes de proteínas, de las cuales 87 fueron identificadas como proteínas de secreción por la vía clásica de acuerdo al servidor SignalP. Las 1150 restantes se analizaron en SecretomeP para predecir las proteínas de secreción que siguen la vía no clásica, las cuales resultaron ser 89 (Gráfica 1). De las proteínas de secreción identificadas por ambos servidores (176) que fueron analizadas por TargetP, 3 resultaron ser mitocondriales, a 52 proteínas no se logró identificar su localización y 22 más resultaron tener una localización distinta a la mitocondrial (Gráfica 2); estas 77 proteínas fueron removidas del conjunto de las 176 presuntas proteínas de secreción y las 99 restantes se analizaron por TMHMM para la predicción de proteínas transmembranales, de las cuales 29 poseían uno o más hélices transmembranales (Gráfica 3). Un total de 70 proteínas fueron identificadas como proteínas de secreción por métodos computacionales (SignalP, SecretomeP, TargetP y TMHMM); sin embargo, se descartaron las predichas, por lo que finalmente se obtuvieron 18 probables proteínas de secreción con análisis bioinformático que poseen referencia en el NCBI.

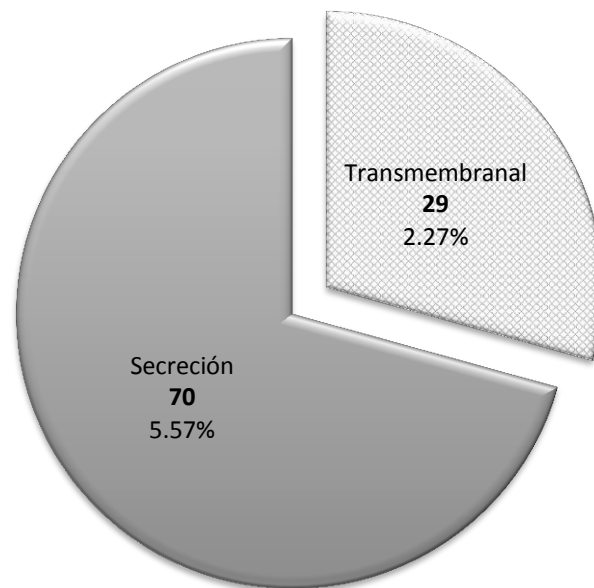
Dentro de las 18 proteínas de secreción se encuentra *GDF9* y, dado que es un OSF muy estudiado, se descartó para este análisis. En el Cuadro 3 se muestran las secuencias de cada una de las proteínas seleccionadas. De las 17 (1.37 %) proteínas restantes se obtuvo la vía metabólica en la cual participan, su función



Gráfica 1. Proteínas de ovocito bovino identificadas como proteínas de secreción por SignalP y Secretome P.



Gráfica 2. Proteínas de ovocito bovino identificadas como proteínas mitocondriales.



Gráfica 3. Proteínas de secreción identificadas.



Cuadro 3. Secuencias de los OSFs identificados. Los aminoácidos en negritas y subrayados corresponden a la secuencia del péptido señal de secreción

GENEBANK (No. acceso NCBI)	NOMBRE	ABREVIACIÓN	SECUENCIA
NP_001030400.1	Precursor del factor 2 derivado de células estromales parecido al 1	SDF2L1	<b><u>MWSAGSGRAAGPALLGILLALSLSGGRA</u></b> AKSDAGLVTCGSVLKLFNTQHR VRLHSHDIKYGSGSGQQSVTGVEASDDANSYWRIRGGTEGECPRGSPVRC GQAVRLTHVLTGKNLHTHHFPSPLTNNQEVSAFGEDGEGDDLWTVRCS GQHWEREAAVRFQHVGTSVFLSVTGEQYGSPIRGQHEVHGMASASAHNK WKAMEGIFIKPSPEAPGGHDEL
NP_001007821.1	Precursor de la proteína de transcripción regulada por cocaine y anfetamina	CARTPT	<b><u>MESPRLRLPLLLGAALLLLPLLGALA</u></b> QEDAE LQPRALDIYSAVEDASHEKE LIEALQEV LKKLKS KRIPIYEKKYQGVPMCDAGEQCAVRKGARIGKLCDCPR GTSCNSFLLKCL
NP_001033776.1	Precursor de la isoforma 1 de la proteína 1 secretada por el ovocito	OOSP1	<b><u>MKPSSGLRGLLVLFSLTWTC</u></b> AGDWSAVKVRC SYFWFYAKIKPTLFHNL YM NPDEAFLGND CPVTYVSPDAH YEFFYYSNKC GIITKTFQETLL LQTKIKYMSS NSGDTAEMPVSCVVTQQACMYHLSNETESGDDETSSSEDMEVSYIMQSQND LNTTFSLCAK
NP_776896.1	Precursor del inhibidor de metaloproteinasas 1	TIMP1	<b><u>MAPFAPMASGILLLLWL TAPSRA</u></b> CTCVPPHPQTAF C NSDVVIRAKFVGTA E VNETALYQRYEIKMTKMFKGFSALRDAPDIRFIYTPAMESVCGYFHR SQNRS EEFLIAGQLSNGHLHITTC SFVAPWNSMSSAQR RGFTKYAAGCEECTVFP CSSIPCKLQSDTHCLWTDQLLTGSDKGFQSRHLACLPREPGLCTWQSLRAQ MA
NP_776537.1	Metaloproteinasas 1	MMP1	<b><u>MPRLPLLLLLLWGTGSHG</u></b> FPAATSETQE QDVETVKKYLENYYNLNSNGKKV ERQRNGGLITEKLKQM QKFFGLRVTGKPD AETLNV MKQPRCGVPDVAPFVL TPGKSCWENTNLTYRIENYTPDLSRADVDQAIEKAFQLWSNV TPLTFTK VSE GQADIMISFVRGDHRD NSPFDGPGGNLAHAFQPGAGIGGDAHFDDDEWWT SNFQDYNLYRVA AHEFGHSLGLAHSTDIGALMYP SYTFSGDVQLSQDDIDGI QAIYGPSQNPTQPVGPQTPEVCD SKLTFDAIT TIRGEVMFFKDRFYMRTNPL YPEVELNFISVFWPQLPNGLQAAYEVADRDEVRFFKG NKYWAVKGGQDVL R GYPRDIYRSFGFPRTVKSIDAAVSEEDTGKTYFFVANKCWRYDEYKQSM DA GYPKMIAEDFPGIGNKVD AVFQKGGFFYFFHGR RQYKFD PQTKRILTLLKAN SWFNCRK N



GENEBANK (No. acceso NCBI)	NOMBRE	ABREVIACIÓN	SECUENCIA
NP_001007814.1	Precursor de la proteína 6 inducible para el factor de necrosis tumoral $\alpha$	TNFAIP6	<p><b>MIILYLFVLLWEEAHG</b>WGFKNGIFHNSIWLEQAAGVYHREARSQKYLTYA EAKAVCEYEGGHLATYKQLEAARKIGFHVCAAGWMAKGRVGYPIVKPGPN CGFGKTGIIDYGIRLNRSERWDAYCYNPHAKECGGVFTDPKRIFKSPGFPNE YDDNQICYWHIRLKYGQRIHLSFLDFDLEDDPACLADYVEVYDSYDDVHGFEV GRYCGDELPEIIISTGNVMTLKFSLDASVTAGGFQIKYVAVDVPSKSSQGN ASTTSTTSTGNKNFLAGRFSHL</p> <p><b>MLARALLCAAVALS</b>GAANPCCSHPCQNRGVCMSVGFDDQYKCDCTRTGF YGENCTTPEFLTRIKLLKPTPNTVHYILTHFKGVWNIVNKISFLRNMIMRYVL TSRSHLIESPPTYNVHYSYKSWEAFSNLSYYTRALPPVPDDCPTPMGVKGR KELPDSKEVVKKVLLRRKFIPDPQGTNLMFAFFAQHFTHQFFKTDFERGPAF TKGKNHGVDSLHIYGESLERQHKLRFLKDGKMKYQMINGEMYPTVKDTQV EMIYPPHVPEHLKFAVGQEVFGLVPGLMMYATIWLREHNRVCDVLKQEHPE WGDEQLFQTSRLILIGETIKIVIEDYVQHLSGYHFKLKFDPELLFNQQFQYQN RIAAEFNTLYHWHPLLPDVFQIDGQEYNYQQFIYNNVSVLLEHGLTQFVESFT RQRAGR VAGGRNLPVAVEKVKASIDQSREMKYQSFNERYKRFLVKPYESF EELTGEKEMAAELEALYGDIDAMEFYALLVEKPRPDAIFGETMVEAGAPFS LKGLMGNPICSPEYWKPSTFGGEVGFKIINTASISLICSNVKGCPTFSFSVQ DTHLTKVTINASSSHSGLDDINPTVLLKERSTEL</p> <p><b>MIPFLPVCSLFLLLVVNPAN</b>ANGHYDKILAHSRIRGRDQGNVNCALQQILGT KKKYLSTCRNWWYQGAICGKKTTVLYECCPGYMRMEGMKGCPAVMPIDHVV GTLGIVGATTTQSYSDVSKLREEIEGKGSFTYFAPSNEAWDNLDSDIRRGLE SNVNVELLNALHSHMVNKRMLTKDLKNGMIIPSMYNNLGLFINHYPNGVTV NCARIHGNQIATNGVVHVIDRVLTQIGTSIQDFIEAEDELSSFRAAAITSDILET LGRDGHFTLFAPTNEAFEKLPRGVLERIMGDKVASEALMKYHILNTLQCSEAI MGGAVFETLEGNTIEIGCDGDSITVNGIKMVNKKDIVTNNNGVIHLIDQVLVPDS AKQVIELAGNQQTTFDTLVAQLGLASALRPDGEYTLAPVNNAFSDDTLMSD QRLLKLILQNHILKVKIGLNELYNGQKLETIGGKQLRVFVYRTAVCIENSCMVR GSKQGRNGAIHIFQEIIPAEKSLHEKLKQDKRFSIFLSLLEAADLKELLTQPG DWTLFVPTNDAFKGMTNEEKEILIRDKNALQNIILYHLTPGVFIGKGFEPGVT NILKTTQGSKIYKGVNDTLLVNELKSKESDIMITTNGVIHVVDKLLYPADTPVG NDQLLEILNKLKIYIQIKFVRGSTFKIPIITYKPIIKYTKIIGDVPVEITEKETRE ERIITGPEIKYTRISTTGGETEETLKKLLQEEVTKVTKFIEGGDGHLEFDEEIKR LLQGDTPVRKIQANKRVQASRRRSREDRPQ</p>
NP_776870.1	Precursor 2 de la sintasa para prostaglandina G/H	PTGS2	
NP_001035569.1	Precursor de periostina	POSTN	





GENEBANK (No. acceso NCBI)	NOMBRE	ABREVIACIÓN	SECUENCIA
NP_001001598.1	Precursor de la proteína 4 prolil hidroxilasa con subunidad $\alpha$ tipo 3	P4HA3	<b>MGPAARLAALLAVLAFRAG</b> DPAEVAARGDTFSALTSVARALAPERRLGLL RRYLRGEEARLRDLTRFYHKVLSLHEDSATPVSNPLLAFTLIKRLQSDWKNV VHSLEASENIRALKDGYERVEQDLPAFEDLEGAARALMRLQDVYMLNVKGL ARGVFQRTGSAVTDLYSPRRLFSLTGDDCFQVGKVAYDMGDYHAIPWL EEAVSLFRGSYGEWKTEDEASLEDALDHLAFAYFQAGNVLCALNLSREFLLY SPDNKRVARNVLYKYEKLLAESPNQAVAETVMQRPNVPHLQTRDTYEGLCQT LGSQPTHYRIPSLYCSYETSSSPYLLLQPVRKEVIHLEPYVVLYHDFVSDAEA QTIRGLAEPWLQRSVVASGEKQLPVEYRISKSAWLKDTVDVPLVTLDHRIAA LTGLDVQPPYAEYLQVVNYGIGGHYEPHFDHATSPSSPLYRMNSGNRVATF MIYLSSVEAGGATAFIYGNFSVPVVKNAALFWWNLHRSGEQDGTDLHAACP VLVGDKWVANKWIHEYGQEFRRPCSSRPED <b>MPINRMWGLTVLLLPVVSFAL</b> YPEEILDQWELWKKTYRKQYNSKGDSEIR RLIWEKNLKHISIHNLASLGVHTYELAMNHLGDMTSEEVVQKMTGLKVPAS RSRSDNTLYIPDWEGRAPDSVDYRKKGYVTPVKNQGGQCGSCWAFSSVGAL EGQLKKKTGKLLNLSPQNLVDCVSENDGCGGGYMTNAFQYVQKNRGIDSE DAYPYVGQDENCMYNPTGKAAKCRGYREIPEGNEKALKRAVARVGPISVAI DASLTSFQFYRKGVYYDENCNSDNLNHAFLAVGYGIQKGNKHIIKNSWGE NWGNKGYILMARNKNNACGIANLASFPKM <b>MHISVILFCALWSA</b> VSAENSDDYELMYVNLNDNEIDNGLHPTEDPTPCDCSRE NSEWDKLFMTLENSQMREGMLLQATDVMLRGELQKLQAELEGSLQKL CGPEAPSETRLARALDDLLQASRDAGRRLARLEDAGALRPQEEAGRALGAV LEELRRTRADLRAVQGWAAASRWLPAGCETAILFPMRSKKIFASVHPVTPMK LETFSACIWWKATEVLNKTVLFSYGTNRNPYEQLYLSYRSIMLVVGGEENRL VADAVISLGTWTHLCSTWDSKKGHMALWVNGDSVATAVDMATGHVVPEG GILQIGQEKNGCCVGGGFDETLAFSGRLTGFINWEGVLSNEEIREAGGAESC HIRGNVVGWGVTEIQPHGGAQYVY <b>MQVLLQCARLVLAALFILFSSSVQGS</b> PVQRAGYQCNPDSPPDSNSANCIEEK GTAFDILRGESSRIPPRTDISPLMNSKNLNEVFPLSEDISGSGSGAESGSGF LNEIEQEYQPVEENDAFYYTFRSRKRNVPVSYNQDLGQDGPEDFTI
NP_001029607.1	Precursor de catepsina K	CTSK	
NP_001069727.1	Precursor de la proteína relacionada a pentraxina	PTX3	
NP_001020497.1	Precursor de serglicina	SRGN	



GENEBANK (No. acceso NCBI)	NOMBRE	ABREVIACIÓN	SECUENCIA
NP_776586.1	Precursor de prosaponina	PSAP	<b><u>MYSFFVLASLLGGALA</u></b> SPVLGLRECTRGSVAVWCQNVKTAADCGAVQHCLQ TVWSKPTVKSLPCDICKDVITAAGNLLKDNATEQEILMYLERTCDWLPKPNM SASCKEIVDSYLPVILDMIKQMSPHGEVCSALNLCESLQKHLAELNHQKQL ESNQIPELDMAEVVAPFMANIPFLLYPQDGSHSKPQPKKANGNVQCDCIQLV TDVQEALRTNSTFVEALVDHAKEECDRLGPGMSDMCKNYINQYSEVAIQMV MHMQPKKEICVLAGFCDEVKEMPMKTLVPAEVVSENVIPALGLVEPIKKDPAP AKADIYCEVCEFFVVEKAVKLIDNNRTEEEILHALDKVCSKLPTSLAEQCCQEVV DTYGSSILSILLDEASPELVCSMLHLCSSRGLPAATVRVMPRKDGGFCEVCK KLVGYLDRNLEKNSTKEQILAALKEGCSFLPDQYRKQCDQFVTEYEPVLEIL VEVMDPSFVCLKIGACPAAHKPLLGAKECVWGPSYWCQNMEASALCNAVE HCRRHVWN <b><u>MNWHFPFFLVASVTLPVCS</u></b> QFNPLSLEELGSDTGIVFNQIVKSQPHDNIII SPHGIASVLGMLQLGADGRKKQLTTVMRYGVNGVGKMLKINKAIVSKKN KDIVMVANAVFVKNDKMEVPFVTRNKDVFCQEVNRANFEDPASACASINA WVRNETQGMIDSLSPDLLNGVLRVLVNAVYFKGLWRSRFLPENTKKRT FVAADGKSYQVPMLAQLSVFRCGSTSTPSGLWYNFIELPYHGESISMLIALP TESSVPLSAIVPHISTKTIDSWVSTMVPKRVQVILPKFTAVAQTDLKEPLKVLG ITDMFDPSKANFAKITRSENHVSILQKAKIEVSEDGKASAATTAILIARSSP PWFIVDRPFLFFIRHNPTGAVLFMGQINKP <b><u>MPLLWLRGFLLASCWIVRS</u></b> SPTPGSEGHSAAPDCPSCALATLPKDVNSQ PEMVEAVKKHILNMLHLKKRPDVTQVPVKAALLNAIRKLHVGVKVGNGYVEI EDDIGRAEMNELMEQTSEIITFAESGTARKTLHFEISKEGSDLSVVERAEIW LFLKVPKANRTRSKVTIRLFQQQKHLQGS LDAGEEAEVGLKGEKSEMLISE KVVDARKSTWHIFPVSSCIQRLLDQGKSSLDIRIACEQCQETGASLVLLGKKK KKEEEGEGKKRDGEGGAGGDEEKEQSHRPFLMLQARQSEDHPHRRRRRG LECDGKVNICKKKQFFVSFKDIGWNDWIIAPSGYHANYCEGECPSHIAGTSG SSLSFHSTVINHYRMRGHSPFANLKSCCVPTKLRPMSMLYDDGQNIKKDI QNMIVEECGCS
NP_777094.1	Inhibidor E2 de serin proteasa	SERPINE2	
NP_776788.1	Precursor de la cadena βA de la inhibina	INHBA	



GENEBANK (No. acceso NCBI)	NOMBRE	ABREVIACIÓN	SECUENCIA
		TNC	<p><b><u>MGVMTRLWAGLFLALLALPAEG</u></b>GVLKKVIRHKQQSGMNVTLPEENQPVVF  NHVYNIKLPVGSQCSVDLESASGEKDLAAPSEPRESFQEHTVDGENQIVFTH  RINIPRRACGCAAAPDVKELLSRLEELLENLVSSLREQCTSGAGCCLQSAEGR  VDTRPFCSGRGNFSTEGCGCVCEPGWKGPNCSEPECPGNCHLHGQCLDG  QCVCHEGFTGEDCGQLACPSDCNDQGKVDGACVCFEGYSGLDQCSQETC  PVPCSEEHGRCVDGRCVCQEGFAGEDCREPLCLHNCHGRGRCVENECVC  DEGFTGDDCGELVCPNDCFDRGRCLNGTCSCDEGFTGEDCGQLACPHAC  HGHGRCDEGQCVCDEGFAGPDCSERRCPSDCHERGRCDVGRCECNDGF  TGADCGELQCPRDCSGHGRCVNGQCVCDEGYTGEDCGQRQCPSPDCHGR  GRCVDGLCECQPGFQGDGCGEMSCPHDCHQHGRCVNGMCVDDAYTGE  DCRELRCPGDCSQRGRCDVGRVCEDGFAGPDCADLACPGNCHGRGRC  VDGQCVCLEGFTGPDCAQRRCPGDCHGQGRCDVGGQVCHEGFTGPDCA  QRSCPNDCSNWQQCVSGRCVCNEGYTGEDCSQVSPPKDLVVTEVTEETV  NLAWDNEMRVTEYLIVYTPTHEDGLEMQFRVPGDQTSATIRELEPGVEYFIR  VFAILENKKSIPVSARVATYLPTEGLKFKSIKETSVEVEWDPLDIAFETWEVI  FRNMNKDDEEITKSLRRPETTYRQTGLAPGQYEISLHIVKNNTRGPGLKR  VTTTRLDAPSQIEVKDVTDTTALITWSKPLAEIDSIELMYGIKDVPGDRTSIDL  HEENQYSIGNLKPDEYEVALISRRADMSSNPAKETFTTGLDAPRNLRRISQ  TDNSITLEWRNVKAAADSYRIKYAPISGGDHAEEVPRSQQTTRTTTLTGLR  PGTEYGIGVSAVKGDKESDPATINAATELDTPKDLRISDPTETSLTLVWQTPV  AKFDRYRLNYSLSGQPKEVQLTRDTTSFVLRGLEPGQEYSILLTAEKGRHK  SKPARVQASTDHTPELGNLTVTKAGWDGLRLNWTAAADQAYEHFVIQVQEA  NGVEAAQNLTVPGNLRAVDVPGLKAATPYRVTIHGVIRGYRTPVLSAEASTG  DTPHLGEVTVSEVGWEALKLNWTAPEGVYEQFLIQVQEPGKEEAAQNLTVP  GGLRSVDLPGLKAATHYSITIRGVTRDFSTAPHSVEALTAMGSPKEIIFSDITE  NAASVSWMAPTTQVESFRVTYVPIAGGAPSAVTVDGTKTQTRLLRLLPGAD  YLVSVIALKGFESEPVSGTLTTALDGPSSLVTANITDSEALAMWQPAIAPVD  NYVISYTGERVPEITRTVSGNTVEYALTNLPEATEYTLRIFAEGKGPQKSSTIIT  KFTTDLDSRPDFTATEVQSETALLTWRPPRASVTGYLLVYESVDGTIKEVVL  DPDTSYSYSLDLSYSTYYTARIQALNGTLRSKTVKTIFFTSGVLYRFPDRCSQ  AMLNGDTSYSGVYTIYLNNDKTQKQEVFCDMTSDGQGVIVFLRRKNGREDF  YRNWKAYAAGFGDLKEEFWLGLDLSKITAQQQYELRVDLRDHGESAHAVY  DKFSVGDARTRYRLKVEGYSGTAGDSMAYHNGRSFSTFDKDTDSAITNCAL  SYKGAFWYKNCHRVNLMGRYGDNSHSQGVNWFHWKGHEHSIQFAEMKLR  PSNFRNLEGRRKRA</p>
NP_001071494.1	Precursor de tenascina		



GENEBANK (No. acceso NCBI)	NOMBRE	ABREVIACIÓN	SECUENCIA
NP_001035579.1	Precursor de la proteína con repetidos dominios sushi	SRPX	<b>MGSPALRPALLLLPLLLRVPPSRG</b> FPGSGDSPLEDDEVVYSDAKYKDIPW CSPIKVKYGDVYCRAPQGGYYKTTLGTRCDIRCQKGYELQGSPQVICQSNK RWSDKVICKQKRCPTLAMPVNGGFKCIDGAYFNSQCEYYCSPGYTLKGEQ TVRCMDNKAWSGQPATCVDLEPPRIKCPSVKERVAEPNKLTVRVSWETPE GRDTADGILTDVILKGPPPGSHFPEGDHKIQYTVYDRAENKGTCQFRVKVRV RRCGKLHAPENGYMKCSSDGDNYGAVCEFSCVGGYELQGSSARVCQSNL AWSGTEPTCTAMNVNVGVRTAAALLDQYYEKRRLFIVSTPTARNLLYRLQL GMLQQAQCGLDLRHITVVELVGVFPTLIGRIGAKVMPPALALQLRLLLRIPLY SFSIVVLDKHGVDKERYVSLVTPVALFNLIDTFPLRKEEMVLQAEMGQTCNT



y homología con otras especies (Cuadro 4). De acuerdo a esto, los OSFs se clasificaron con base a su función celular. El 58.8 % fueron proteínas de matriz extracelular (ECM); 29.4 % fueron proteínas de secreción que al ser reconocidas por un receptor participan activando un proceso de señalización y 11.8 % fueron proteínas de función no identificada (Cuadro 5).

### **Análisis de la Expresión Génica de los OSFs Identificados**

Con el fin de analizar la expresión de los OSFs identificados por medio de la bioinformática en el bovino; se procedió a realizar una evaluación cuantitativa del mRNA de los genes que codifican para cada uno de los OSFs, con la finalidad de conocer aquellos que se expresen de forma exclusiva en el ovocito, o bien, que además de expresarse en el ovocito pueden ser expresados por otros tipos celulares (Cuadro 6). Primeramente, este análisis se condujo de forma global utilizando diversos tejidos somáticos (corazón, pulmón, riñón, hígado, bazo, músculo, testículo adulto, testículo fetal, ovario adulto y ovario fetal). Posteriormente el análisis de expresión se realizó en células foliculares (células de la granulosa, ovocito inmaduro y maduro). Los resultados se mencionan a continuación respetando la clasificación de función celular de cada OSFs (Cuadro 5).

### **Expresión de OSFs de Matriz Extracelular**

***MMP1***. Las metaloproteinasas (MMPs) son una familia de más de 20 enzimas proteolíticas extracelulares que destruyen todos los componentes de la matriz extracelular (ECM), éstas incluyen cuatro clases: colagenasas, gelatinasas, estromelisin y enzimas tipo membrana (Brikedal-Hansen *et al.*, 1993; Häggglund *et al.*, 1999). La metaloproteinasa 1 (*MMP1*) es una



Cuadro 4. Proteínas de secreción identificadas, las rutas metabólicas en las que participan, su función y homología con otras especies

Número de acceso NCBI	Nombre	Vía metabólica (KAAS)	Función (KEGG Brite)	Homología
NP_001030400.1	Precursor del factor 2 derivado de células estromales parecido al 1 (SDF2L1)	-	-	<i>Bos mutus</i>
NP_001007821.1	Precursor de la proteína de transcripción regulada por cocaine y anfetamina (CARTPT)	Vía de señalización adipocitocina	Neuropéptido relacionado con el apetito en humanos	<i>Fukomys damarensis</i> <i>Mus musculus</i>
NP_001033776.1	Precursor de la isoforma 1 de la proteína 1 secretada por el ovocito (OOSP1)	-	-	<i>Bos mutus</i>
NP_776896.1	Precursor del inhibidor de metaloproteinasas 1 (TIMP1)	HIF-1 (Factor inducible por hipoxia) PPAR (Receptor activador de la proliferación de peroxisomas) Artritis reumatoide Cáncer	Transducción de señales	<i>Ovis aries</i>
NP_776537.1	Metaloproteinasas 1 (MMP1)		Hidrolasa, peptidasa	-
	Precursor de la proteína 6 inducible para el factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNFAIP6)			<i>Sus scrofa</i> <i>Equus caballus</i> <i>Oryctolagus cuniculus</i> <i>Homo sapiens</i> <i>Macaca mulatta</i> <i>Myotis brandtii</i> <i>Mus musculus</i> <i>Ratus norvegicus</i> <i>Pteropus alecto</i>
NP_001007814.1		-	Proteína de matriz extracelular	



Número de acceso NCBI	Nombre	Vía metabólica (KAAS)	Función (KEGG Brite)	Homología
NP_776870.1	Precursor 2 de la sintasa para prostaglandina G/H (PTGS2)	Metabolismo del ácido araquidónico En la vía de señalización NF- $\kappa$ B, VEGF, TNF, oxitocina, sinapsis serotoninérgica, esteroidogénesis ovárica, regulación de lipólisis en adipocitos, cáncer	Participa en transducción de señales, enzima	<i>Capra hircus</i> <i>Ovis aries</i> <i>Bubulus bubalis</i> <i>Canis lupus familiaris</i> <i>Sus scrofa</i> <i>Ailuropoda melanoleuca</i> <i>Felis catus</i>
NP_001035569.1	Precursor de periostina (POSTN)	-	-	<i>Homo sapiens</i> <i>Camelus ferus</i> <i>Bos mutus</i>
47 NP_001001598.1	Precursor de la proteína 4 prolil hidroxilasa con subunidad $\alpha$ tipo 3 (P4HA3)	Metabolismo de arginina y prolina Vías metabólicas en general	Oxidoreductasa	<i>Homo sapiens</i> <i>Mus musculus</i> <i>Heterocephalus glaber</i> <i>Ailuropoda melanoleuca</i>
NP_001071494.1	Precursor de tenascina (TNC)	Vía de señalización PI3-Akt, adhesión focal, interacción receptor-matriz extracelular y MicroRNAs en cáncer	Transducción de señales, señalización molecular e interacción, comunidad celular y componente de matriz extracelular	



Número de acceso NCBI	Nombre	Vía metabólica (KAAS)	Función (KEGG Brite)	Homología
NP_001029607.1	Precursor de catepsina K (CTSK)	Lisosoma, diferenciación de osteoclastos, artritis reumatoide y en vías de señalización con receptores Toll	Procesos celulares, desarrollo de osteoclastos, hidrolasa, peptidasa, chaperonas	<i>Bos mutus</i> <i>Macaca mulatta</i> <i>Sus scrofa</i> <i>Canis lupus familiaris</i> <i>Synthetic construct</i> <i>Homo sapiens</i> <i>Oryctolagus cuniculus</i> <i>Fukomys damarensis</i> <i>Tupaia chinensis</i>
NP_001069727.1	Precursor de la proteína relacionada a pentraxina (PTX3)	-	-	
NP_776586.1	Precursor de prosaponina (PSAP)	Lisosoma	Transporte y catabolismo	<i>Bos mutus</i> <i>Sus scrofa</i> <i>Heterocephalus glaber</i> <i>Synthetic construct</i>
NP_777094.1	Inhibidor E2 de serin proteasa (SERPINE2)	Nexina derivada de la glía	Proteínas de unión a glucosaminoglucano	<i>Homo sapiens</i> <i>Bos mutus</i>
NP_001020497.1	Precursor de serglicina (SRGN)	-	-	





Número de acceso NCBI	Nombre	Vía metabólica (KAAS)	Función (KEGG Brite)	Homología
NP_776788.1	Precursor de la cadena βA de la inhibina (INHBA)	Interacción de receptors citocina-citocina Vía de señalización TGF-β, vía de señalización que regula la pluripotenciales de las células madre	Citocina Señalización celular Comunicación celular Chaperonas	<i>Capra hircus</i> <i>Ovis aries</i> <i>Homo sapiens</i> <i>Bos mutus</i>
				<i>Rattus novvergicus</i> <i>Mus musculus</i> <i>Sus scrofa</i> <i>Mesocricetus auratus</i> <i>Fukomys damarensis</i> <i>Edulis catus</i> <i>Homo sapiens</i> <i>Mus musculus</i> <i>Camelus ferus</i>
NP_001035579.1	Precursor de la proteína con repetidos dominios sushi (SRPX)	-	-	<i>Bos mutus</i> <i>Ailuropoda melanoleuca</i> <i>Tupaia chinensis</i>



Cuadro 5. Clasificación de los OSFs de acuerdo a su función celular

TIPO DE PROTEÍNA	PROTEÍNA SECRECIÓN IDENTIFICADA
Proteínas de Matriz Extracelular	<i>CTSK</i>
	<i>TIMP1</i>
	<i>MMP1</i>
	<i>SRGN</i>
	<i>TNPAIP6</i>
	<i>POSTN</i>
	<i>P4HA3</i>
	<i>TNC</i>
	<i>PTX3</i>
	<i>SERPINE2</i>
Proteínas de Señalización	<i>CARPT</i>
	<i>PTGS2</i>
	<i>INHBA</i>
	<i>SDF2L1</i>
	<i>PSAP</i>
Proteínas de función no identificada	<i>OOSP1</i>
	<i>SRPX</i>



Cuadro 6. Expresión de los genes evaluados en los diversos tejidos y células analizados

Gen/tejido	Corazón	Pulmón	Riñón	Hígado	Bazo	Músculo	Testículo adulto	Testículo fetal	Ovario adulto	Ovario fetal	Célula de la granulosa	Ovocito inmaduro	Ovocito maduro
<i>mmp1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>timp1</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>tnfaip6</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
<i>ptx3</i>	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>postn</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>p4ha3</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>tnc</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>ctsk</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>serpine2</i>	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>srgn</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>cartpt</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>sdf2l1</i>	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>ptgs2</i>	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
<i>psap</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>inhba</i>	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>oosp1</i>	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>srpx</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-

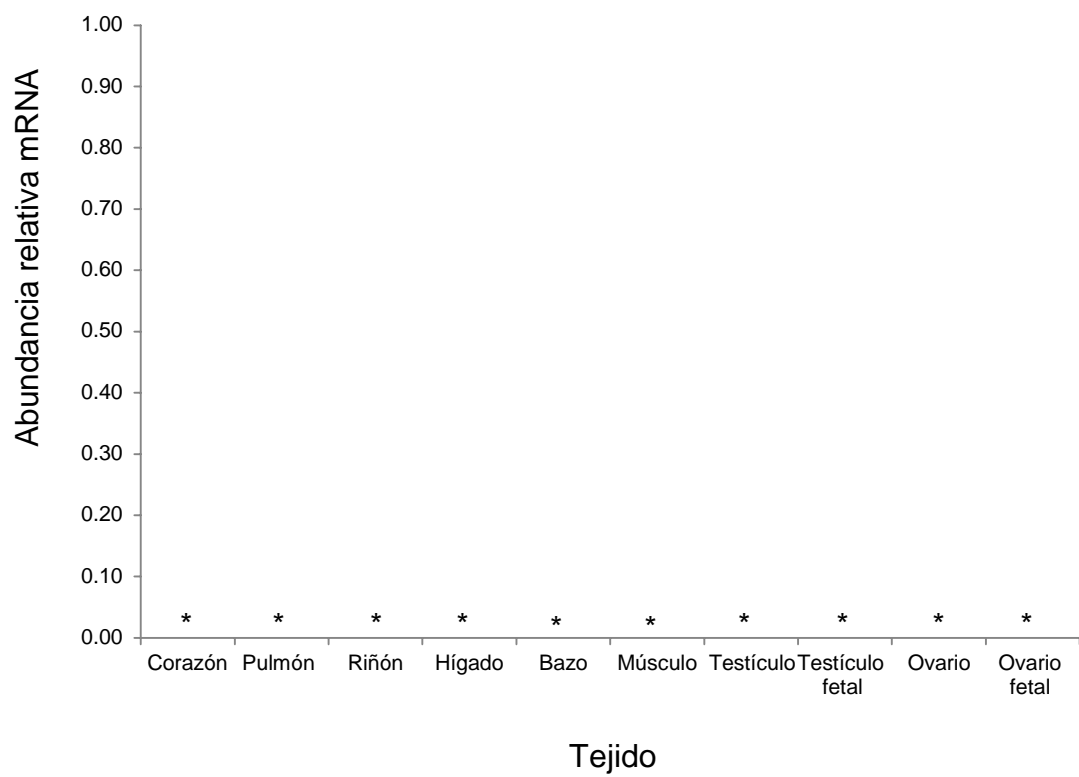
+ Presencia de la expresión del gen.

– Ausencia de la expresión del gen.



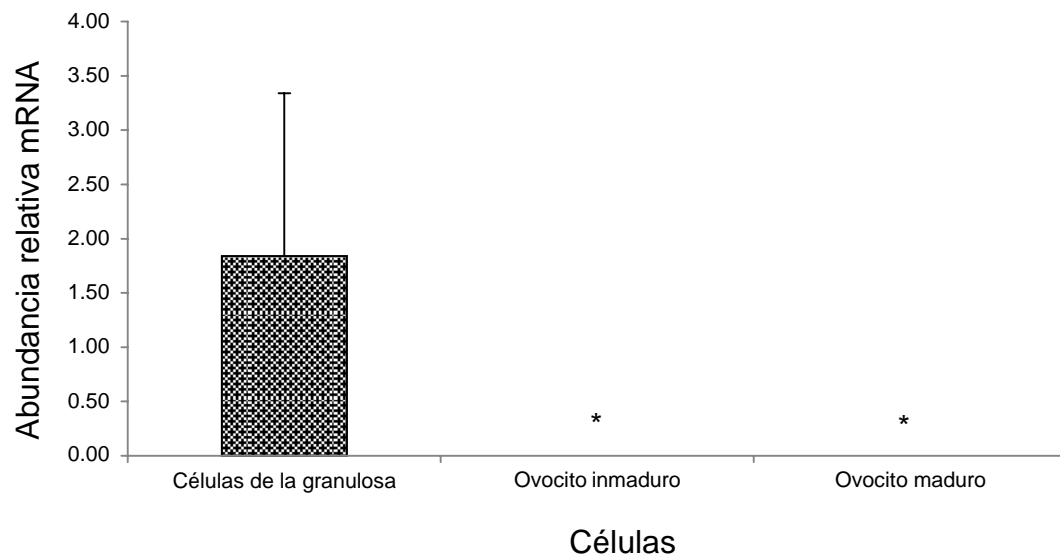
colagenasa, que degrada el colágeno, mayor componente de la ECM (Iwahashi *et al*, 2000; Curry y Osten, 2001). La ECM provee un soporte filamentoso donde las células que componen un tejido están sostenidas. Aquí las MMPs participan en la remodelación de ésta durante procesos fisiológicos (Brikedal-Hansel *et al*, 1993; McIntush y Smith, 1998). En este estudio no se encontró expresión del gen que codifica para esta proteína en ninguno de los tejidos analizados (Gráfica 4), ni en los ovocitos inmaduros y maduros (Gráfica 5), solamente se encontró expresión de éste en las células de la granulosa (Cuadro 6); lo que delimita claramente su especificidad en las células foliculares. Esto coincide con las investigaciones realizadas por Tadakuma *et al.* (1993), en las que se encontró la presencia de *MMP1* en células de la teca y de la granulosa que se encontraban rodeando el orificio de ruptura folicular en conejos, y con los resultados de Roswell *et al.*(2014) quienes detectaron la presencia de *MMP1* en niveles 100 veces más altos en las CGs que en células de la teca en ovarios humanos. La explicación del porqué *MMP1* está presente en las CGs puede deberse a que durante la ovulación es necesaria la degradación de fibras de colágeno en el folículo, y probablemente *MMP1* es esencial para iniciar la degradación de colágeno fibrilar en la túnica albugínea (McIntush y Smith, 1998). Además, como la foliculogénesis está caracterizada por múltiples modificaciones que sufre el folículo en su crecimiento, el tejido conectivo del ovario debe ser remodelado y las MMPs específicas son llamadas para que actúen en respuesta a señales hormonales (Curry y Osten, 2001).

***TIMP1.*** Durante la ovulación, la degradación proteolítica de la pared folicular es requerida para liberar el ovocito maduro, donde proteasas como



Gráfica 4. Abundancia relativa mRNA de *mmp1* en tejidos somáticos.

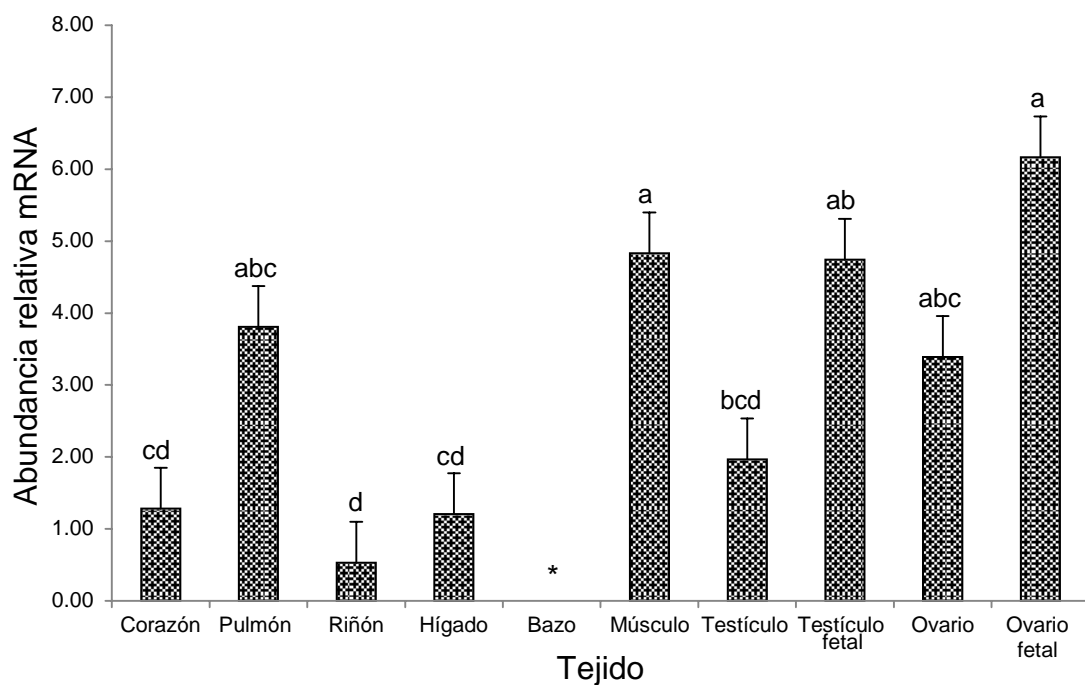
\*Indica expresión nula.



Gráfica 5. Abundancia relativa mRNA de *mmp1* en las células foliculares.  
\*Indica expresión nula.



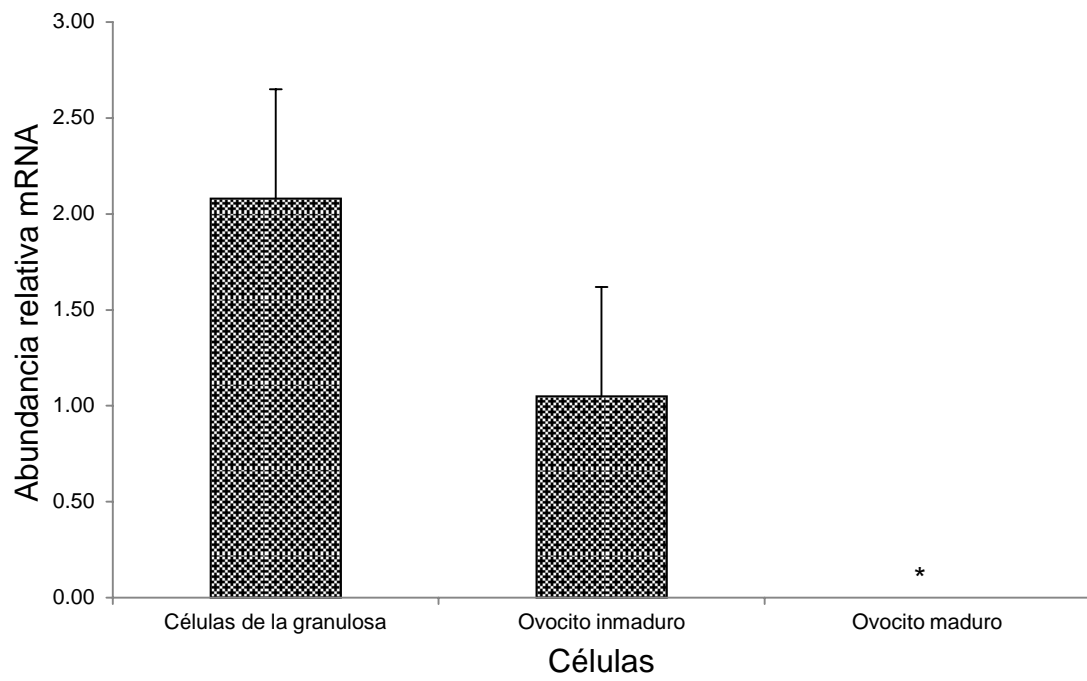
MMPs tienen un papel importante. Estas MMPs pueden ser inhibidas por proteínas inhibidoras de metaloproteinasas tisulares, conocidas como TIMPs (Hägglund *et al.*, 1999). El gen para el precursor de *TIMP1* se encuentra localizado en el cromosoma X del bovino y se denomina *timp1* (Amaral *et al.*, 2002). *TIMP1* es un péptido multifuncional implicado en el proceso de ovulación capaz de exhibir actividad esteroideogénica *in vitro*, pero no hay evidencia de esto en sistemas *in vivo* (Nothnick *et al.*, 1997). En la presente investigación se encontró que *TIMP1* se expresa en 9 de los 10 tejidos analizados (Gráfica 6), siendo la expresión más elevada en ovario y testículo fetal, así como en músculo ( $P < 0.05$ ). En lo que respecta a la expresión de *timp1* en células foliculares (Gráfica 7), sólo se expresó en CGs y ovocito inmaduro. Aunque no hubo diferencia estadística ambos tipos celulares ( $P > 0.05$ ), es notorio que la expresión tiende a ser mayor en CGs. Esto coincide con lo reportado por Hägglund *et al.* (1999), quienes reportaron que *TIMP1* fue localizada en CGs y de la teca de folículos ovulatorios y preovulatorios grandes; además, la expresión de esta proteína fue dinámicamente regulada en el ovario durante el período preovulatorio y expresada en altos niveles en la ovulación. Bagavandoss (1998) detectó mediante inmunofluorescencia la presencia de *TIMP1* principalmente en vasos sanguíneos y células de la teca, en menor cantidad que en CGs, y la expresión espacio temporal de estos inhibidores sugiere un papel diverso de estas proteínas en el desarrollo folicular, ovulación y desarrollo, mantenimiento y regresión del cuerpo lúteo, lo que explica la presencia de *TIMP1* en algunos tejidos reproductivos. Además se ha demostrado que esta proteína también es



Gráfica 6. Abundancia relativa mRNA de *timp1* en diferentes tejidos somáticos

\*Indica expresión nula y literales diferentes indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).





Gráfica 7. Abundancia relativa mRNA de *timp1* en células foliculares ( $P > 0.05$ ).

\* Indica expresión nula

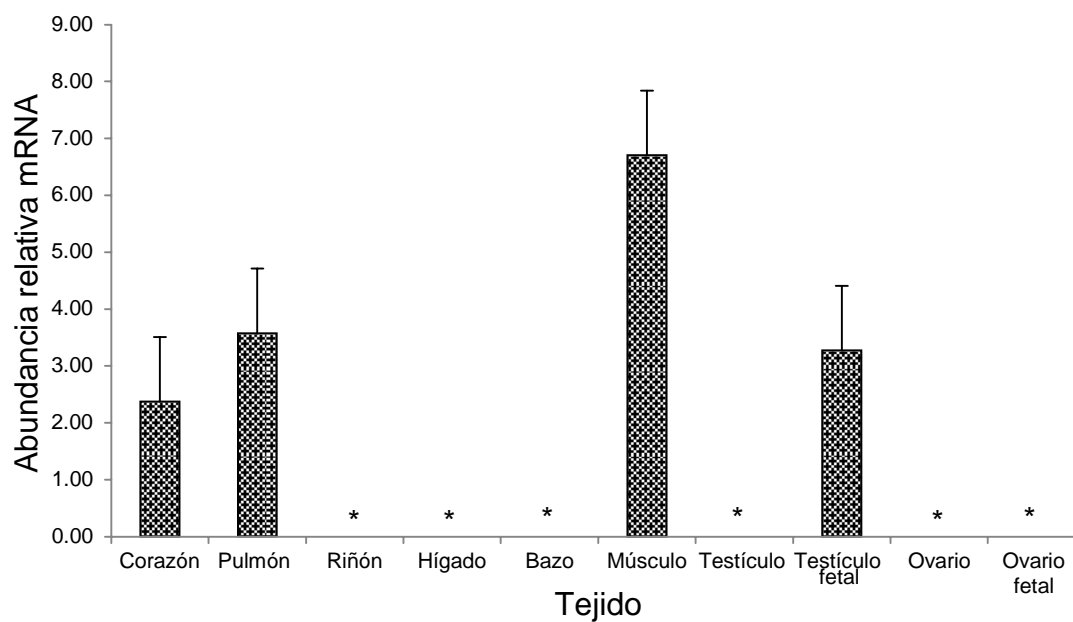


capaz de incrementar la esteroidogénesis de células de la teca (Shores y Hunter, 2000); las cuales se encuentran embebidas en considerable ECM, la cual requiere proteólisis extensiva para degradarse. Otra posible explicación por la cual *TIMP1* se expresa en ovario, ovocito inmaduro y CGs, es porque se ha visto que aumenta la tasa de obtención de blastocitos, lo que fue demostrado por Funahashi *et al.* (2000) quienes al adicionar *TIMP1* en medios de cultivo para producción de embriones porcinos *in vitro* observaron *que se aumentó* la tasa de blastocistos obtenidos, ya que en los tratamiento donde se adicionó una concentración de 1.25 µg/ml de *TIMP1* se obtuvo un  $34 \pm 3$  %, donde se colocaron 2.50 µg/ml de esta proteína se obtuvo un  $32 \pm 1$  % y un  $28 \pm 1$  % fue obtenido donde se colocaron 5.00 µg/ml de *TIMP1*; en el grupo control se obtuvo un  $22 \pm 3$  % de obtención de blastocistos. Además de esto, la expresión de este gen no es exclusiva de tejidos reproductivos; al participar en remodelación tisular se ha visto que se encuentra presente en diversos fluidos corporales que bañan tejidos, donde puede actuar como primera línea de defensa para regular la acción de MMPs y subsecuentemente quebrar y remodelar el tejido (Nothnick *et al.*, 1997). *TIMP1* tiene actividad parecida al de un factor de crecimiento en algunos tipos celulares como en los precursores de células eritroides (Hayakawa *et al.*, 1992) lo que explica su presencia en diversos tejidos somáticos.

***TNFAIP6***. La proteína 6 inducible para el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  es capaz de unir ácido hialurónico, al transferir covalentemente las cadenas pesadas del inhibidor de la inter-tripsina  $\alpha$ , I $\alpha$ I, al hialurano (Wisniewski *et al.*,

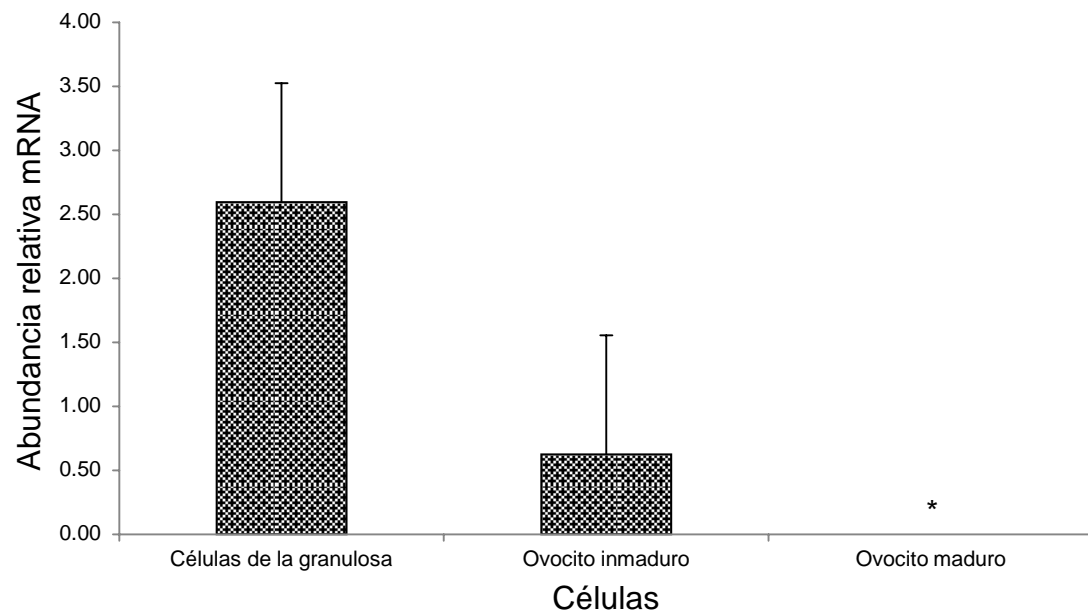


1994). Esta habilidad que posee de unir a hialurano e interactuar con *lcl* permite que establezca la ECM, lo que la convierte en un candidato potencial para involucrarse en la organización de la ECM durante la expansión cumular del COC (Fülop *et al.*, 1997). En este estudio, la expresión del gen *tnfaip6* fue encontrado en los tejidos somáticos corazón, pulmón, músculo y testículo fetal. Lo que llama mucho la atención es que la expresión haya sido nula para el tejido de ovario y ovario fetal (Gráfica 8), dado que en las células foliculares (Gráfica 9) esta expresión es muy alta en CCs, aunque sin diferencia estadística al ser comparada con la expresión en ovocitos inmaduros ( $P > 0.05$ ). Esto se puede deber a que *TNFAIP6* es específicamente transcrita en reacciones de inflamación (Yoshioka *et al.*, 2000), la cual es inducida en varios tipos celulares por citocinas inflamatorias (Wisniewski *et al.*, 1994). A pesar de que *TNFAIP6* no es exclusivo de ovocito, ovario o CGs, se ha demostrado que se expresa en folículos ováricos que han sido inducidos a ovulación. Esto es debido a que el proceso de ovulación tiene similitudes con los procesos inflamatorios (Yoshioka *et al.*, 2000). Además, la matriz cumular del COC depende de ciertas proteínas que estabilizan esa matriz, por lo que son importantes en el proceso de ovulación y una de ellas es *TNFAIP6* (Alvino, 2010). Dado que la expansión cumular del COC es un proceso obligatorio para la fertilidad de la hembra (Salustri *et al.*, 1990), las proteínas involucradas en este proceso también son fundamentales. Fülop *et al.* (2003) demostraron que *TNFAIP6* participa en el proceso de expansión cumular, ya que al generar hembras de ratón deficientes en este gen, la expansión del COC falla. Ésto debido a la imposibilidad de que las CCs ensamblen la matriz ECM con el ácido hialurónico. Además también



Gráfica 8. Abundancia relativa de mRNA de *tnfaip6* en tejidos somáticos ( $P > 0.05$ ).

\* Indica expresión nula



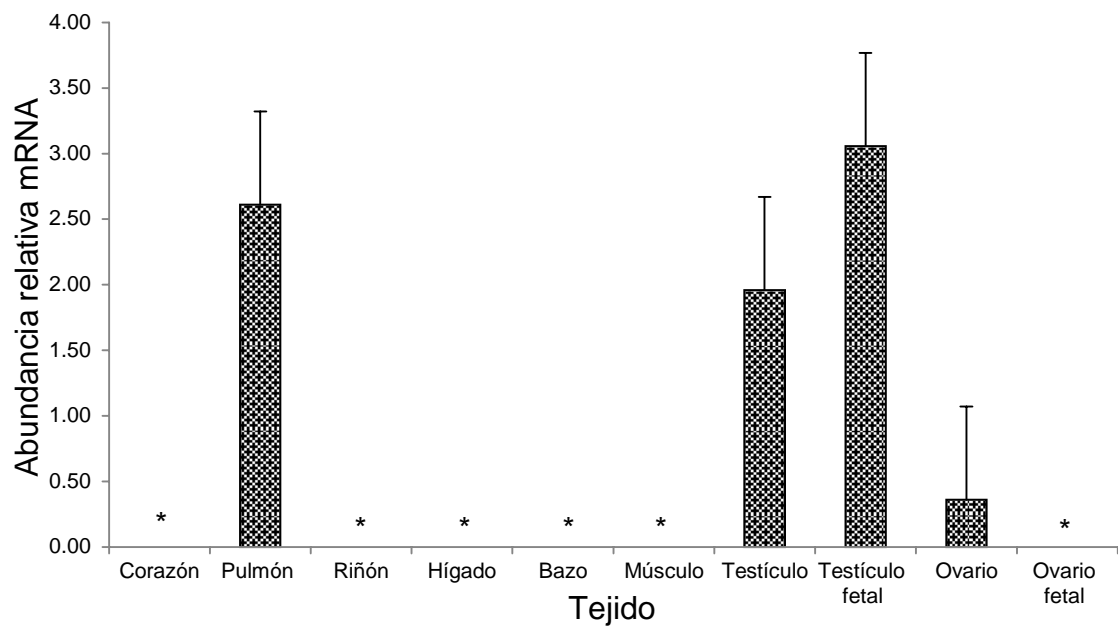
Gráfica 9. Abundancia relativa mRNA de *tnfaip6* en células foliculares ( $P > 0.05$ ).

\* Indica expresión nula.



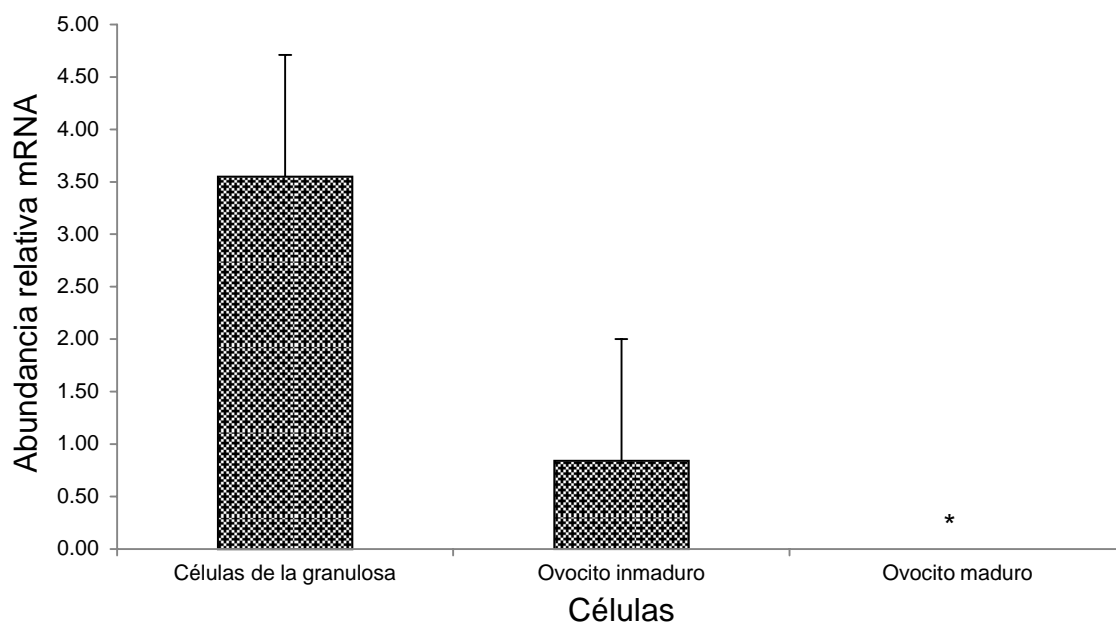
demonstraron que las hembras recuperan su fertilidad al tratarlas con *TNFAIP6* recombinante.

**PTX3.** Pentraxina 3 es importante en la estabilización de la matriz cumular, se une a las cadenas pesadas de *Igf1* y *TNFAIP6*, la cual es esencial para la formación de la matriz cumular y permite la interacción con hialurano (Rusell y Robker, 2007; Scarchilli *et al.*, 2007; Levoli *et al.*, 2011). La expresión del gen *ptx3* se observó sin diferencia ( $P > 0.05$ ) en pulmón, testículo, testículo fetal y ovario (Gráfica 10). Llama la atención que la expresión tienda a estar más aumentada en testículo fetal y sea nula en ovario fetal. Ésto indica que tal vez esta proteína se encuentra involucrada en los procesos de determinación de la línea germinal masculina. En las células foliculares, la expresión de *ptx3* fue nula en ovocitos maduros y se observó de manera similar ( $P > 0.05$ ) en CGs y ovocito inmaduro (Gráfica 11), aunque tiende a expresarse más en CGs. Lo anterior coincide con los resultados reportados por Salustri *et al.* (2004), donde se encontró que *PTX3* es secretada por las CCs durante la expansión cumular y actúa para estabilizar la proteína *TNFAIP6* con la finalidad de mantener expandida la matriz del COC. Aunado a ésto, se observó que la infertilidad de hembras de ratón deficientes para esta proteína se encuentra asociada con anomalías del COC y falla *in vivo*, pero no *in vitro*, de fertilización del ovocito. En estas hembras el hialurano sintetizado es normal, pero es incapaz de organizarse en una matriz estable, ya que *PTX3* participa en el ensamble de ácido hialurónico en el COC (Levoli *et al.*, 2011). Otro estudio que coincide con que *PTX3* tiene un papel importante en la interacción del COC en el periodo periovulatorio, fue el realizado por Varani *et al.* (2002), donde se observó que la



Gráfica 10. Abundancia relativa mRNA de *ptx3* en tejidos somáticos ( $P > 0.05$ ).

\* Indica expresión nula.



Gráfica 11. Abundancia relativa mRNA de *ptx3* en células foliculares ( $P > 0.05$ ).

\* Indica expresión nula.

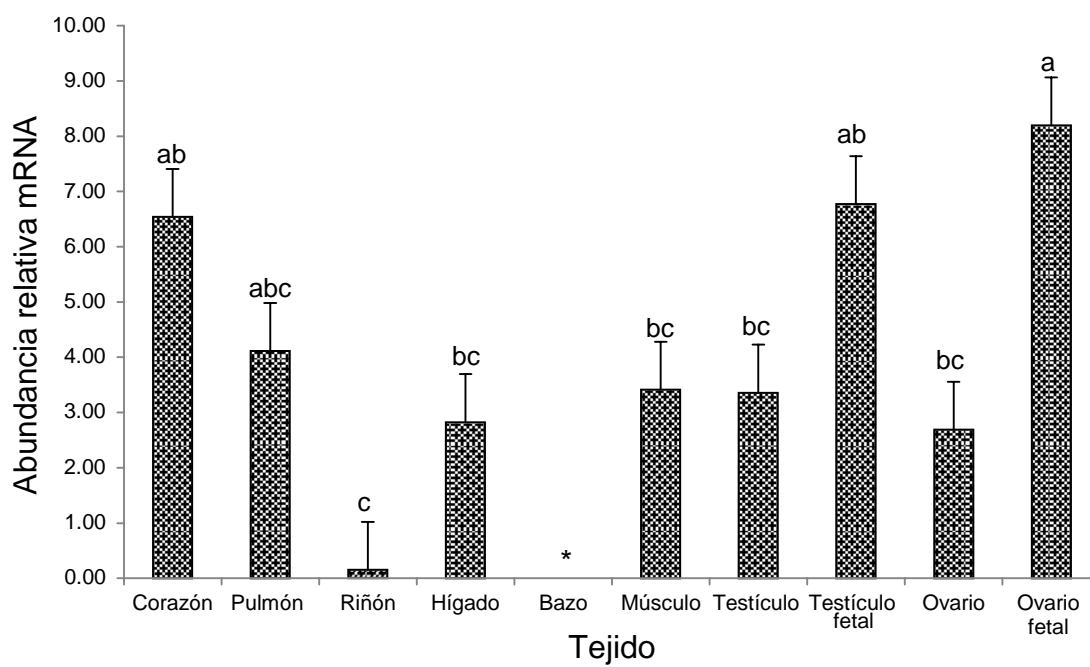




expresión de *PTX3* en el ovario es específicamente observada después de la onda de LH en las CGs adyacentes al ovocito. Ellos trabajaron con hembras de ratones deficientes para *PTX3* y encontraron que éstas eran subfértiles debido a defectos en la integridad del COC.

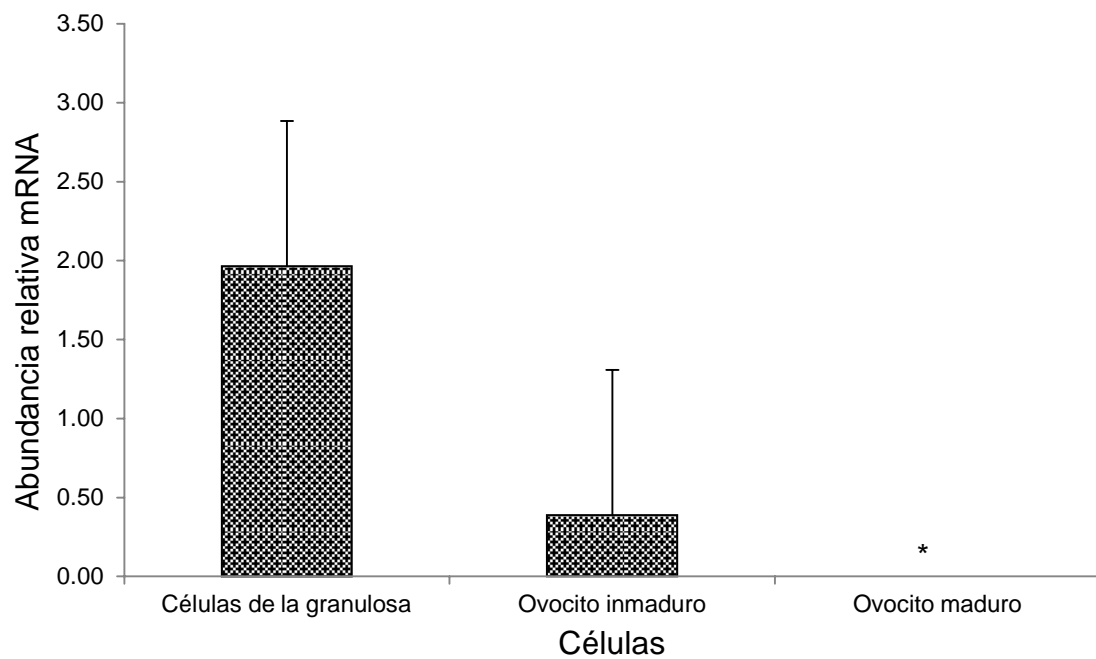
***POSTN***. Periostina es una proteína de ECM (Heo *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011) que fue originalmente identificada como factor 2 específico de osteoblasto (*OSF2*) y es altamente expresado en periosteo embrionario, válvulas cardiacas y ligamento periodontal, así como heridas y en varios tipos de tejido en cáncer; además está involucrada en angiogénesis (Rios *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2014; Liu y Du, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Se ha reportado su expresión en aorta, estómago, tracto gastrointestinal, placenta y útero; y tiene tendencia a una mayor expresión en tejidos fetales (Gillan *et al.*, 2002). Estas pueden ser las posibles explicaciones del porqué no se encuentra diferencia ( $P > 0.05$ ) en la expresión de esta proteína en la mayoría de los tejidos somáticos evaluados (Gráfica 12). La expresión de esta proteína no se observó en ovocitos maduros pero si en CGs y ovocito inmaduro (Gráfica 13). Un posible papel de *POSTN* en tejidos reproductivos de la hembra es que es una proteína que puede influir en la implantación, ya que es una proteína de adhesión celular (Morelli *et al.*, 2014; Di Cello *et al.*, 2015). Hasta la fecha se desconoce cuál es la función de esta proteína en folículos ováricos y no se explica el porqué es secretada por el ovocito.

***P4HA3***. La proteína 4-prolil hidroxilasa con subunidad  $\alpha$  tipo 3 es una enzima involucrada en la hidroxilación del procolágeno. Tiene un papel central en la síntesis de todos los tipos de colágeno, el mayor componente de la ECM



Gráfica 12. Abundancia relativa mRNA de *postn* en tejidos somáticos.

\*Indica expresión nula y literales diferentes indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ ).



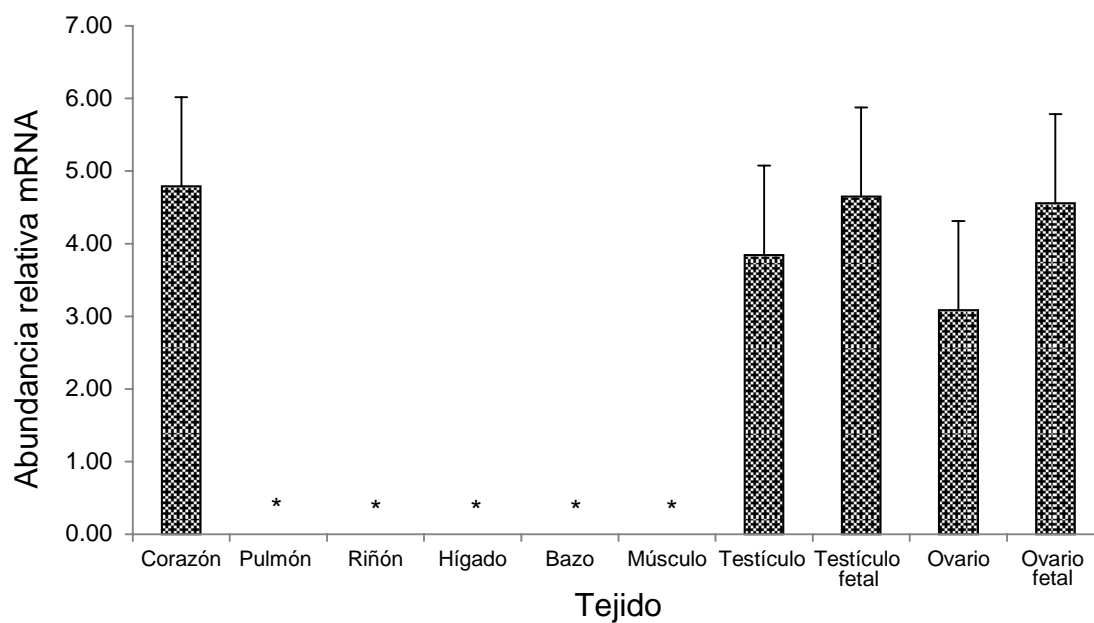
Gráfica 13. Abundancia relativa mRNA de *postn* en células foliculares ( $P > 0.05$ ).

\*Indican expresión nula.



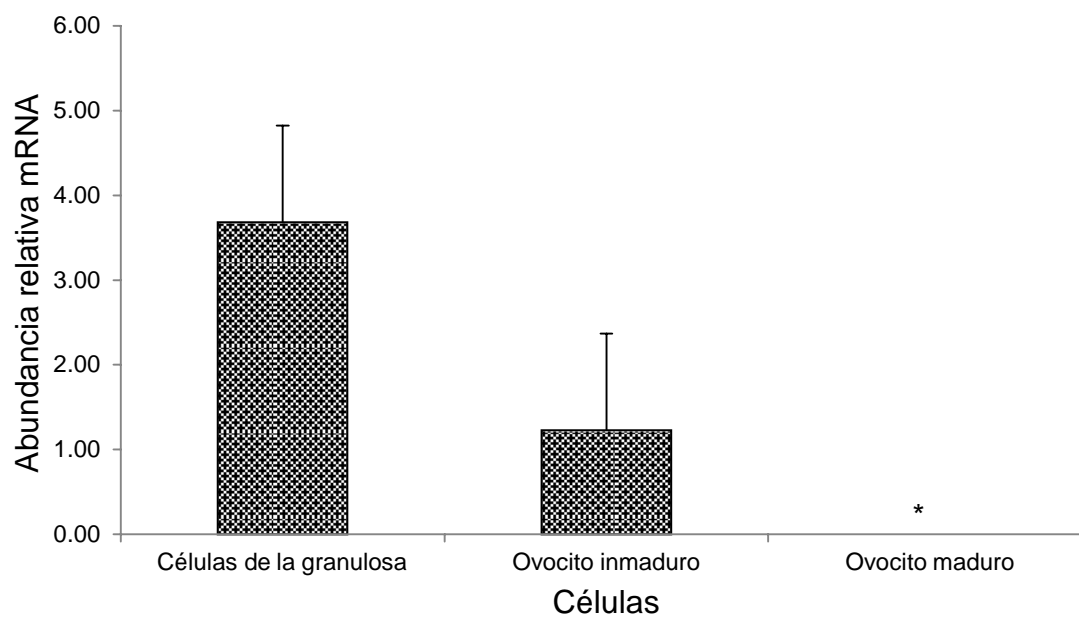
(Kivikko y Myllyhatju, 1998; Saika *et al.*, 1998; Iwahashi *et al.*, 2000). En este trabajo, la expresión del gen *p4ha3* se encontró delimitada a los siguientes tejidos: corazón, testículo, testículo fetal, ovario y ovario fetal (Gráfica 14). Cabe mencionar que aunque no hubo diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ), la expresión fue más elevada en testículo fetal y ovario fetal. Tal parece que esta proteína está muy relacionada con los procesos iniciales de la gametogénesis. Al evaluar la expresión de este gen de forma particular en células foliculares (Gráfica 15), se observó una expresión similar en células de la granulosa y en ovocito inmaduro ( $P > 0.05$ ). Esto puede ser debido a que el incremento en el tamaño folicular se acompaña por una capa de células de la teca grande y gruesa con incremento en la síntesis de colágeno (Hatzirodos *et al.*, 2014).

**TNC.** Los cambios extensivos e intrincados en el arreglo físico de las células dentro de un folículo en desarrollo sugieren que la ECM es un factor importante y dinámico en la foliculogénesis, por lo que las proteínas que se ven involucradas en la ECM también son esenciales para el desarrollo de los folículos ováricos, tal es el caso de la tenascina C conocida como *TNC* (Woodruff y Shea, 2007). Las tenascinas son una familia de cuatro proteínas de ECM: tenascina C, X, R y W. *TNC* es regulada por el microambiente del tejido donde se encuentra. Se ha localizado en tejido conectivo en adultos y en sitios de reparación y regeneración tisular; posee efectos sobre proliferación, diferenciación, motilidad, migración e inhibición de adhesión celular. Este último proceso induce la secreción de MMPs de las células que se encuentran en contacto con *TNC* (Bartsch, 1996; Yasuda *et al.*, 2005; Tucker y Chiquet-Ehrismann, 2009; Chiquet-Tucker, 2010).



Gráfica 14. Abundancia relativa de mRNA de *p4ha3* en tejidos somáticos ( $P > 0.05$ ).

\*Indican expresión nula.



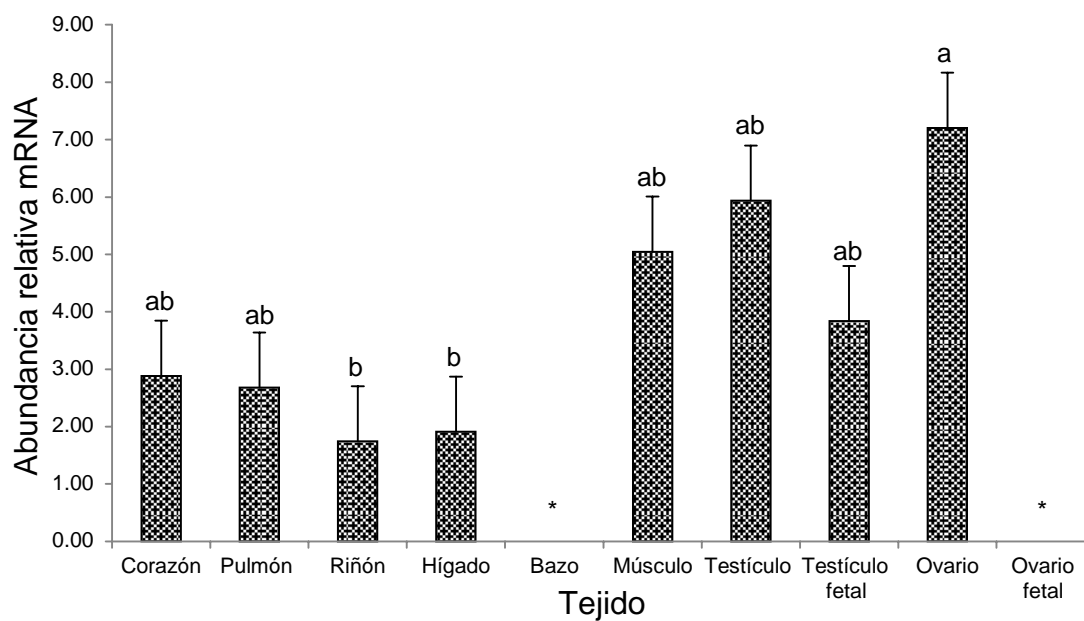
Gráfica 15. Abundancia relativa mRNA de *p4ha3* en células foliculares ( $P > 0.05$ ).

\*Indican expresión nula.



La expresión de *TNC* es inducida en heridas, lesiones inflamatorias y en tumores (Chiquet-Tucker, 2010). Se ha localizado en riñón, hígado, bazo y músculo liso (Retting *et al.*, 1994), lo que coincide con nuestros resultados mostrados en la Gráfica 16. La ausencia de diferencia estadística entre tejidos somáticos y reproductivos puede deberse a la participación de *TNC* en lesiones inflamatorias. Pero a pesar de no ser una proteína exclusiva de tejidos reproductivos de hembras, se ha demostrado la importancia de *TNC* en la regulación de funciones ováricas, ya que Yasuda *et al.* (2005) observaron que *TNC* se encuentra presente en la capa de células de la teca externa de folículos en crecimiento en la membrana basal y en la capa de células de la teca externa de folículos atrésicos de ratón. Además, también se ha demostrado la producción de *TNC* en humanos en las CCs (Familiari *et al.*, 1996), lo que concuerda con el resultado obtenido en nuestro análisis de expresión del gen *tnc* en células folículares (Gráfica 17) y evidencia la importante función que tiene esta proteína en folículos ováricos.

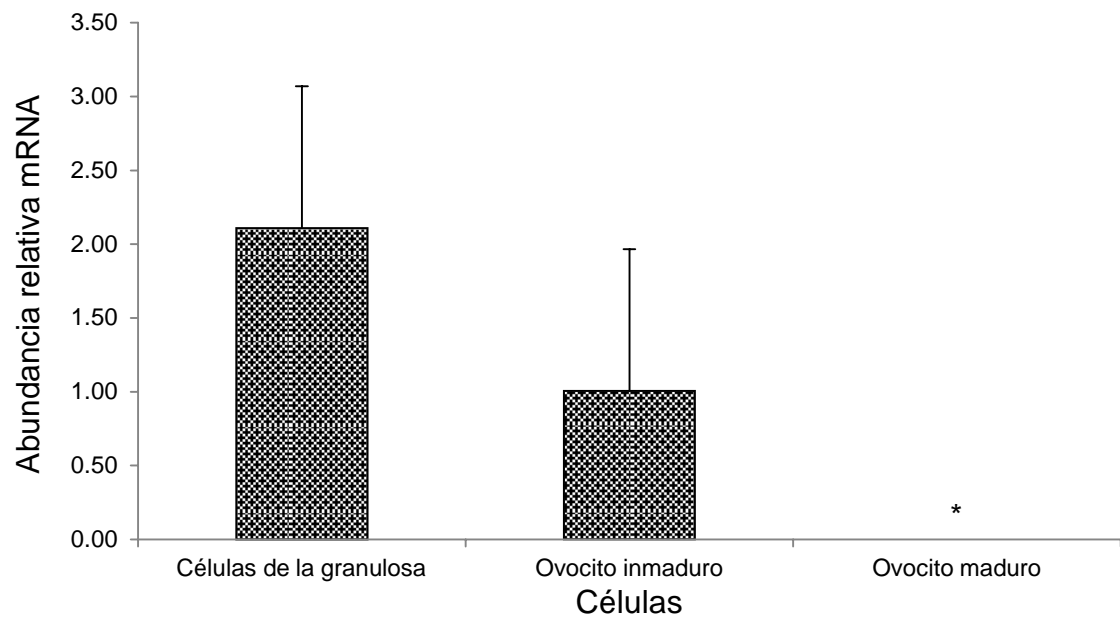
**CTSK.** Las catepsinas son proteinasas lisosomales compuestas de cisteína que pertenecen a la familia de la papaína. Catepsina K participa en una gran variedad de procesos proteolíticos, incluyendo la degradación de la ECM (Ishidoh y Kominami, 1998; Robker *et al.*, 2000; Oksjoki *et al.*, 2001). Por eso la expresión de este gen no tuvo diferencia estadística ( $P > 0.05$ ) en la mayoría de los tejidos evaluados (Gráfica 18). Sin embargo, cabe destacar que en ovario fetal *ctsk* muestra una tendencia de mayor expresión, esto debido a que *ctsk* se expresa en abundancia en las CCs rodean al ovocito de animales prepúberes; de hecho se ha observado que la expresión de *ctsk* compromete el desarrollo



Gráfica 16. Abundancia relativa de mRNA de *tnc* en tejidos somático.

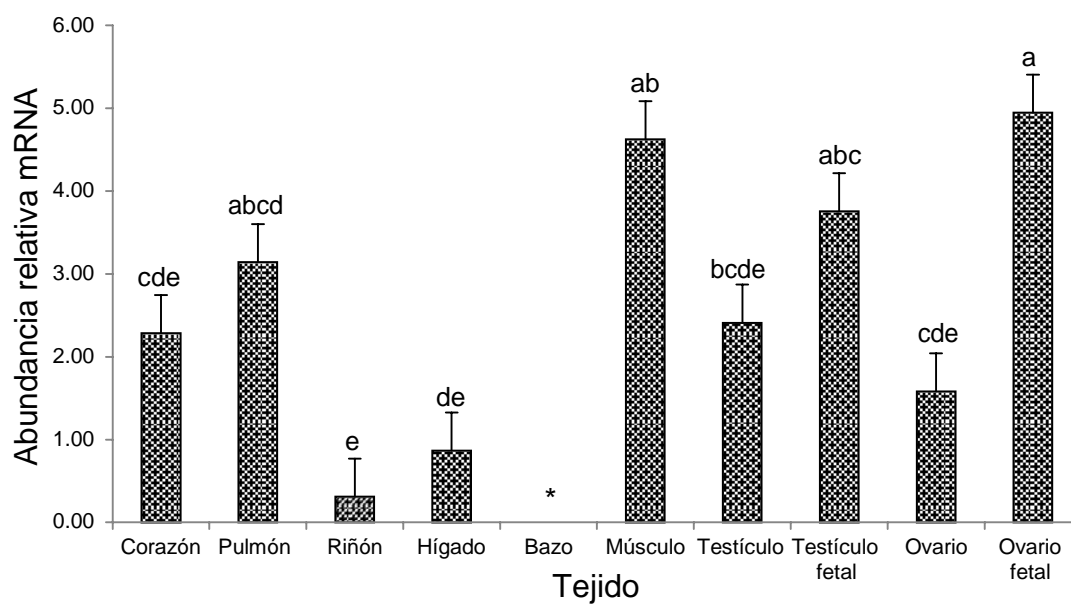
\*Indican expresión nula y literales diferentes indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ ).





Gráfica 17. Abundancia relativa de mRNA de *tnc* en células foliculares ( $P > 0.05$ ).

\*Indican expresión nula.



Gráfica 18. Abundancia relativa de mRNA de *ctsk* en tejidos somático.

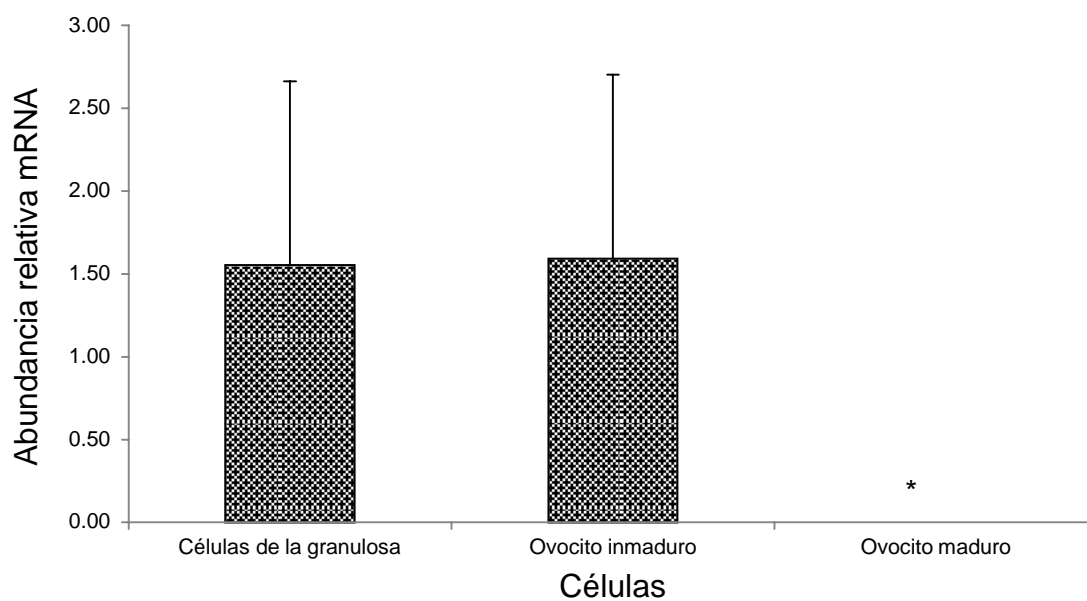
\*Indican expresión nula y literales diferentes indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ ).



competente del ovocito.

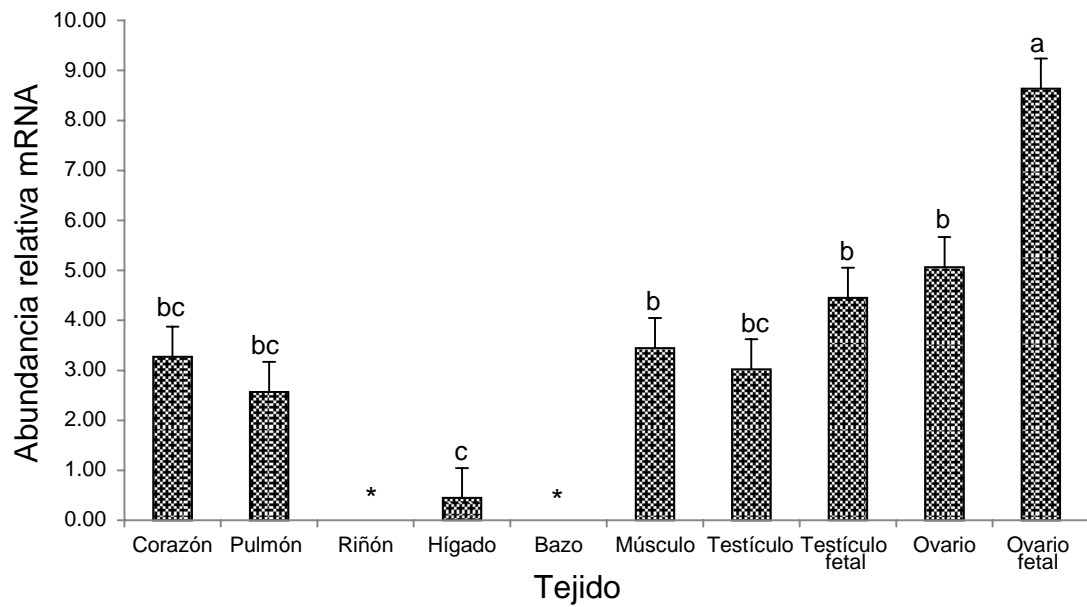
Al inhibir su acción hay un mayor desarrollo competente y menor porcentaje de células apoptóticas (Bettegowda *et al.*, 2008). En 2001, Oksjoki *et al.* detectaron *CTSK* en la teca externa, en epitelio germinal y en el ovocito del folículo primordial y primario, así como en CGs, de la teca y ovocito del folículo secundario y de Graaf, y en el cuerpo lúteo, algo similar a la expresión que se observó en este estudio sobre las células foliculares (Gráfico 19), lo que indica una función de esta proteína sobre folículos ováricos.

**SERPINE2.** Durante el crecimiento folicular antral existe una remodelación de ECM, donde el inhibidor E2 de serin proteasa (*SERPINE2*) inhibe a las serin proteasas que degradan la ECM (Cao *et al.*, 2004). En la presente investigación se observó que en ovario fetal la expresión fue claramente mayor ( $P < 0.05$ ) comparada contra la expresión de los demás tejidos evaluados, los cuales mostraron una expresión del gen *serpine2* ubicua (Gráfica 20). En el caso del análisis de expresión en las células foliculares, *serpine2* mostró expresarse de una forma muy similar en CGs y en ovocito inmaduro ( $P > 0.05$ ), mientras que en ovocito maduro dicha expresión fue nula (Gráfica 21). *SERPINE2* se ha localizado en CGs y en ovocitos de folículos primordiales, primarios y secundarios preantrales. En bovinos su expresión cambia con el desarrollo de los folículos dominantes en crecimiento. En el mismo estudio donde reportan lo anterior se encontraron altos niveles de *SERPINE2* en ovario fetal, bajos niveles en testículo fetal y niveles apenas detectables en músculo y testículo adulto (Bédard *et al.*, 2003) lo que coincide con los resultados aquí mostrados.

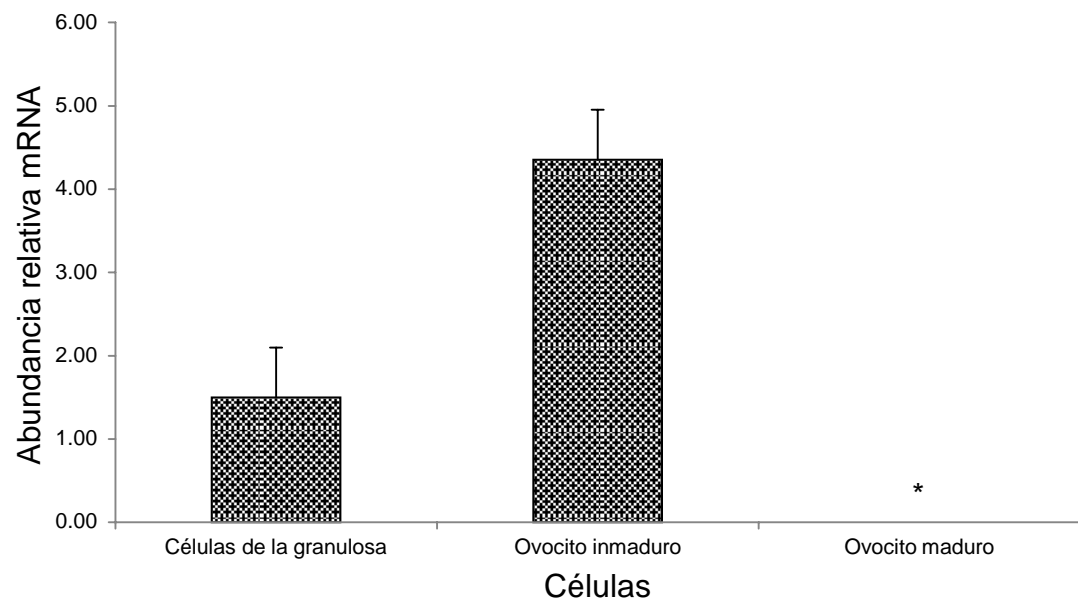


Gráfica 19. Abundancia relativa de mRNA de *ctsk* en células foliculares ( $P > 0.05$ ).

\*Indican expresión nula.



Gráfica 20. Abundancia relativa de mRNA de *serpine2* en tejidos somático. \*Indican expresión nula y literales diferentes indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ ).

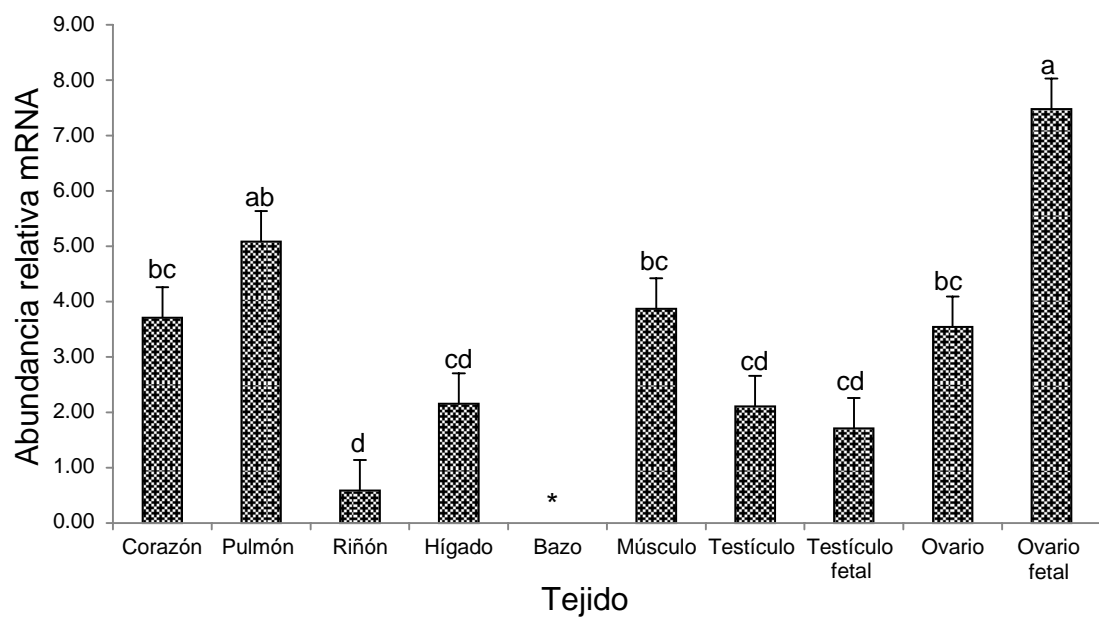


Gráfica 21. Abundancia relativa de mRNA de *serpine2* en células foliculares ( $P > 0.05$ ).

\*Indican expresión nula.

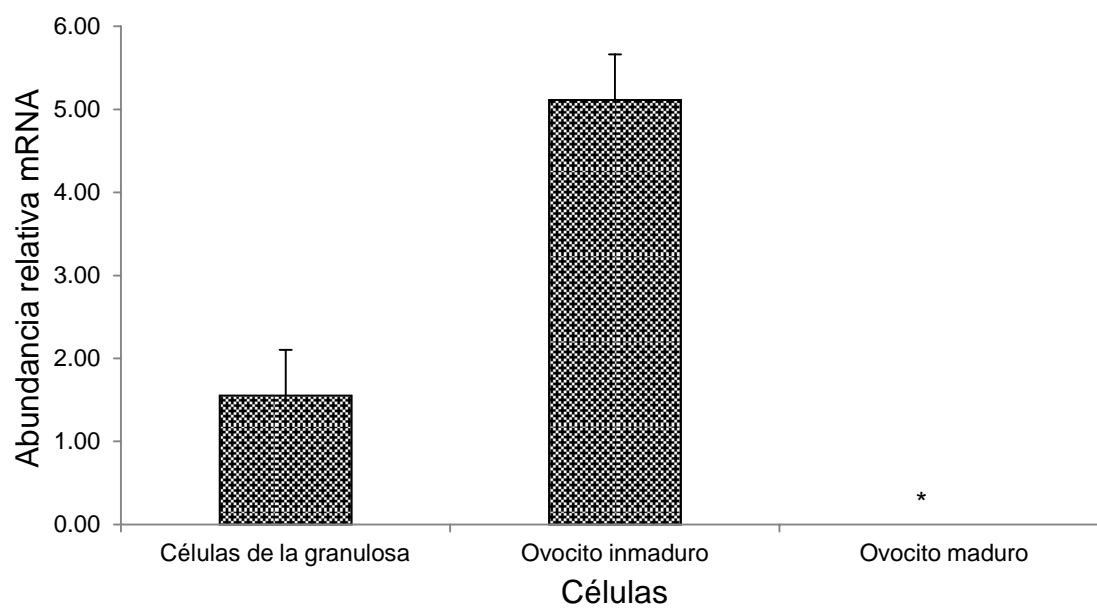


**SRGN.** Los proteoglicanos son los mayores constituyentes de la ECM, tal como de superficies celulares y membranas basales. La serglicina (*SRGN*) ha sido caracterizada como un proteoglicano intracelular involucrado en la formación de gránulos secretores y vesículas, tal como en el almacenamiento y secreción de varios componentes de la ECM, además interviene en la síntesis y secreción de proteasas (Mihm *et al.*, 2008; Theocharis *et al.*, 2014). La *SRGN* es sintetizada por células inflamatorias y estromales (Åbrink *et al.*, 2004; Korpetinou *et al.*, 2014) y se ha detectado su expresión en varios tejidos somáticos como páncreas, músculo liso, células endoteliales, fibroblastos e hígado fetal (Kulseth *et al.*, 1999; Ho *et al.*, 2001; Bierderbick *et al.*, 2003). Kolset y Tveit (2008) sugieren que *SRGN* puede estar involucrada con el transporte a los sitios blanco, donde las proteasas son liberadas para realizar sus funciones. En este estudio se observó que la expresión de *srgn* se da de mayor forma en los tejidos de pulmón y ovario fetal ( $P < 0.05$ ), no así en los demás tejidos somáticos evaluados, donde la expresión tiende a ser ubicua (Gráfica 22). En las células foliculares la expresión no tiene diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) pero tiende a ser más elevada en células de ovocito inmaduro que en CGs (Gráfica 23). Es importante resaltar que Gilbert *et al.* (2012) encontraron que la expresión de *SRGN* estaba asociada a CGs de folículos dominantes, ya que en éstos su expresión se veía aumentada. Aumentó 1.8 veces de folículos pequeños a dominantes y se redujo 4.9 veces de dominante a folículo ovulatorio, lo que indica que *SRGN* cumple una función en el desarrollo del folículo dominante.



Gráfica 22. Abundancia relativa de mRNA de *srgn* en tejidos somáticos. \*Indican expresión nula y literales diferentes indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ ).





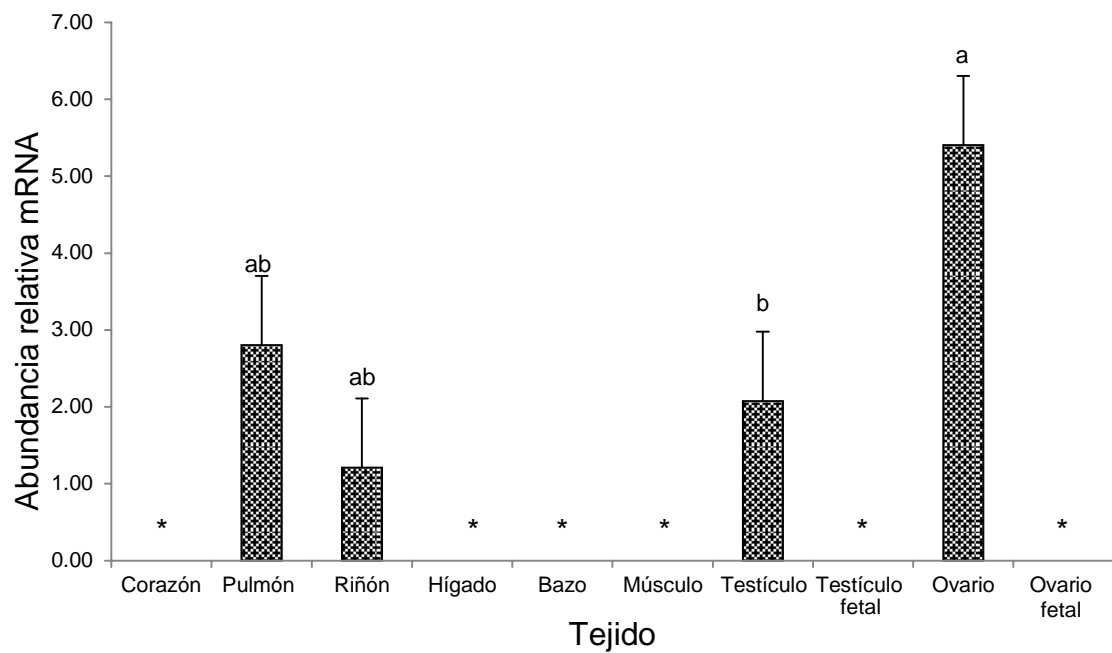
Gráfica 23. Abundancia relativa de mRNA de *srgn* en células foliculares ( $P > 0.05$ ).

\*Indican expresión nula.



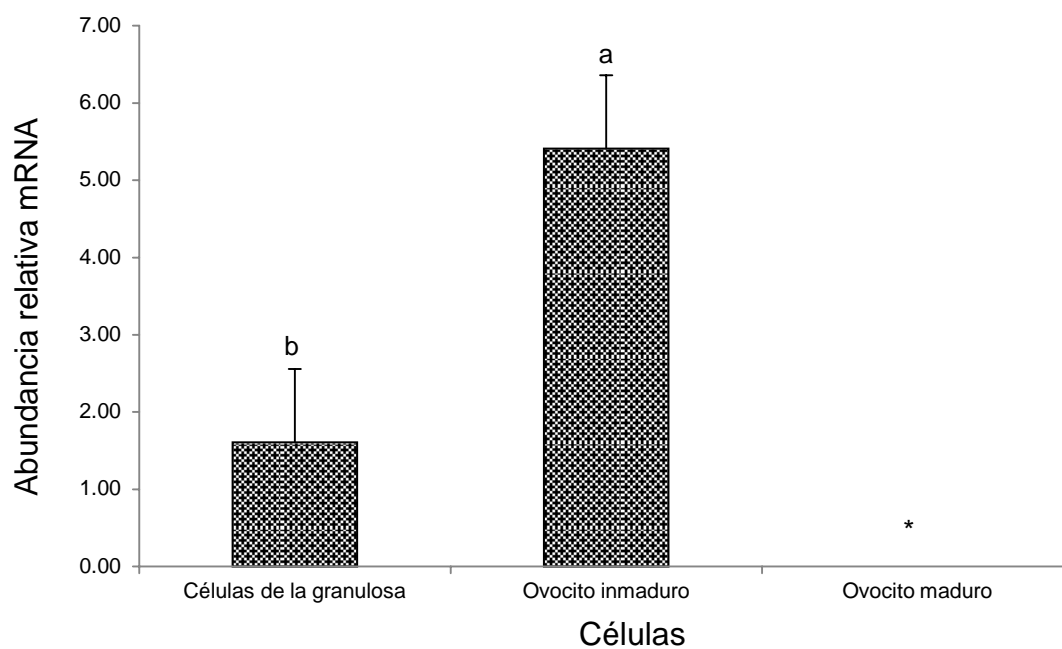
## Expresión de OSFs de Señalización

***CARTPT***. El gen del precursor de la proteína de transcripción regulada por cocaína y anfetamina (*CARTPT*) se localiza en el cromosoma 20. Es un gen compacto de 1768 pares de bases (pb) que comprende 3 exones separados por dos intrones de 425 y 866 pb, respectivamente (Valle *et al.*, 2005) y codifica para una proteína de 116 aminoácidos. La expresión de *CARTPT* fue primero descubierta en el cerebro, donde es mejor conocida por sus efectos anorexigénicos al relacionarse con leptina y neuropéptido Y (Kristensen *et al.*, 1998), neuroendocrinos (Vrang *et al.*, 2000), de desarrollo, en procesos sensoriales, estrés, control endocrino y otros procesos fisiológicos (Jaworski *et al.*, 2003; Khwar *et al.*, 2000). Fueron Kobayashi *et al.* (2004) quienes identificaron la presencia de *CARTPT* en bovinos en ovarios adultos y fetales, así como en mayor cantidad en CGs y en fluido folicular. Ellos concluyeron que la expresión de *CARTPT* en CGs es temporalmente regulada y potencialmente asociada con la salud folicular, ya que *CARTPT* puede inhibir la producción de estradiol en CGs. En el presente estudio se encontró que el gen *cartpt* se expresa de mayor forma en ovario (Gráfica 24), aunque no hay diferencia con respecto a la expresión observada en pulmón y riñón ( $P > 0.05$ ); donde si se observa significativamente mayor es en las células de ovocito inmaduro ( $P < 0.05$ ) comparado con las CGs (Gráfica 25). Su mayor expresión en los tejidos de la hembra puede deberse a que *CARTPT* está involucrado en la producción de estradiol estimulada por la FSH en células de la granulosa *in vitro* y la señalización de *CARTPT* en el folículo desencadena la supresión de la producción de estradiol, observándose mayor expresión de *CARTPT* en



Gráfica 24. Abundancia relativa de mRNA en tejidos somáticos.

\*Indican expresión nula y literales diferentes indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ ).



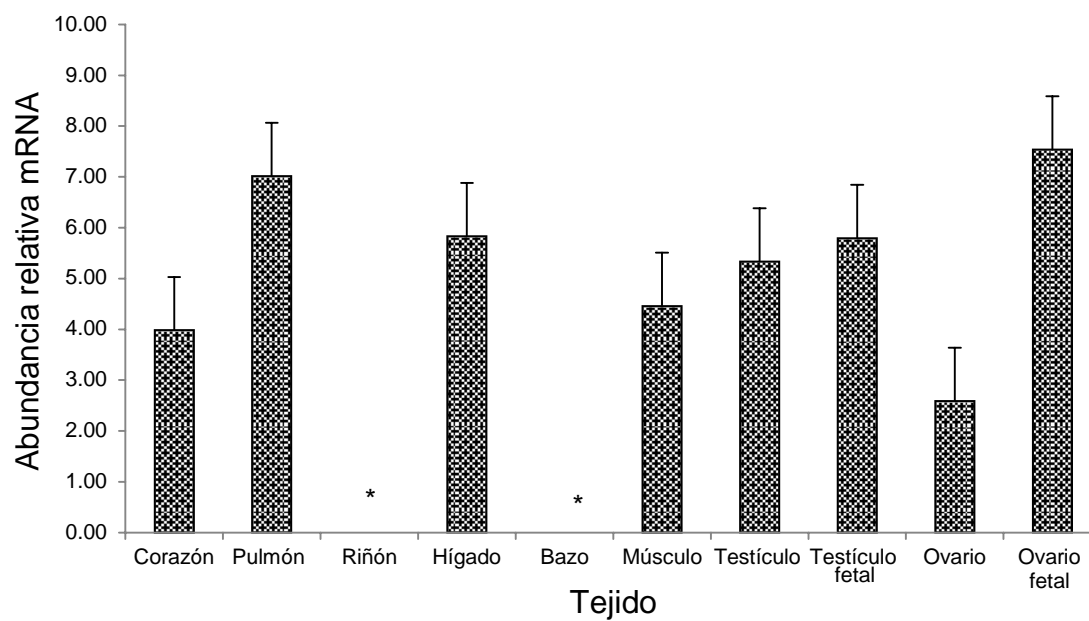
Gráfica 25. Abundancia relativa de mRNA de *cartpt* en células folículares. \*Indican expresión nula y literales diferentes indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ ).



foliculos subordinados que en foliculos dominantes, lo que indica que es un regulador local de atresia folicular en el ovario bovino (Lv *et al.*, 2009; Folger *et al.*, 2013).

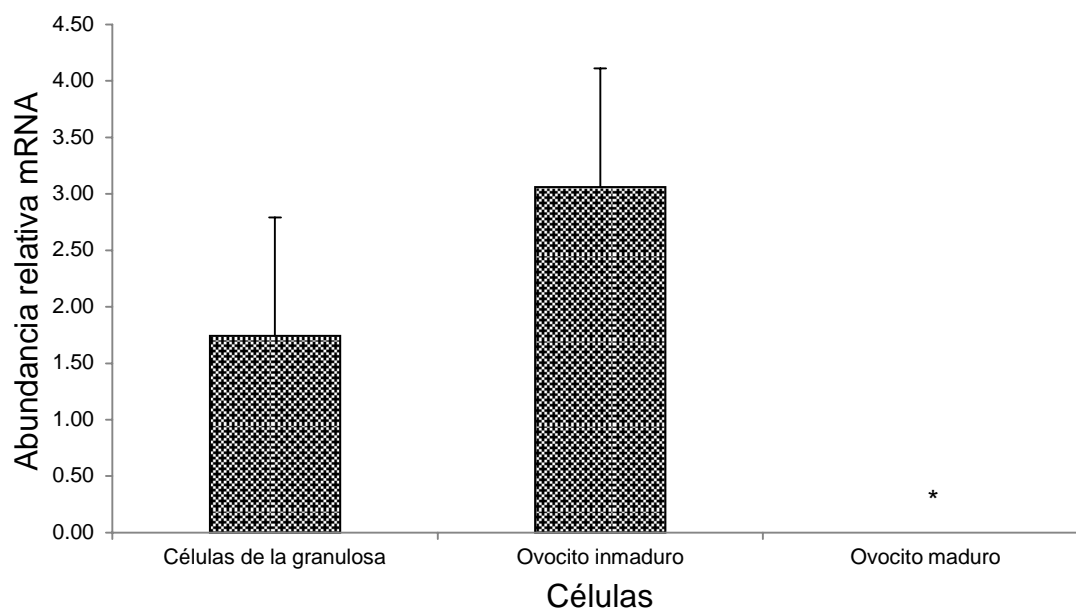
***SDF2L1***. El gen para el factor 2 derivado de células estromales parecido al 1 (*sdf2l1*) se localiza en el cromosoma 17, el cual al expresarse genera una proteína localizada en retículo endoplásmico que es inducida por el estrés; aunque también se ha reportado como una proteína de secreción producida por células estromales, pero su función no está definida (Meredith *et al.*, 2013; Tiwari *et al.*, 2013). Esta proteína es miembro de la familia de proteínas O-manosiltransferasa (Lorenzon-Ojea *et al.*, 2014). A excepción de riñón donde la expresión fue nula, la expresión de este gen se encontró de forma ubicua en todos los tejidos analizados (Gráfica 26), lo mismo ocurrió en las CGs y el ovocito inmaduro (Gráfica 27) donde la expresión fue semejante ( $P > 0.05$ ), en ovocito maduro no hubo expresión. Esto coincide con la investigación realizada por Fukuda *et al.* (2001) donde *SDF2L1* se localizó en cerebro, timo, corazón, hígado, bazo, riñón, glándula adrenal, músculo esquelético, testículo, ovario, útero y médula ósea. Algo parecido reportó Lorenzo-Ojea *et al.* (2014) quienes identificaron la presencia de esta proteína en pulmón y placenta. La razón por la cual *SDF2L1* se encontró en todos estos tejidos puede ser que es un componente del complejo de chaperonas del retículo endoplásmico y tiene como función las modificaciones de las proteínas (Bauersachs *et al.*, 2004; Tongaonkar y Selsted, 2009).

***PTGS2***. La sintasa 2 de prostaglandina G/H es también conocida como ciclooxigenasa 2 (*COX2*) es la enzima limitante en la biosíntesis de



Gráfica 26. Abundancia relativa mRNA de *sdf2/1* en tejidos somático ( $P > 0.05$ ).

\*Indican expresión nula.



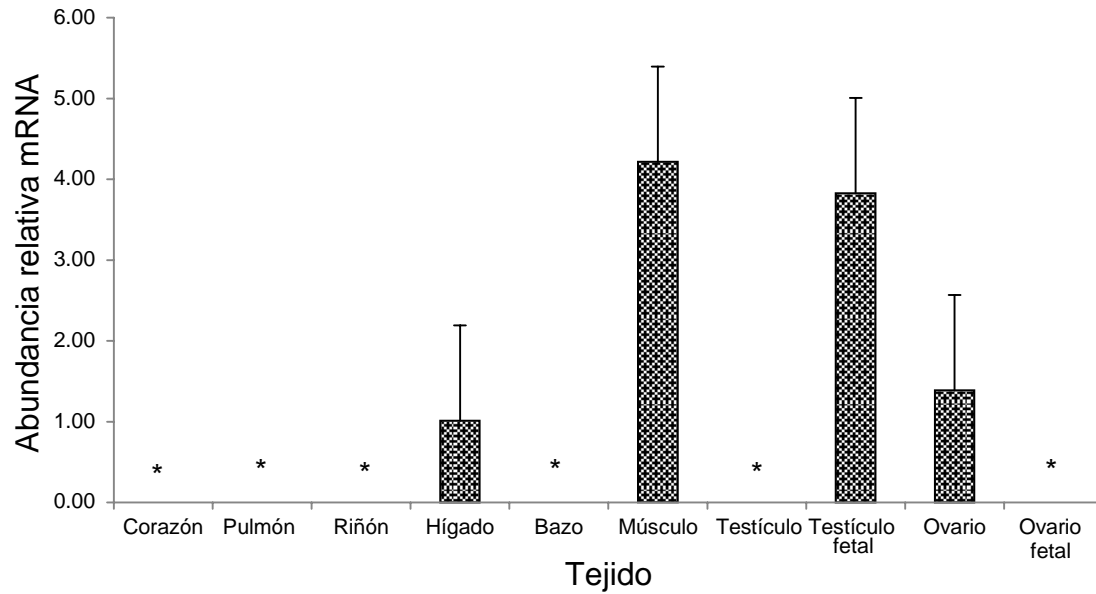
Gráfica 27. Abundancia relativa mRNA de *sdf2/1* en células foliculares ( $P > 0.05$ ).

\*Indican expresión nula.



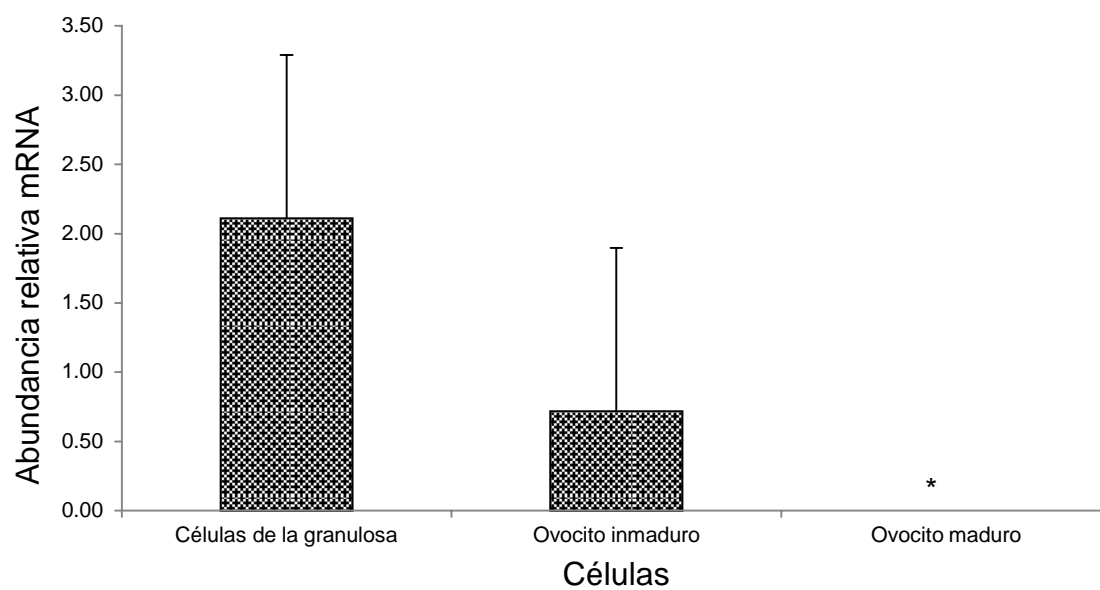
prostaglandina, porque es la molécula encargada de convertir el ácido araquidónico en prostaglandina G, razón por la cual participa en cualquier proceso inflamatorio (Smith 1992). En este estudio, el gen que codifica para esta enzima estuvo presente sin diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) en hígado, músculo, testículo fetal y ovario (Gráfica 28). El análisis de expresión en células foliculares indicó que tampoco hubo un cambio en la expresión ( $P > 0.05$ ) de este gen en CGs y en ovocito inmaduro (Gráfica 29), aunque es claro que la expresión tiende a ser mayor en CGs; esto se puede explicar ya que se ha visto que en bovinos *PTGS2* es producida por CCs así como por células de la granulosa murales en folículos preovulatorios y es requerida para la expansión cumular y ovulación (Lim *et al.*, 1997; Liu y Sirois, 1998; Nuttinck *et al.*, 2002; Diaz *et al.*, 2006; Sugiura *et al.*, 2010;). Aunado a esto se ha encontrado que durante la maduración del ovocito la expresión de *PTGS2* cambia, debido que durante la maduración las CCs se encuentran en un proceso llamado mucificación o expansión, el cual es inducido por estimulación de gonadotropinas *in vivo* o *in vitro* y lleva a producción masiva de ECM mucoide, principalmente de hialurano (Marei *et al.*, 2014). Otro estudio que indica que *PTGS2* participa en la expansión cumular es el que realizaron Nuttinck *et al.* en 2011 donde demostraron que al inhibir esta proteína durante MIV se restringe significativamente la activación de las protein cinasas mitógeno activadas (*MAPK*) en los ovocitos y que esto reduce la expansión cumular y la maduración. Ellos encontraron que esta inhibición no afecta la fertilización, pero si reduce la velocidad del desarrollo embrionario. La expresión de *PTGS2* es necesaria para la expansión cumular en bovinos, debido a que se ha visto que





Gráfica 28. Abundancia relativa mRNA de *ptgs2* en tejidos somático.

\*Indican expresión nula ( $P > 0.05$ ).



Gráfica 29. Abundancia relativa mRNA de *ptgs2* en células foliculares ( $P > 0.05$ ).

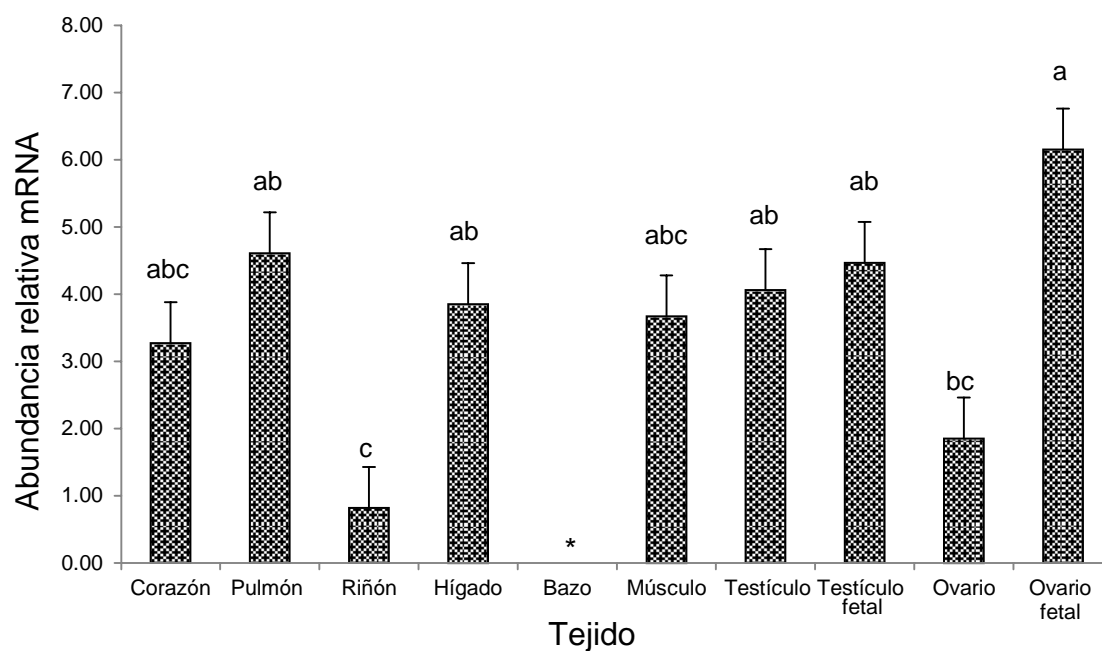
\*Indican expresión nula.



la expresión de ésta se incrementa en los COCs a las 6 y 12 horas después de la maduración para luego disminuir (Calder *et al.*, 2001).

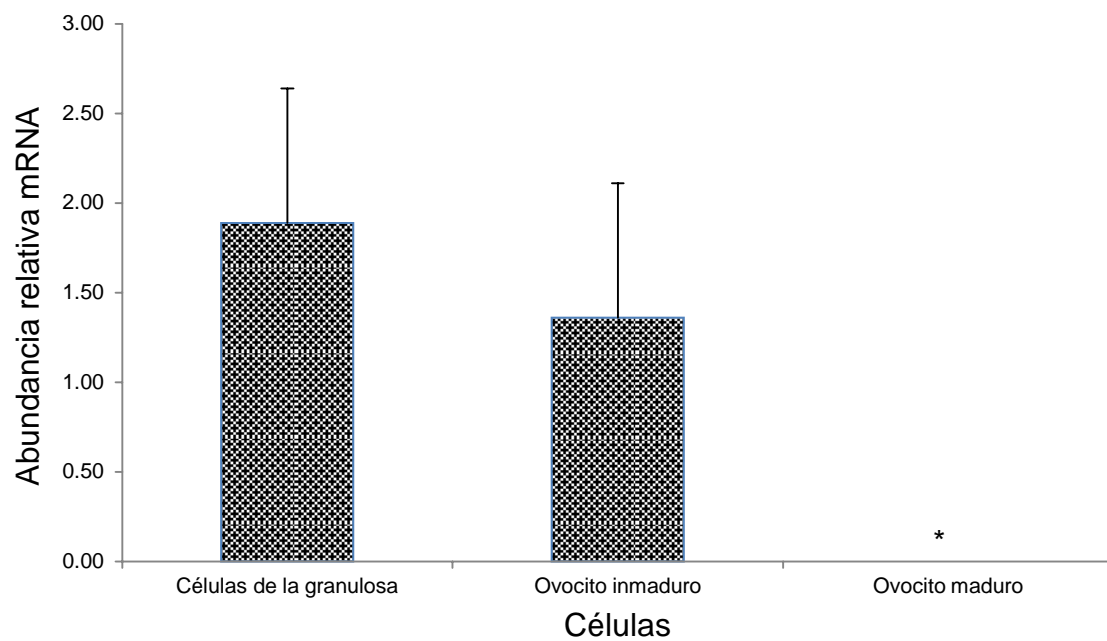
**PSAP.** Prosaponina (*PSAP*) es un precursor de saponinas A, B, C y D, el cual activa la hidrólisis de glicosfingolípidos, incrementa la unión de espermatozoos a la membrana del ovocito y así mejora la fertilización. *PSAP* al ser sintetizada puede tener dos posibles destinos, puede ser transportada al lisosoma o cuando es altamente glicosilada se le agrega una molécula llamada TGN para ser secretada (Carvelli *et al.*, 2015). Está involucrada en el mantenimiento del sistema nervioso, en señalización de estrés oxidativo, fertilización y posiblemente en el desarrollo de cáncer. Se ha encontrado en cerebro (Ham, 2004), en fluido de testículo de rata, conductos eferentes, epidídimo y células de Sertoli (Sylvester *et al.*, 1989). También se ha encontrado en fluidos humanos, fluido cerebroespinal, semen, leche, jugo pancreático y biliar (Hineno *et al.*, 1991). La expresión del gen que codifica para *PSAP* no mostró diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) entre los tejidos evaluados (Gráfica 30). El mismo resultado mostraron las CGs y ovocito inmaduro (Gráfica 31), donde la expresión de *psap* fue prácticamente la misma ( $P > 0.05$ ). La función de *PSAP* que se tiene bien reportada es que incrementa la tasa de embriones producidos por fertilización *in vitro*, esto se demostró al exponer el espermatozoos de ratón a *PSAP* recombinante lo que ocasionó un aumento en la unión relativa del espermatozoos al ovocito y por consiguiente aumentó la tasa de obtención de blastocitos en ratones (Magargee *et al.*, 2000).

**INHBA.** Esta subunidad puede formar parte de la hormona inhibina  $\beta_A$  (Sugino *et al.*, 1992) o bien si se unen dos moléculas de *INHBA* generan la



Gráfica 30. Abundancia relativa mRNA de *psap* en tejidos somático.

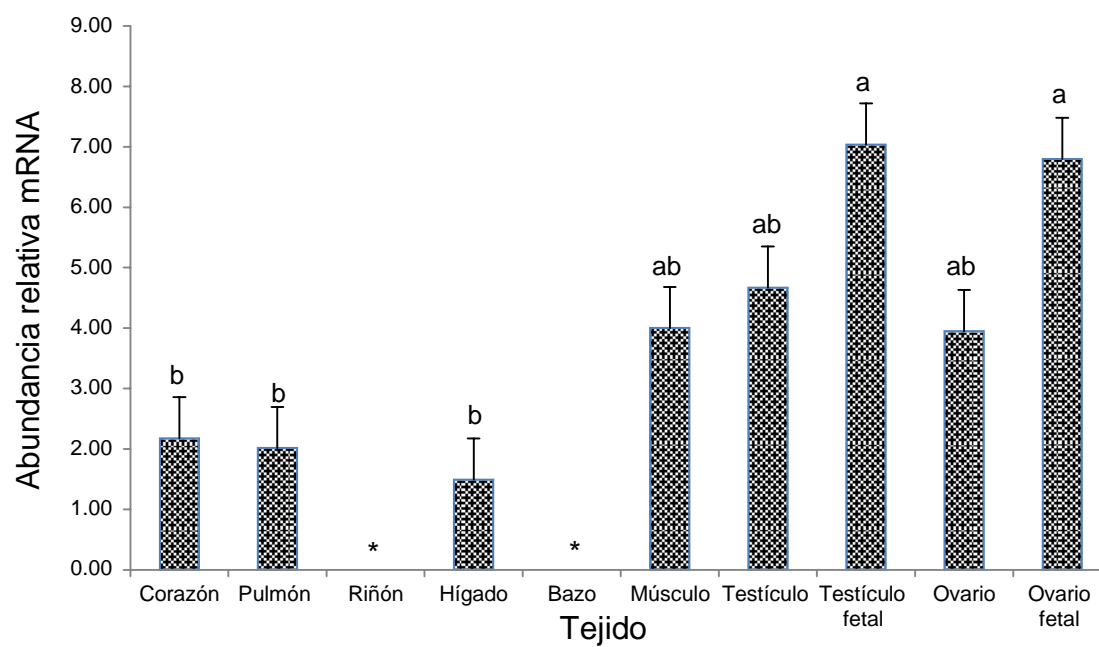
\*Indican expresión nula y literales diferentes indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).



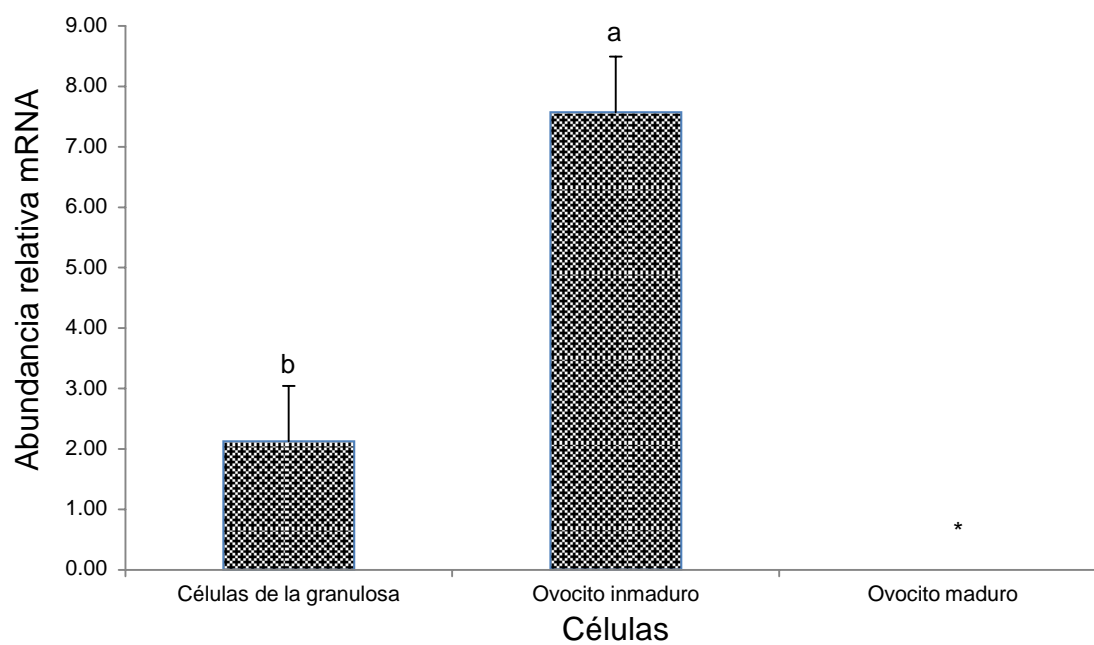
Gráfica 31. Abundancia relativa mRNA de *psap* en células foliculares ( $P > 0.05$ ).  
\*Indican expresión nula.



hormona activina A (Sidis *et al.*, 1998). Las activinas están implicadas en la sobrevivencia de células germinales y folículos primordiales, en crecimiento folicular, supresión de producción de andrógenos en células de la teca, proliferación de CGs, expresión de receptores para FSH y en atresia y luteólisis. Mientras que inhibina es producida en grandes cantidades en folículos preovulatorios y suprime la secreción de FSH. El balance entre activina e inhibina durante el desarrollo folicular es importante, activina permanece en altos niveles en estadios tempranos y cuando inhibina aumenta activina baja (Meehan *et al.*, 2000; Knight *et al.*, 2012). Al evaluar la expresión del gen que codifica para *INHBA* se encontró una muy baja expresión en corazón, pulmón e hígado comparado con la expresión alta que se observó en testículo fetal y ovario fetal (Gráfica 32;  $P < 0.05$ ), mientras que en los demás tejidos la expresión no muestra diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ). La posible explicación por la cual activina se expresa en tejidos somáticos es porque es un factor de crecimiento pluripotencial esencial para la homeostasis de los tejidos adultos (Knight y Glistler, 2001; Walton *et al.*, 2012). Mientras que en las células foliculares (Gráfica 33), es claro que la expresión es mayor en ovocito inmaduro que en CGs ( $P < 0.05$ ). Esto debido a que activina participa en el establecimiento de las células germinales ováricas, donde permite la sobrevivencia y proliferación de la ovogonia (Van den Hurk y Zhao, 2005). Por lo que un rol de la activina es la expansión cumular. Esto fue demostrado por Dragovic *et al.* (2007) donde sometieron COC sin ovocito a un tratamiento con FSH y activina A y se observó la expansión cumular.



Gráfica 32. Abundancia relativa mRNA de *inhba* en tejidos somático.  
\*Indican expresión nula y literales diferentes indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).



Gráfica 33. Abundancia relativa mRNA de *inhba* en células folículares.  
\*Indican expresión nula y literales diferentes indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

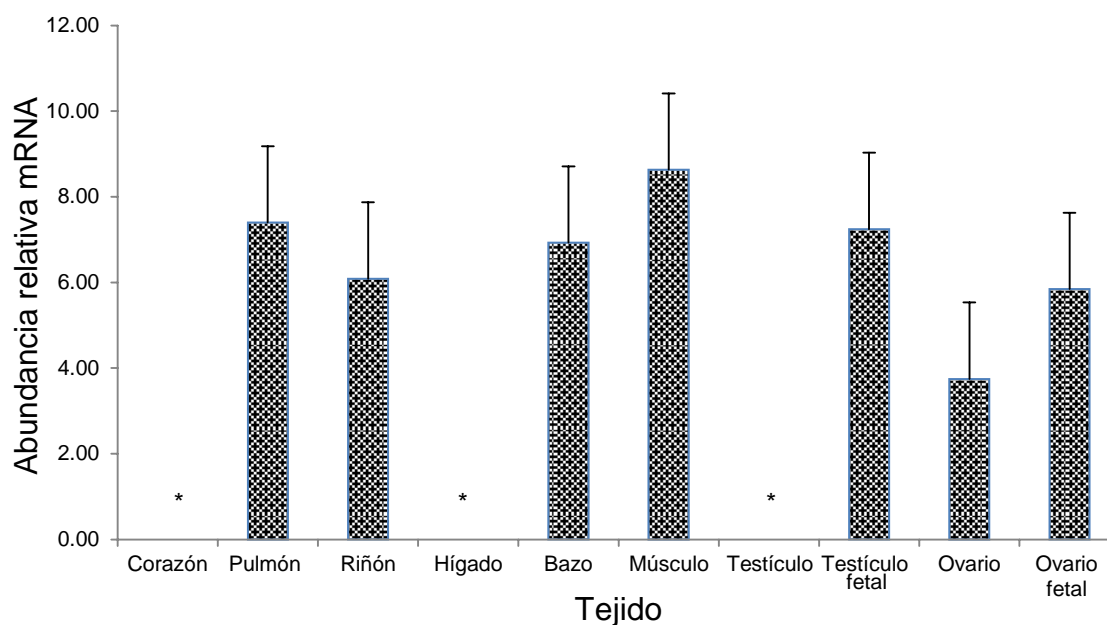




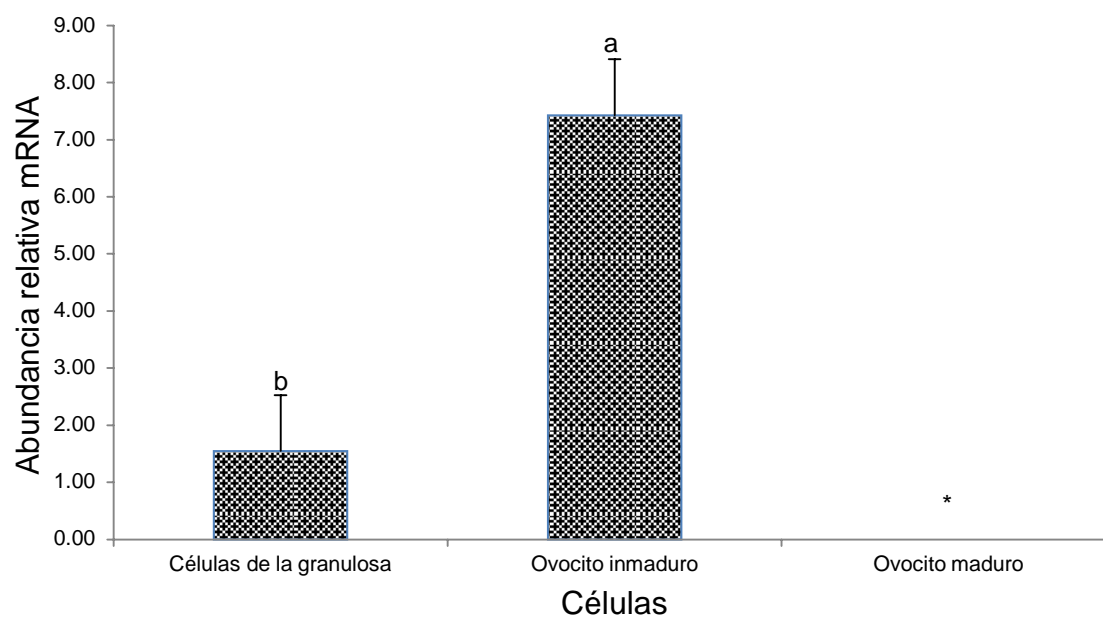
### Expresión de OSFs de Función no Identificada

**OOSP1.** El gen de la proteína 1 secretada por el ovocito (*OOSP1*) se encuentra localizado en el cromosoma 15 y está compuesto por cinco exones; posee dos variantes *OOSP1\_v1* (variante 1) que codifica una proteína de 163 aminoácidos y *OOSP1\_v2* (variante 2) que genera una proteína de 35 aminoácidos. La evaluación de la expresión de *oosp1* mostrada en la Gráfica 34, indica que este gen se expresó de manera similar ( $P > 0.05$ ) en la mayoría de los tejidos. Yan *et al.* (2001) encontraron expresión de *OOSP1* en bazo lo que concuerda con este estudio. En las células foliculares hubo una mayor expresión ( $P < 0.05$ ) en el ovocito inmaduro que en las CGs (Gráfica 35), lo que coincide con los diversos estudios que han indicado que el gen que codifica para *OOSP1* es expresado en el ovocito en donde se observa en altos niveles de expresión en el estado de vesícula germinal y gradualmente disminuye hasta el estado de blastocisto, hasta que es indetectable (Tremblay *et al.*, 2006; Griffith *et al.*, 2011; Razza *et al.*, 2013).

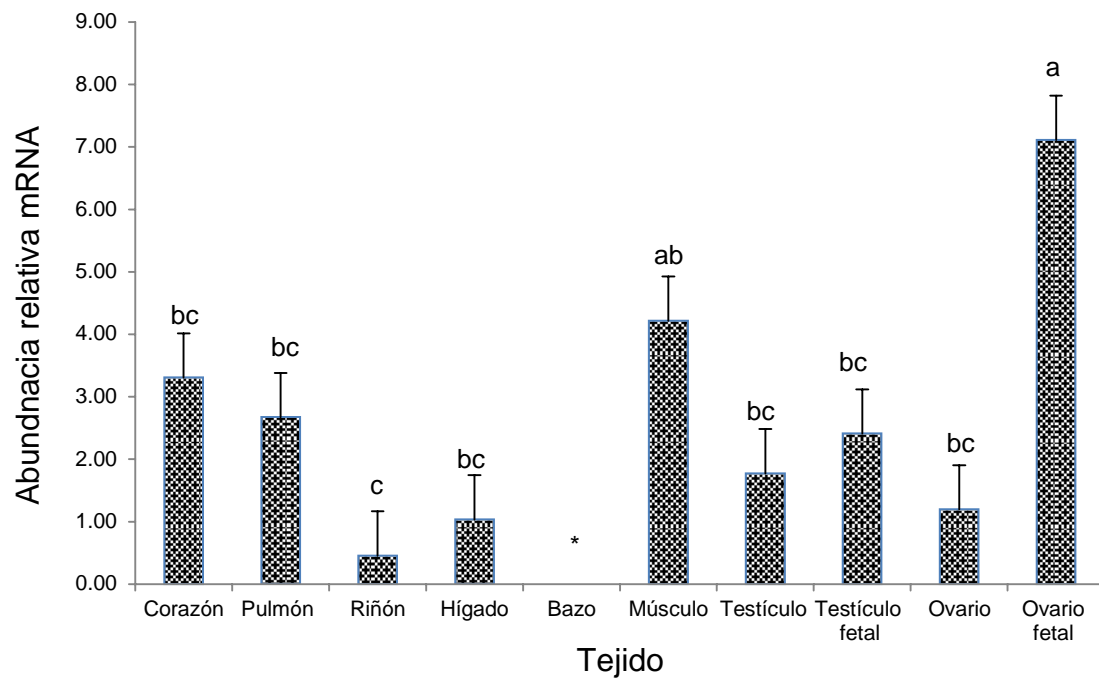
**SRPX.** La proteína con dominios sushi repetidos (*SRPX*) se localiza en el cromosoma X. Se le llaman dominios sushi por la estructura que toman, ya que los residuos de cisteína que posee la secuencia se unen de manera escalonada, lo que crea un bucle con una proteína contenida en otro bucle. En mamíferos está involucrada en adhesión celular y con regulación de la activación del complemento (Meindl *et al.*, 1995; Ria *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2012). En este estudio la expresión del gen *srpx* en tejidos somáticos (Gráfica 36) se mostró más elevada en ovario fetal y músculo, comparada con los demás tejidos donde la expresión fue baja ( $P < 0.05$ ). En células foliculares esta



Gráfica 34. Abundancia relativa mRNA de *oosp1* en tejidos somático ( $P > 0.05$ ).  
\*Indican expresión nula.



Gráfica 35. Abundancia relativa mRNA de *oosp1* en células folículares.  
\*Indican expresión nula y literales diferentes indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).



Gráfica 36. Abundancia relativa mRNA de *srpxen* en tejidos somático.

\*Indican expresión nula y literales diferentes indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).



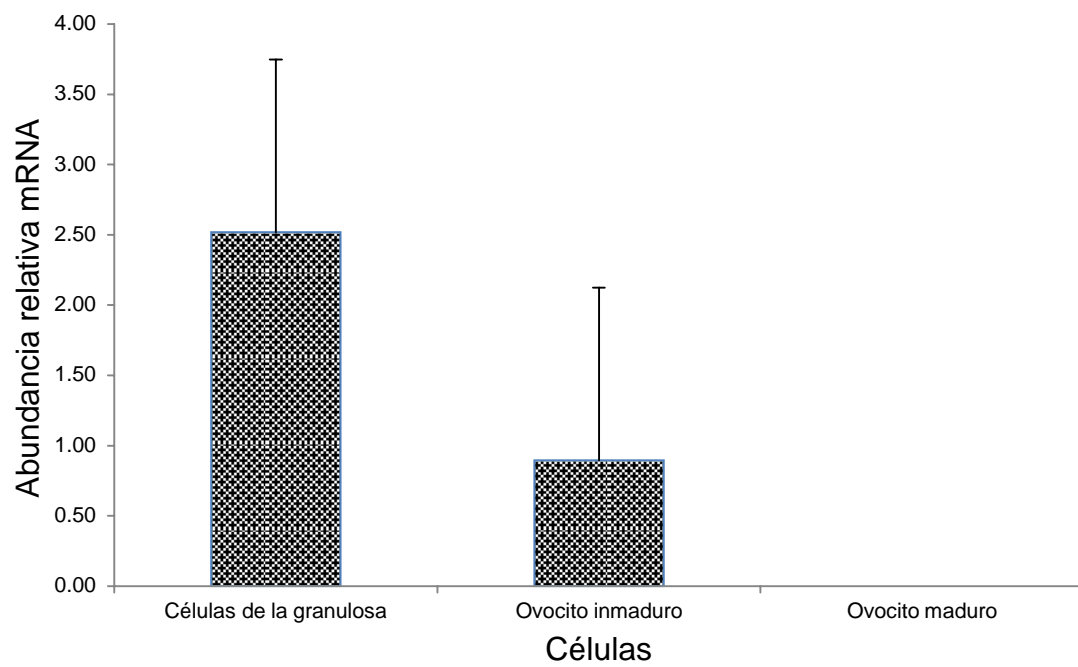
expresión tendió a ser más elevada en células de la granulosa que en ovocito inmaduro (Gráfica 37;  $P > 0.05$ ). Diversos estudios la encontraron expresada en líquido folicular secretado por CGs (Twig *et al.*, 2012) y en ovocito (Jiang *et al.*, 2014).

### **Análisis Global de la Expresión de OSFs en Tejidos Somáticos**

Conjuntando toda la información obtenida en este estudio, se puede decir que de los 17 OSFs identificados, 16 de ellos (94 %) son expresados en otros tejidos somáticos, por lo que no son exclusivos del ovocito. El gen que codifica para la proteína *MMP1* fue el único que sólo se expresa en CGs (Cuadro 6). Algo importante de recalcar es que el 64 % de los OSFs analizados (*INHBA*, *TIMP1*, *POSTN*, *PSAP*, *P4HA3*, *TNC*, *SRGN*, *CTSK*, *SRPX* y *SERPINE2*) tienden a estar más elevados en el ovario fetal; lo que indica que si bien estos OSFs no son exclusivos tienen una importante participación durante el desarrollo folicular en el periodo de desarrollo embrionario.

### **Análisis Global de la Expresión de OSFs en Células Foliculares**

Es importante destacar que ovocito maduro no mostró expresión de ninguno de los genes evaluados (Cuadro 6), esto es lógico, ya que durante el crecimiento y diferenciación del ovocito, éste se dedica a una transcripción intensa de RNA y síntesis de proteína (Rodman y Bachrova, 1976) de manera tal que cuando alcanza la maduración la actividad transcripcional del genoma del ovocito es silente, debido a que en sus primeros estadios ha sintetizado y almacenado los transcritos requeridos para la maduración meiótica y las primeras divisiones embrionarias (De La Fuente y Eppig, 2001). De hecho el encontrar transcripción activa en ovocitos maduros, en metafase II, sugiere que



Gráfica 37. Abundancia relativa mRNA de *srpx* en células foliculares ( $P > 0.05$ ).  
\*Indican expresión nula.



este ovocito aún se encuentra en el proceso de síntesis de sustancias requeridas para la maduración meiótica y que aún no está competente. Liu y Aoki (2002) observaron que la frecuencia de extrusión del primer cuerpo polar tiene una correlación negativa con la actividad transcripcional. Cuando el crecimiento está completo, la transcripción se vuelve silente, y suficientes moléculas han sido almacenadas en el ovocito para la meiosis y desarrollo competente. En lo que respecta a la expresión de los OSFs en las CGs y en el ovocito inmaduro, aunque en la mayoría de las expresiones comparadas no hubo diferencia estadística ( $P > 0.05$ ), lo que es claro es que hay una marcada diferencia en el tipo de OSFs que se expresan en uno u otro tipo celular. Los OSFs que tienden a expresarse mayormente en las CGs corresponden a proteínas de ECM, mientras que en el ovocito inmaduro la mayoría de las proteínas expresadas pertenecen al tipo de proteínas de señalización (Cuadro 7).

### **Uso Potencial de los OSFs Identificados como Factores Paracrinos en MIV**

Una de las grandes perspectivas de los procesos de biología reproductiva, es mejorar los protocolos de maduración *in vitro* de ovocitos, teniendo en cuenta que el ovocito secreta OSFs como *GDF9*, *BMP15*, *FGF8* y *ADM2*, que actúan de forma paracrina en el COC en desarrollo, con la finalidad de promover madurez y competencia en este gameto; sería interesante comprobar cuál de los OSFs que hemos identificado son adecuados para utilizarse de forma recombinante y agregarse a los cultivos de maduración *in vitro* de los ovocitos, tal como si fueran un factor de crecimiento. Con la información que hemos obtenido en la presente investigación y con lo



Cuadro 7. Agrupación de los OSFs de acuerdo a su tendencia de expresión en las células foliculares

CÉLULA FOLICULAR	TIPO DE PROTEÍNA	OSF
Células de la granulosa	<i>Proteínas de matriz extracelular</i>	<i>TIMP1</i>
		<i>MMP1</i>
		<i>TNFAIP6</i>
		<i>POSTN</i>
		<i>P4HA3</i>
		<i>TNC</i>
		<i>PTX3</i>
	<i>Proteínas de señalización</i>	<i>PTGS2</i>
	<i>Proteínas de función no identificadas</i>	<i>SRPX</i>
	<i>Proteínas de matriz extracelular</i>	<i>SRGN</i> <i>SERPINE2</i>
Ovocito inmaduro	<i>Proteínas de señalización</i>	<i>CARTPT</i>
		<i>INHBA</i>
		<i>SDF2L1</i>
	<i>Proteínas de función no identificadas</i>	<i>OOSP1</i>





consultado en la literatura, fue posible predecir que *TNFAIP6*, *PTX3*, *PTGS2* e *INHBA* son excelentes candidatos para utilizarse como factores paracrinós durante el protocolo de MIV. En el Cuadro 8 se detalla el criterio de selección para estos OSFs. Estas proteínas se encuentran disponibles en el mercado de individualmente (BioRad, 2015; CUSABIO, 2015; Hölzel, 2015) por lo que es factible adquirirlas de manera comercial para aplicarlas directamente en los medios de cultivo para MIV de ovocitos; lo que eliminaría la necesidad de clonar los genes de dichas proteínas, por lo que se podría evaluar de una forma más rápida su uso como OSF.



Cuadro 8. Selección de factores paracrinicos potenciales para ser utilizados en los protocolos de MIV

TIPO DE PROTEÍNA	PROTEÍNA DE SECRECIÓN IDENTIFICADA	FUNCIÓN	POTENCIAL OSF (motivo de selección)	REFERENCIA
106	Proteínas de matriz extracelular	<ul style="list-style-type: none"><li>Además de ser una proteína de secreción, también es una proteína lisosomal.</li><li>Participa en procesos proteolíticos, incluyendo la degradación de la ECM.</li><li>Al inhibir su acción hay un mayor desarrollo competente y menor porcentaje de células apoptóticas.</li></ul>	<b>NO</b>  (A pesar de encontrarse expresado en algunas células foliculares y en tejidos reproductivos posee acción nociva sobre la maduración del ovocito).	Oksjoki <i>et al.</i> , 2000  Bettegowda <i>et al.</i> , 2008
		<ul style="list-style-type: none"><li>Inhibe la acción de metaloproteinasas tisulares (MMPs).</li></ul>	<b>NO</b>	
		<ul style="list-style-type: none"><li>Está implicada en el proceso de ovulación.</li><li>Promueve la esteroidogénesis en sistemas <i>in vitro</i> pero no hay evidencia de esto <i>in vivo</i>.</li><li>En cultivos <i>in vitro</i> aumenta el porcentaje de blastocistos porcinos.</li></ul>	(Aunque se encontró expresada en CGs y en ovocito inmaduro no es potencial OSF debido a que participa en el proceso de ovulación, proceso que en MIV no sucede).	Nothnick <i>et al.</i> , 1997  Häggglund <i>et al.</i> , 1999  Funahashi <i>et al.</i> , 2000  Shores y Hunter, 2000



TIPO DE PROTEÍNA	PROTEÍNA DE SECRECIÓN IDENTIFICADA	FUNCIÓN	POTENCIAL OSF (motivo de selección)	REFERENCIA
107	Proteínas de matriz extracelular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Actúa en la degradación de colágeno tipo IV.</li> <li>• Requerida para la ruptura del folículo al momento de la ovulación.</li> </ul>	<p><b>NO</b></p> <p>(Si bien esta proteína fue la única que tuvo expresión exclusiva en CGs no se considera un potencial OSF, ya que actúa degradando el colágeno, que es necesario durante la ovulación, sin embargo este proceso no se presenta en MIV).</p>	McIntush y Smith (1998) Iwahashi <i>et al.</i> (2000) Curry y Osten (2001)
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es un proteoglicano intracelular involucrado en el almacenamiento y secreción de varios componentes de la ECM.</li> <li>• Interviene en la síntesis y secreción de proteasas.</li> <li>• En bovinos se expresa en células de la granulosa de COC bajo el estímulo de LH.</li> </ul>	<p><b>NO</b></p> <p>(Al no ser ovocito exclusivo y presentar expresión en la mayoría de los tejidos evaluados, además debido a que participa en la síntesis de proteasas, que son necesarias en el proceso de ovulación, proceso que no ocurre en MIV).</p>	Mihm <i>et al.</i> (2008) Gilbert <i>et al.</i> (2012) Theocharis <i>et al.</i> (2014)



TIPO DE PROTEÍNA	PROTEÍNA DE SECRECIÓN IDENTIFICADA	FUNCIÓN	POTENCIAL OSF (motivo de selección)	REFERENCIA
108 <i>Proteínas de matriz extracelular</i>	<i>TNFAIP6</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es esencial para la formación de la matriz cumular.</li> <li>• Es rápidamente sintetizada por CCs y de la granulosa durante el proceso de expansión del COC.</li> <li>• Se une a ácido hialurónico.</li> <li>• En hembras de ratones deficientes de <i>TNFAIP6</i> la expansión del COC falla y este proceso es obligatorio para la fertilidad en las hembras.</li> </ul>	<p><b>SI</b> (Se encuentra expresada selectivamente en algunos tejidos somáticos así como en ovocito inmaduro y en CGs. La presencia de esta proteína en el cultivo ayudaría a la expansión cumular).</p>	<p>Salustri <i>et al.</i> (1990)</p> <p>Wisniewski <i>et al.</i> (1994)</p> <p>Fülöp <i>et al.</i> (1997)</p>
	<i>POSTN</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es una proteína de adhesión celular.</li> </ul>	<p><b>NO</b> (Al encontrarse expresada de manera ubicua en los tejidos evaluados y debido a que la información encontrada sobre ésta no explica la acción folicular que ésta tendría).</p>	<p>Lee <i>et al.</i> (2011)</p> <p>Morelli <i>et al.</i> (2014)</p> <p>Di Cello <i>et al.</i> (2015)</p>
	<i>P4HA3</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Relacionada con la biosíntesis de colágeno, mayor componente de la ECM.</li> <li>• Es muy activa en células de la teca.</li> </ul>	<p><b>NO</b> (Aunque se expresa en tejidos reproductivos; actúa en células de la teca y en el caso particular de MIV, sólo se trabaja con los COCs).</p>	<p>Iwahashi <i>et al.</i> (2000)</p> <p>Hatzirados <i>et al.</i> (2014)</p>



TIPO DE PROTEÍNA	PROTEÍNA DE SECRECIÓN IDENTIFICADA	FUNCIÓN	POTENCIAL OSF (motivo de selección)	REFERENCIA
Proteínas de matriz extracelular	TNC	<ul style="list-style-type: none"><li>• Relacionada con proliferación, diferenciación, motilidad, migración e inhibición de adhesión celular.</li><li>• Induce la secreción de MMPs.</li><li>• Por ensayos de inmunohistoquímica en ovario de ratón se localizó a nivel de la capa externa de células de la teca en folículos prentales.</li></ul>	<b>NO</b>  (Esta proteína tiene expresión ubicua en tejidos somáticos; se encuentra localizada en las células de la teca, en el cultivo de maduración <i>in vitro</i> sólo se trabaja con el COC que está desprovisto de células de la teca).	Bartsch (1996)  Yasuda <i>et al.</i> (2005)  Tucker y Chiquet-Ehrismann (2009)  Chiquet-Tucker (2010)
	PTX3	<ul style="list-style-type: none"><li>• Estabiliza la ECM en el COC, debido a que se une a TNFAIP6 y a su vez al hialurano.</li><li>• Es sintetizado por las CCs durante la expansión cumular y actúa para mantener expandida la matriz del COC.</li><li>• Ratones KO para <i>ptx3</i> son infértiles e incapaces de organizar el hialurano en la ECM del COC.</li><li>• Relacionada con la expansión cumular del COC.</li></ul>	<b>SI</b>  (Debido a que esta proteína tiene expresión en tejidos reproductivos; así como en CGs y ovocito inmaduro. Además la presencia de ésta en el cultivo ayudaría a mantener la organización celular del COC).	Salustri <i>et al.</i> (2004)  Scarchilli <i>et al.</i> (2007)  Levoli <i>et al.</i> (2011)



TIPO DE PROTEÍNA	PROTEÍNA DE SECRECIÓN IDENTIFICADA	FUNCIÓN	POTENCIAL OSF (motivo de selección)	REFERENCIA
110	Proteínas de matriz extracelular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es una proteína inhibidora de serin proteasas que degradan la ECM durante la remodelación de ésta.</li> <li>• En el bovino su expresión es alta en ovario fetal.</li> </ul>	<p><b>NO</b></p> <p>(Debido a que posee expresión ubicua en los tejidos analizados y que inhibe a MMPs, proteínas que actúan en la ruptura del folículo al momento de la ovulación, y que este mecanismo no ocurre en maduración <i>in vitro</i>).</p>	<p>Bédard <i>et al.</i> (2003)</p> <p>Cao <i>et al.</i> (2004)</p>
	Proteínas de señalización	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La unión de CARTPT a la membrana de CGs reduce la síntesis de estrógenos, debido a que hace menos sensibles a las células a la acción de FSH y esto provoca que el folículo detenga su desarrollo generando así un folículo atrésico.</li> </ul>	<p><b>NO</b></p> <p>(A pesar de poseer expresión en tejidos reproductivos la adición de esta proteína al cultivo MIV afectaría de manera negativa al desarrollo del ovocito).</p>	<p>Lv <i>et al.</i> (2009)</p> <p>Folger <i>et al.</i> (2013)</p>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conocida como COX-2, está relacionada con la reactivación de la meiosis en ovocito inmaduro; es requerida para expansión cumular.</li> <li>• Activa la síntesis de prostaglandina G.</li> </ul>	<p><b>SI</b></p> <p>(Se expresa en tejidos reproductivos; en CGs y ovocito inmaduro; ayuda a la expansión cumular, lo que promovería la maduración del ovocito).</p>	<p>Smith (1992)</p> <p>Nuttinch <i>et al.</i> (2011)</p> <p>Marei <i>et al.</i> (2014)</p>



TIPO DE PROTEÍNA	PROTEÍNA DE SECRECIÓN IDENTIFICADA	FUNCIÓN	POTENCIAL OSF (motivo de selección)	REFERENCIA
Proteínas de señalización	INHBA	<ul style="list-style-type: none"><li>• Puede formar parte de la hormonaa activina A o de la inhibina <math>\beta</math>A. Las activinas están implicadas en la expansión cumular, en la sobrevivencia de células germinales y folículos primordiales, en crecimiento folicular, proliferación de células de la granulosa y en expresión de receptores para FSH, mientras que la inhibina suprime la secreción de FSH.</li></ul>	<b>SI</b>  (A pesar de encontrarse expresada tanto en tejidos reproductivos como somáticos; debido a que al formar parte de la activina A incrementaría el desarrollo competente del ovocito).	Sugino <i>et al.</i> (1992)  Sidis <i>et al.</i> (1998)  Dragovic <i>et al.</i> (2007)
	SDF2L	<ul style="list-style-type: none"><li>• Es una proteína de secreción producida por células estromales, pero su función no está definida</li><li>• Además se ha reportado que se localiza en retículo endoplásmico y es una proteína que se expresa por la respuesta inducida al estrés</li><li>• Actúa como una proteína tipo chaperona que ayuda en el plegamiento de las proteínas</li></ul>	<b>NO</b>  (Al tener expresión en la mayoría de los tejidos y en base a la literatura consultada, la cual no ayuda a explicar la función de esta proteína en el ovocito, por lo que no está clara la razón por la que la secreta).	Bauersachs <i>et al.</i> (2004)  Tongaonkar y Selsted (2009)  Meredith <i>et al.</i> (2013)  Tiwari <i>et al.</i> (2013)



TIPO DE PROTEÍNA	PROTEÍNA DE SECRECIÓN IDENTIFICADA	FUNCIÓN	POTENCIAL OSF (motivo de selección)	REFERENCIA
Proteínas de señalización	PSAP	<ul style="list-style-type: none"><li>• Es secretada por células de Sertoli en testículos y se ha vinculado a procesos de diferenciación del espermatozoide.</li><li>• En protocolos de IVF en ratones aumenta el porcentaje de formación de cigotos.</li><li>• Su unión con el esperma promueve que éste se una de mejor forma a la membrana del ovocito.</li></ul>	<b>NO</b> (A pesar encontrarse expresada en los tejidos reproductivos analizados, así como en CGs y ovocito maduro, ya que esta proteína sería benéfica al adicionarla al momento de la fertilización, pero no tienen ninguna acción sobre la maduración del ovocito).	Hineno <i>et al.</i> (1991) Magargee <i>et al.</i> (2000) Ham (2004)
	OOSP1	<ul style="list-style-type: none"><li>• Aún no está reportada ninguna función. Sólo se ha reportado que está presente en el ovocito inmaduro en el estado de vesícula germinal.</li></ul>	<b>NO</b> (Aunque esta proteína se encontró expresada en tejidos reproductivos de la hembra no es un potencial OSF debido aún no se tiene dilucidada su función sobre el ovocito).	Yan <i>et al.</i> (2001) Tremblay <i>et al.</i> (2006)
No identificadas	SRPX	<ul style="list-style-type: none"><li>• Presente en el líquido folicular secretado por células de la granulosa y presente también en ovocito.</li></ul>	<b>NO</b> (La expresión de esta proteína es ubicua y aún no se tiene reportada la función de esta proteína).	Twigt <i>et al.</i> (2012) Jiang <i>et al.</i> (2014)





## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se identificaron nuevas proteínas de secreción del ovocito mediante análisis bioinformático. La mayoría de los genes que codifican para éstas presentan un patrón generalizado de expresión en los tejidos evaluados, excepto *mmp1* que sólo se encuentra expresado en CGs. En el caso de ovocito inmaduro se logró confirmar la expresión de casi todos los genes que codifican para las proteínas identificadas en el análisis bioinformático, pero no fue el caso en el ovocito maduro, donde no se expresó ningún gen analizado. Por lo que las proteínas identificadas no son exclusivas del ovocito; sin embargo con base al patrón de expresión en tejidos reproductivos y células foliculares las proteínas que pueden mejorar el proceso de MIV y de manera indirecta la tasa de obtención de blastocistos bovino por sistemas *in vitro* son aquellas involucradas en la expansión cumular: *TNFAIP6*, *PTX3*, *PTGS2* e *INHBA*.

Se recomienda analizar la expresión de los genes que codifican para los 17 OSFs identificados en organismos vivos, así como en COCs inmaduros y maduros, es decir analizar en conjunto el ovocito con las CGs que lo rodean; además de realizar el experimento con mayor número de repeticiones.

Para la extracción de RNA total se recomienda el uso de algún kit comercial (por ejemplo PicoPure RNA Isolation Kit, marca Arcturus) para aumentar la eficiencia de la extracción, debido a que el número de células con las cuales se trabajó es pequeño, lo que en un determinado momento puede dificultar este procedimiento.

Por último, se recomienda evaluar los cuatros OSFs identificados como probables proteínas que mejoren el proceso de MIV, adicionándolos de manera



recombinante a los medios de maduración para ovocitos, con la finalidad de confirmarlos como factores que puedan aumentar la tasa de obtención de embriones por métodos *in vitro*. Además es de suma importancia evaluar las proteínas *POSTN*, *SDF2L1*, *PSAP*, *OOSP1* y *SRPX* para esclarecer su función sobre el ovocito y tal vez tengan acción sobre el desarrollo competente de éste, ya que en el presente estudio se encontraron expresados en células foliculares y en tejidos reproductivos pero no se encontraron reportes que expliquen su presencia en estas células y tejidos.



## LITERATURA CITADA

- Åbrink, M., M. Grujic, M. y G. Pejler. 2004. Serglycin is essential for maturation of mast cell secretory granule. *J. Biol. Chem.* 279:40897-40905.
- Adams, G. P. y R. A. Pierson. 1995. Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. *Theriogenology*. 43:113-120.
- Adams, G. P., R. Jaiswal, J. Singh y P. Malhi. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*. 69:72-80.
- Aerts, J. M. J. y P. E. J. Bols. 2010. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reprod. Domest. Anim.* 45:180-187.
- Albertini, D. F., C. M. Combelles, E. Benecchi y M. J. Carabatsos. 2001. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*. 121:647-653.
- Alvino, E. R. 2010. The role of the cumulus oocyte complex during ovulation. Tesis de Doctorado en Filosofía. Robinson Research Institute. Universidad de Adelaide. Australia.
- Amaral, M. E. J., S. R. Kata y J.E. Womack. 2002. A radiation hybrid map of bovine X chromosome (BTAX). *Mamm. Genome*. 13:268-271.
- Bagavandoss, P. 1998. Differential distribution of gelatinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the rat ovary. *J. Endocrinol.* 158: 221-228.
- Bartsch, U. 1996. The extracellular matrix molecule tenascin-C: expression in vivo and functional characterization *in vitro*. *Prog. Neurobiol.* 49:145-168.
- Bauersachs, S., S. Rehfeld, S. E. Ulbrich, S. Mallok, K. Prella, H. Wenigerkind, R. Einspainer, H. Blum y E. Wolf. 2004. Monitoring gene expression changes in bovine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle. *J. Mol. Endocrinol.* 32:449-466.
- Bédard, J., S.Brûlé, C. A. Price, D. W. Silversides y J. G. Lussier. 2003. Serine protease inhibitor-E2 (*SERPINE2*) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicle in cattle. *Mol. Reprod. Dev.* 64:152-165.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne y S. Brunak. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340:783-795.
- Bendtsen, J. D., L. Kiemer, A. Fausbøll y S. Brunak. 2005. Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol.* 5:58.
- Bettegowda, A., O. V. Patel, K. B. Lee, K. E. Park, M. Salem, J. Yao J. J. Ireland y G. W. Smith. 2008. Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. *Biol. Reprod.* 79:301-309.



- Biederbick, A., A. Licht, A. y R. Kleene. 2003. Serglycin proteoglycan is sorted into zymogen granules of rat pancreatic acinar cells. *Eur. J. Cell. Biol.* 82:19-29.
- BioRad. 2015. Recombinant bovine TNF alpha. En: <https://www.abdserotec.com/cow-bovine-tnf-alpha-recombinant-protein-pbp005.html> Consultado 06 Diciembre 2015.
- Birkedal-Hansen, H., W. G. I. Moore, M. K. Bodden, L. J. Windsor, B. Birkedal-Hansen, A. DeCarlo y J. A. Engler. 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4:197-250.
- Brevini, T. y G. Pennarossa. 2013. Gametogenesis, Early embryo development and stem cell derivation. 1a. ed. Springer New York Heidelberg Dordrecht London.
- Burrola-Barraza M. E. y E. González-Rodríguez. 2015. Efectos de los RNAm maternos sobre la maduración del ovocito y el desarrollo embrionario temprano en mamíferos. *Rev. Mex. Cienc. Pec.* 6:39-68.
- Calder, M. D., A. N. Caveney, M. E. Westhusin y A. J. Watson. 2001. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 (PGE2) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE2 induces moderate expansion of the bovine cumulus in vitro. *Biol. Reprod.* 65:135-140.
- Cao, M., M. Sahmi, J. G. Lussier y C. A. Price. 2004. Plasminogen activator and serine protease inhibitor-E2 (protease nexin-1) expression by bovine granulosa cells in vitro. *Biol. Reprod.* 71:887-893.
- Carabatsos, M. J., C. Sellitto, D. A. Goodenough y D. F. Albertini. 2000. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Dev. Biol.* 226:167-179.
- Carvelli, F. L., Y. Libin y C. R. Morales. 2014. Prosaposin: A protein with differential sorting and multiple functions. *Histol. Histopathol.* 1:1-14.
- Chang, C. L., H. S. Wang, Y. K. Soong, S. Y. Huang, S. Y. Pai y S. Y. T. Hsu. 2011. Regulation of oocyte and cumulus cell interactions by Intermedin/Adrenomedullin 2. *J. Biol. Chem.* 286:43193-43203.
- Chian, R. C., J. T. Chung, B. R. Downey y S. L. Tan. 2002. Maturation and development competence of immature oocytes retrieved from bovine ovaries at different phases of folliculogenesis. *Reprod. Biomed. Online.* 4:127-132.
- Chiquet-Ehrismann, R. y R. P. Tucker. 2010. Tenascins and the importance of adhesion modulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3:a004960.



- Conti, M., M. Hsieh, A. M. Zamah y J. S. Oh. 2012. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 356:65-73.
- Cunningham, J. G., y B. G. Klein. 2007. *Textbook of Veterinary Physiology*. 4aed. Editorial ELSEVIER. St. Louis, Missouri, USA.
- Curry, T. E. y K. G. Osteen. 2001. Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biol. Reprod.* 64:1285-1296.
- CUSABIO. 2015. Recombinant protein. En: <http://www.cusabio.com/catalog-19-2.html> Consultado 06 Diciembre 2015.
- De La Fuente, R. y Eppig, J. J. 2001. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. *Dev. Biol.* 229:224-236.
- Dekel, N. y W. H. Beers. 1978. Rat oocyte maturation in vitro: relief of cyclic AMP inhibition by gonadotropins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:4369-4373.
- Di Cello, A., E. Rania, M. D. Sanzo, P. D'Alessandro, R. Venturella, I. Strina, B. Quaresima, M. Morelli, F. Zullo y F. Costanzo. 2015. Periostin and implantation: a new biomarker of embryo-endometrial cross talk. *CCE.* 2:35-46.
- Diaz, F. J., M. J. O'brien, K. Wigglesworth y J. J. Eppig. 2006. The preantral granulosa cell to cumulus cell transition in the mouse ovary: development of competence to undergo expansion. *Dev. Biol.* 299:91-104.
- Dragovic, R. A., L. Ritter, S. Schulz, F. Amato, J. Thompson, D. Armstrong y R. Gilchrist. 2007. Oocyte-secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse cumulus cell expansion. *Biol. Reprod.* 76:848-857.
- Edwards, R. G. 1965. Maturation *in vitro* of human ovarian oocytes. *Lancet.* 286:926-929.
- Emanuelsson, O., S. Brunak, G. von Heijne y H. Nielsen. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.* 2:953-971.
- Eppig, J. J., 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction.* 122:829-838.
- Eppig, J. J. y S. M. Downs. 1987. The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development in vitro: maintenance of meiotic arrest and gonadotropin-induced oocyte maturation. *Dev. Biol.* 119:313-321.
- Familiari, G., C. Verlengia, S. A. Nottola, T. Renda, G. Micara, C. Aragona, L. Zardi y P. M. Motta. 1996. Heterogenous distribution of fibronectin, Tenascin-C, and laminin immunoreactive material in the cumulus-coronal



- cells surrounding mature human oocytes from IVF-ET protocols-Evidence that they are composed of different subpopulations: An immunohistochemical study using scanning confocal laser and fluorescence microscopy. *Mol. Reprod. Dev.* 43:392-402.
- Fawcett, B. 1995. *Tratado de Histología*. 12a ed. Editorial McGraw Hill interamericana, Madrid.
- Folger, J. K., F. Jimenez-Krassel, J. J. Ireland, L. Lv y G. W. Smith. 2013. Regulation of granulosa cell cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) binding and effect of CART signaling inhibitor on granulosa cell estradiol production during dominant follicle selection in cattle. *Biol. Reprod.* 89:137-145.
- Fukuda, S., M. Sumii, Y. Masuda, M. Takahashi, N. Koike, J. Teishima, H. Yasumoto, T. Itamoto, T. Asahara, K. Dohi y K. Kamiya. 2001. Murine and human SDF2L1 is an endoplasmic reticulum stress-inducible gene and encodes a new member of the Pmt/rt protein family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280:407-414.
- Fülöp, C., R. V. Kamath, Y. Li, J. M. Otto, A. Salustri, B. R. Olsen, T. T. Glant y V. C. Hascall. 1997. Coding sequence, exon-intron structure and chromosomal localization of murine TNF-stimulated gene 6 that is specifically expressed by expanding cumulus cell-oocyte complexes. *Gene*. 202:95-102.
- Fülöp, C., S. Szántó, D. Mukhopadhyay, T. Bárdos, R. V. Kamath, M. S. Rugg, A. Day, A. Salustri, V. Hascall, T. Glant y K. Mikecz. 2003. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. *Development*. 130:2253-2261.
- Funahashi, H., E. W. McIntush, M. F. Smith, y B. N. Day. 1999. The presence of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) during meiosis improves porcine "oocyte competence" as determined by early embryonic development after *in-vitro* fertilization. *J. Reprod. Dev.* 45:265-271.
- Garg, G. y S. Ranganathan. 2011. *In silico* secretome analysis approach for next generation sequencing transcriptomic data. *BMC Genomics*. 12:1-10.
- Garg, G. y S. Ranganathan. 2012. Helminth secretome database (HSD): a collection of helminth excretory/secretory proteins predicted from expressed sequence tags (ESTs). *BMC Genomics*. 13:1-11
- Garg, G, D. Bernal, M. Trelis, J. Forment, J. Ortiz, M.L. Valero, L. Pedrola, J. Martínez, J. G. Esteban, S. Ranganathan, R. Toledo y A. Marcilla. 2013. The transcriptome of *Echinostoma caproni* adults: Further characterization of the secretome and identification of new potential drug targets. *J. Proteomics*. 89:202-214.



- Gilbert, I., C. Robert, C. Vigneault, P. Blondin y M. A. Sirard. 2012. Impact of the LH surge on granulosa cell transcript levels as markers of oocyte developmental competence in cattle. *Reproduction*. 143:735-747.
- Gilchrist, R. B., L. J. Ritter y D. T. Armstrong. 2004. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim. Reprod. Sci.* 82:431-446.
- Gilchrist, R. B., L. J. Ritter, S. Myllymaa, N. Kaivo-Oja, R. A. Dragovic, T. Hickey, O. Ritvos y D. G. Mottershead. 2006. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. *J. Cell. Sci.* 119:3811-3821.
- Gilchrist, R. B., M. Lane y J. G. Thompson. 2008. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum. Reprod. Update*. 14:159-177.
- Gillan, L., D. Matei, D. A. Fishman, C. S. Gerbin, B. Y. Karlan y D. D. Chang. 2002. Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for  $\alpha V\beta 3$  and  $\alpha V\beta 5$  integrins and promotes cell motility. *CR*. 62:5358-5364.
- Griffith, G. J., M. Tras, J. Hiller, M. Walentuk, J. Pawlak, K. Tremblay y J. Mager. 2011. Yin-yang1 is required in the mammalian oocyte for follicle expansion. *Biol. Reprod.* 84:654-663.
- Grimmond, S. A., K. C. Miranda, Z. Yuan, M. J. Davis, D. A. Hume, K. Yagi, N. Tominaga, H. Bono, Y. Hayashizaki, Y. Okazaki y R.D. Teasdale. 2003. The mouse secretome: functional classification of the proteins secreted into the extracellular environment. *Genome Research*. 13:1350-1359.
- Häggglund, A. C., A. Ny, G. Leonardsson y T. Ny. 1999. Regulation and Localization of Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse ovary during gonadotropin-induced ovulation 1. *Endocrinology*. 140:4351-4358.
- Hall, V., K. Hinrichs, G. Lazzari, D. H. Betts, y P. Hyttel. 2013. Early embryonic development, assisted reproductive technologies, and pluripotent stem cell biology in domestic mammals. *Vet. J.* 197:128-142.
- Ham, D. 2004. Prosaposin precursor protein: functions and medical applications. *Scr. Med.* 77:127-134.
- Hatzirodos, N., K. Hummertsch, H. F. Irving-Rodgers y R. J. Rodgers. 2014. Transcriptome profiling of the theca interna in transition from small to large antral ovarian follicles. *PLoS One*. 9:e97489.
- Hayakawa, T., K. Yamashita, K. Tanzawa, E. Uchijima y K. Iwata. 1992. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett.* 298:29-32.
- Heo, S. C., K. O. Lee, S. H. Shin, Y. W. Kwon, Y. M. Kim, C. H. Lee, M. S. Yoon y J. H. Kim. 2011. Periostin mediates human adipose tissue-derived





- mesenchymal stem cell-stimulated tumor growth in a xenograft lung adenocarcinoma model. *Biochim. Biophys. Acta.* 1813:2061-2070.
- Hineno, T., A. Sano, K. Kondoh, S. I. Ueno, Y. Kakimoto, y K. I. Yoshida. 1991. Secretion of sphingolipid hydrolase activator precursor, prosaposin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176:668-674.
- Ho, H. C. K., K. E. McGrath, K. C. Brodbeck, J. Palis y B. P. Schick. 2001. Serglycin proteoglycan synthesis in the murine uterine decidua and early embryo. *Biol. Reprod.* 64:1667-1676.
- Hölzel diagnostika. 2015. Recombinant bovine prostaglandin G/H synthase 2 (PTGS2), partial. En: <http://www.hoelzel-biotech.com/en/cusabio-proteins-bo-csb-mp018986bo-recombinant-bovine-prostaglandin-gh-synthase-2ptgs2-partial.html> Consultado 06 Diciembre 2015.
- Hu, F., W. Wang, H. C. Zhou y X. F. Shang. 2014. High expression of periostin is dramatically associated with metastatic potential and poor prognosis of patients with osteosarcoma. *World J. Surg. Oncol.* 12:287-295.
- Hussein, T. S., D. A. Froiland, F. Amato, J. G. Thompson y R. B. Gilchrist. 2005. Oocyte prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J. Cell. Sci.* 118:5257-5268.
- Ingebritson, A. L., J. A. Roth y P. J. Hauer. 2010. Erysipelothrix rhusiopathiae: association of Spa-type with serotype and role in protective immunity. *Vaccine.* 28:2490-2496.
- Ishidoh, K. y E. Kominami. 1998. Gene regulation and extracellular functions of procathepsin L. *Biological chemistry.* 379:131-136.
- Iwahashi, M., Y. Muragaki, A. Ooshima y R. Nakano. 2000. Type VI collagen expression during growth of human ovarian follicles. *Fertil. Steril.* 74:343-347.
- Jaworski, J. N., A. Vicentic, R. G. Hunter, H. L. Kimmel y M. J. Kuhar. 2003. CART peptides are modulators of mesolimbic dopamine and psychostimulants. *Life Sci.* 73:741-747.
- Jiang, Z., J. Sun, H. Dong, O. Luo, X. Zheng, C. Obergfell, Y. Tang, J. Bi, R. O'Neill, Y. Ruan, J. Chen y X. Tian. 2014. Transcriptional profiles of bovine in vivo pre-implantation development. *BMC Genomics.* 15:756-761.
- Juengel, J. L. y K. P. McNatty. 2005. The role of proteins of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum. Reprod. Update.* 11:144-161.
- Kaivo-oja, N., L. A. Jeffery, O. Ritvos y D. G. Mottershead. 2006. Smad signalling in the ovary. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4:21-34.





- Kathirvel, M., E. Soundian y V. Kumanan. 2013. Differential expression dynamics of growth differentiation factor9 (*GDF9*) and bone morphogenetic factor15 (*BMP15*) mRNA transcripts during *in vitro* maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) cumulus-oocyte complexes. Springerplus. 2:206-212.
- Kivirikko, K. I. y J. Myllyharju. 1998. Prolyl 4-hydroxylases and their protein disulfide isomerase subunit. Matrix Biol. 16:357-368.
- Knight, P. G. y C. Glister. 2001. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. Reproduction. 121:503-512.
- Knight, P. G., L. Satchell y C. Glister. 2012. Intra-ovarian roles of activins and inhibins. Mol. Cell. Endocrinol. 359:53-65.
- Kobayashi, Y., F. Jimenez-Krassel, Q. Li, J. Yao, R. Huang, J. J. Ireland, P. Coussens y G. W. Smith. 2004. Evidence that cocaine-and amphetamine-regulated transcript is a novel intraovarian regulator of follicular atresia. Endocrinology. 145:5373-5383.
- Kolset, S. O. y H. Tveit. 2008. Serglycin—structure and biology. Cell. Mol. Life. Sci. 65:1073-1085.
- Korpetinou, A., S. S. Skandalis, V. T. Labropoulou, G. Smirlaki, A. Noulas, N. K. Karamanos y A. D. Theocharis. 2013. Serglycin: at the crossroad of inflammation and malignancy. Front. Oncol. 3:1-12.
- Kristensen, P., M. E. Judge, L. Thim, U. Ribel, K. N. Christjansen, B. S. Wulff, J. T. Clausen, P. B. Jensen, O. D. Madsen, N. Vrang, P. J. Larsen y S. Hastrup. 1998. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. Nature. 393:72-76.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, y E. Sonnhammer. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J. Mol. Biol. 305:567-580.
- Kuhar, M. J., L. D. Adams, R. G. Hunter, S. D. Vechia y Y. Smith. 2000. CART peptides. Regul. Peptides. 89:1-6.
- Kulseth, M. A., S. O. Kolset y T. Ranheim. 1999. Stimulation of serglycin and CD44 mRNA expression in endothelial cells exposed to TNF- $\alpha$  and IL-1 $\alpha$ . Biochim. Biophys. Acta. 1428:225-232.
- Lee, Y. S., C. A. VandeVoort, J. P. Gaughan, U. Midic, Z. Obradovic y K. E. Latham. 2011. Extensive effects of *in vitro* oocyte maturation on rhesus monkey cumulus cell transcriptome. Am. J. Physiol. Endocrinol Metab. 301:E196-E209.
- Levoli, E., R. Lindstedt, A. Inforzato, A. Camaioni, F. Palone, A. J. Day, A. Mantovani, G. Salvatori y A. Salustri. 2011. Implication of the oligomeric state of the N-terminal PTX3 domain in cumulus matrix assembly. Matrix Biol. 30:330-337.



- Li, Q., L. J. McKenzie y M.M. Matzuk. 2008. Revisiting oocyte–somatic cell interactions: in search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte developmental competence. *Mol. Hum. Reprod.* 14:673-678.
- Lim, H., B. C. Paria, S. K. Das, J. E. Dinchuk, R. Langenbach, J. M. Trzaskos y S. K. Dey. 1997. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2–deficient mice. *Cell.* 91:197-208.
- Liu, J. y J. Sirois. 1998. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. *Biol. Reprod.* 58:1527-1532.
- Liu, H. y Aoki, F. 2002. Transcriptional activity associated with meiotic competence in fully grown mouse GV oocytes. *Zygote.* 10:327-332.
- Liu, Y. y L. Du. 2015. Role of pancreatic stellate cells and periostin in pancreatic cancer progression. *Tumor Biol.* 1:1-7.
- Livak, K. J. y T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods.* 25: 402-408.
- Lonergan, P., D. Rizos, A. Gutierrez-Adan, T. Fair, y M. P. Boland. 2003. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression–experience from animal studies. *Reprod. Biomed. Online.* 7:657-663.
- Lorenzon-Ojea, A. R., W. Caldeira, A. F. Ribeiro, S. J. Fisher, C. R. Guzzo y E. Bevilacqua. 2014. Stromal cell derived factor-2 (Sdf2): A novel protein expressed in mouse. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 53:262-270.
- Lv, L., F. Jimenez-Krassel, A. Sen, A. Bettgowda, M. Mondal, J. K. Folger, K. B. Lee, J. J. Ireland y G. W. Smith. 2009. Evidence supporting a role for cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CARTPT) in control of granulosa cell estradiol production associated with dominant follicle selection in cattle. *Biol. Reprod.* 81:580-586.
- Magargee, S. F., P. G. Cramer y R. H. Hammerstedt. 2000. Increased *in vitro* binding and fertilizing ability of mouse sperm exposed to a synthetic peptide. *Mol. Reprod. Dev.* 57:406-411.
- Marei, W. F., D. R. E. Abayasekara, D. C. Wathes y A. A. Fouladi-Nashta. 2014. Role of PTGS2-generated PGE 2 during gonadotrophin-induced bovine oocyte maturation and cumulus cell expansion. *Reprod. Biomed. Online.* 28:388-400.
- McIntush, E. W. y M. F. Smith. 1998. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in ovarian function. *Rev. Reprod.* 3:23-30.
- McPherron, A. C. y S. J. Lee. 1993. GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J. Biol. Chem.* 268:3444-3449.



- Meehan, T., S.Schlatt, M. O'Bryan, D. de Kretser y K. Loveland. 2000. Regulation of germ cell and Sertoli cell development by activin, follistatin, and FSH. *Dev. Biol.* 220:225-237.
- Mehlmann, L. 2013. Signaling for meiotic resumption in granulosa cells, cumulus cells, and oocyte. En *Oogenesis*. G. Coticchio, D. F. Albertini y L. De Santis eds. Springer. Kansas, USA.
- Meindl, A., M. Carvalho, K. Herrmann, B. Lorenz, H. Achatz, B. Lorenz, E. Apfelstedt-Sylla, B. Wittwer, M. Ross y T. Meitinger. 1995. A gene (SRPX) encoding a sushi-repeat-containing protein is deleted in patients with X-linked retinitis pigmentosa. *Hum. Mol. Genet.* 4:2339-2346.
- Meredith, B. K., D. P. Berry, F. Kearney, E. K. Finlay, A. G. Fahey, D. G. Bradley y D. J. Lynn. 2013. A genome-wide association study for somatic cell score using the Illumina high-density bovine beadchip identifies several novel QTL potentially related to mastitis susceptibility. *Front. Genet.* 4:1-10.
- Mihm, M., P. J. Baker, L. M. Fleming, A. M. Monteiro y P. L. O'Shaughnessy. 2008. Differentiation of the bovine dominant follicle from the cohort upregulates mRNA expression for new tissue development genes. *Reproduction.* 135:253-265.
- Morelli, M., R.Misaggi, A. Di Cello, V. Zuccala, F. Costanzo, F. Zullo, y B. Quaresima. 2014. Tissue expression and serum levels of periostin during pregnancy: a new biomarker of embryo–endometrial cross talk at implantation. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 175:140-144.
- Nagai, T. 2000. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology.* 55:1291-1301.
- Nothnick, W. B. P. Soloway y T.E. Curry. 1997. Assessment of the role of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) during the periovulatory period in female mice lacking a functional TIMP-1 gene. *Biol. Reprod.* 56:1181-1188.
- Nuttinck, F., P. Reinaud, H. Tricoire, C. Vigneron, N. Peynot, J. P. Mialot, P. Mermillod y G. Charpigny. 2002. Cyclooxygenase-2 is expressed by cumulus cells during oocyte maturation in cattle. *Mol. Reprod. Dev.* 61:93-101.
- Nuttinck, F., L. Gall, S. Ruffini, L. Laffont, L. Clement, P. Reinaud, P. Adenot, B. Grimard, G. Charpigny y B. Marquant-Le Guienne. 2011. PTGS2-related PGE2 affects oocyte MAPK phosphorylation and meiosis progression in cattle: late effects on early embryonic development. *Biol. Reprod.* 84:1248-1257.
- Oksjoki, S., M. Söderström, E. Vuorio, y L. Anttila. 2001. Differential expression patterns of cathepsins B, H, K, L and S in the mouse ovary. *Mol. Hum. Reprod.* 7:27-34.



- Otsuka, F., K. J. McTaavish y S. Shimasaki. 2011. Integral role of *GDF9* and *BMP15* in ovarian function. *Mol. Reprod. Dev.* 78:9-21.
- Palermo, R. 2007. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reprod. Biomed. Online.* 15:326-337
- Palma, G. A., M. E. Argañaz, A. D. Barrera, D. Rodler, A. A. Mutto y F. Sinowatz. 2012. Biology and biotechnology of follicle development. *Sci. World J.* 1:1-14.
- Pangas, S. A., C. J. Jorgez y M. M. Matzuk. 2004. Growth differentiation factor 9 regulate expression of the bone morphogenetic protein antagonist gremlin. *J. Biol. Chem.* 279:32281-32386.
- Paulini, F., R. C. Silva, J. Rôlo, y C. Lucci. 2014. Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. *J. Ovarian Res.* 7:102-114.
- Picton, H., D. Briggs y R. Gosden. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 145:27-37.
- Portela, V. M., M. Machado, J. Buratini, G. Zamberlam, R. L. Amorim, P. Gonclave y C. A. Price. 2010. Expression and function of fibroblast growth factor 18 in the ovarian follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 83:339-346.
- Razza, E. M., M.F. Machado, E.M. Pioltine, L.V. Saura, L.R. Chica, M.F.G. Nogueira. 2013. Expression of genes related to oocyte competence in bovine cumulus-oocyte complexes morphologically divided in different grades. Página 408 en Proceedings of the 27th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE). Praia do Forte, Brazil.
- Rettig, W. J., H. P. Erickson, A. P. Albino y P. Garin-Chesa. 1994. Induction of human tenascin (neuronectin) by growth factors and cytokines: cell type-specific signals and signalling pathways. *J. Cell. Sci.* 107:487-497.
- Ria, R., K. Todoerti, S. Berardi, A. Coluccia, A. De Luisi, M. Mattioli, D. Ronchetti, F. Morabito, A. Guarini, M. Petrucci, F. Dammacco, D. Ribatti, A. Neri y A. Vacca. 2009. Gene expression profiling of bone marrow endothelial cells in patients with multiple myeloma. *Clin. Cancer. Res.* 15:5369-5378.
- Rios, H., S. V. Koushik, H. Wang, J. Wang, H. M. Zhou, A. Lindsley, R. Rogers, Z. Chen, M. Maeda, A. Kruzynska-Freitag, J. Q. Feng y S. J. Conway. 2005. Periostin null mice exhibit dwarfism, incisor enamel defects, and an early-onset periodontal disease-like phenotype. *Mol. Cell. Biol.* 25:11131-11144.
- Rizos, D., F. Ward, P. Duffy, M. P. Boland, y P. Lonergan. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* 61:234-248.



- Robker, R. L., D. L. Russell, L. L. Espey, J. P. Lydon, B. W. O'Malley y J. S. Richards. 2000. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:4689-4694.
- Rodman, T. C. y R. Bachvarova. 1976. RNA synthesis in preovulatory mouse oocytes. *J. Cell. Biol.* 70:251-257.
- Rosewell, K. L., L.Al-Alem, F. Zakerkish, L. McCord L., J. W. Akin, C. L. Chaffin, M. Brännström y T. E. Curry. 2015. Induction of proteinases in the human preovulatory follicle of the menstrual cycle by human chorionic gonadotropin. *Fertil. Steril.* 103:826-833.
- Russell, D. L. y R. L. Robker. 2007. Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex. *Hum. Reprod. Update.* 13:289-312.
- Saika, S., Y. Kawashima, T. Miyamoto, Y. Okada, S. L. Tanaka, S. Ohmi, A. Minamide, O. Yamanaka, Y. Ohnishi, A. Ooshima y A. Yamanaka. 1998. Immunolocalization of prolyl 4-hydroxylase subunits,  $\alpha$ -smooth muscle actin, and extracellular matrix components in human lens capsules with lens implants. *Exp. Eye. Res.* 66:283-294.
- Salustri, A., M. Yanagishita y V. C. Hascall. 1990. Mouse oocytes regulate hyaluronic acid synthesis and mucification by FSH-stimulated cumulus cells. *Dev. Biol.* 138:26-32.
- Salustri, A., C. Garlanda, E. Hirsch, M. De Acetis, A. Maccagno, B. Bottazzi, A. Doni, A. Bastoni, G. Mantovani, P. B. Peccoz, G. Salvatori, D. J. Mahoney, A. J. Day, G. Siracusa, L. Romani y A. Mantovani. 2004. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. *Development.* 131:1577-1586.
- Santos, S. S. D., M. A. P. Ferreira, J. A. Pinto, R. V. Sampaio, A. C. Carvalho, T. V. G. Silva, N. N. Costa, M. S. Cordeiro, M. S. Miranda, H. F. L. Ribeiro y O. M. Ohashi. 2013. Characterization of folliculogenesis and the occurrence of apoptosis in the development of the bovine fetal ovary. *Theriogenology.* 79:344-350.
- SAS. 2006. User's guide: Statistics (versión 9.0). SAS Inst. Inc., Cary, N. C.
- Scarchilli, L., A. Camaioni, B. Bottazzi, V. Negri, A. Doni, L. Deban, A. Bastone, G. Salvatori, A. Mantovani, G. Siracusa y A. Salustri. 2007. PTX3 interacts with inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor implications for hyaluronan organization and cumulus oophorus expansion. *J. Biol. Chem.* 282:30161-30170.
- Shimasaki, S., R. K. Moore, F. Otsuka y G. F. Erickson. 2004. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr. Rev.* 25:72-101.



- Shores, E. M. y M.G. Hunter. 2000. Production of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by pig ovarian cells in vivo and the effect of TIMP-1 on steroidogenesis *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 120:73-81.
- SIAP. 2013. México líder productor agroalimentario. SAGARPA. México, D.F.
- SIAP-SAGARPA. 2012. Bovino producción, precio, valor y peso de ganado en pie. En: <http://www.siap.gob.mx/ganaderia-resumen-estatal-pecuario/> Consultado 1 Mayo 2015.
- SIAP-SAGARPA. 2015. Resumen nacional producción, precio, valor, animales sacrificados y peso. En: <http://www.siap.gob.mx/resumen-nacional-pecuario/>. Consultado 1 Mayo 2015.
- Sidis, Y., T.Fujiwara, L. Leykin, K. Isaacson, T. Toth y A. Schneyer. 1998. Characterization of inhibin/activin subunit, activin receptor, and follistatin messenger ribonucleic acid in human and mouse oocytes: evidence for activin's paracrine signaling from granulosa cells to oocytes. Biol. Reprod. 59:807-812.
- Simon, A. M. y D. A. Goodenough. 1998. Diverse functions of vertebrate GAP junctions. Trends Cell. Biol. 8:477-483.
- Sirard, M. A. y P. Blondin. 1996. Oocyte maturation and IVF in cattle. Anim. Reprod. Sci. 42:417-426.
- Smith, W. L. 1992. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 263:F181-F191.
- Su, Y. Q., K. Sugiura y J. J. Eppig. 2009. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. Semin. Reprod. Med. 27:32-42.
- Sugino, K., T. Nakamura, K. Takio, K. Miyamoto, Y. Hasegawa, M. Igarashi, K. Titani y H. Sugino. 1992. Purification and characterization of high molecular weight forms of inhibin from bovine follicular fluid. Endocrinology. 130:789-796.
- Sugiura, K. Y.Q. Su, F. J. Diaz, S. A. Pangas, S. Sharma, K. Wigglesworth, M. J. O'Brien, M. M. Matzuk, S. Shimasaki y J. J. Eppig. 2008. Oocyte-derived *BMP15* and *FGFs* cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. Development. 134:2593-2603.
- Sugiura, K., Y. Q. Su, Q. Li, K. Wigglesworth, M. Matzuk y J. J. Eppig. 2010. Estrogen promotes the development of mouse cumulus cells in coordination with oocyte-derived *GDF9* and *BMP15*. Mol. Endocrinol. 24:2303-2314.
- Sylvester, S. R., C. Morales, R. Oko y M. D. Griswold. 1989. Sulfated glycoprotein-1 (saposin precursor) in the reproductive tract of the male rat. Biol. Reprod. 41:41-948.





- Tadakuma, H., H. Okamura, M. Kitaoka, K. Iyama y G. Usuku. 1993. Association of immunolocalization of matrix metalloproteinase 1 with ovulation in hCG-treated rabbit ovary. *J. Reprod. Fertil.* 98:503-508.
- Tanaka, K., T. Arao, D. Tamura, K. Aomatsu, K. Furuta, K. Matsumoto, H. Kaneda, K. Kudo, Y. Fujita, H. Kimura, K. Yanagihara, Y. Yamada, I. Okamoto, K. Nakagawa y K. Nishio. 2012. SRPX2 is a novel chondroitin sulfate proteoglycan that is overexpressed in gastrointestinal cancer. *PLoSOne*. 7:e27922-e27922.
- Teixeira, F. L., E. Chada, T. H. Lee, C. S. Suh, M. Matsuri, R. J. Chang, S. Shimasaki y G. F. Erickson. 2002. Aberrant Expression of Growth Differentiation Factor-9 in oocyte of women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:1337-1344.
- Theocharis, A. D., C. Gialeli, P. Bouris, E. Giannopoulou, S. S. Skandalis, A. J. Aletras, R. V. Lozzo y N. K. Karamanos. 2014. Cell-matrix interactions: focus on proteoglycan-proteinase interplay and pharmacological targeting in cancer. *FEBS J.* 281:5023-5042.
- Tiwari, A., I. Schuiki, L. Zhang, E. M. Allister, M. B. Wheeler y A. Volchuk. 2013. SDF2L1 interacts with the ER-associated degradation machinery and retards the degradation of mutant proinsulin in pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Cell. Sci.* 126:1962-1968.
- Tongaonkar, P. y M. E. Selsted. 2009. SDF2L1, a component of the endoplasmic reticulum chaperone complex, differentially interacts with  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\theta$ -defensin propeptides. *J. Biol. Chem.* 284:5602-5609.
- Tremblay, K., C. Vigneault, S. McGraw, G. Morin y M. Sirard. 2006. Identification and characterization of a novel bovine oocyte-specific secreted protein gene. *Gene*. 375:44-53.
- Tucker, R. P. y R. Chiquet-Ehrismann. 2009. Evidence for the evolution of tenascin and fibronectin early in the chordate lineage. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 41:424-434.
- Twigt, J., R. Steegers-Theunissen, K. Bezstarosti y J. Demmers. 2012. Proteomic analysis of the microenvironment of developing oocytes. *Proteomics*. 12:1463-1471.
- Valle, E., S. S. Moore, O. Jann, J. L. Williams, D. H. Crews y B. F. Benkel. 2005. The bovine cocaine and amphetamine-regulated transcript locus: gene characterization and SNP discovery. *Anim. Genet.* 36:74-75.
- Van den Hurk, R. y J. Zhao. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63:1717-1751.
- Varani, S., J. A. Elvin, C. Yan, J. DeMayo, F. J. DeMayo, H. F. Horton, M. C. Byrne y M. M. Matzuk. 2002. Knockout of pentraxin 3, a downstream



target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. *Mol.Endocrinol.* 16:1154-1167.

- Vrang, N., P. J. Larsen, P. Kristensen y M.Tang-Christensen. 2000. Central administration of cocaine-amphetamine-regulated transcript activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology.* 147:794-801.
- Wakayama, T. y R. Yanagimachi. 1998. The first polar body can be used for the production of normal offspring in mice. *Biol. Reprod.* 59:100-104.
- Walton, K. L., Y. Makanji y C. Harrison. 2012. New insights into the mechanisms of activin action and inhibition. *Mol. Cell. Endocrinol.* 359:2-12.
- Wisniewski, H. G., W. H. Burgess, J.D. Oppenheim, y J. Vilcek. 1994. TSG-6, an Arthritis-Associated Hyaluronan Binding Protein, Forms a Stable Complex with the Serum Protein Inter- $\alpha$ -inhibitor. *Biochemistry.* 33: 7423-7429.
- Woodruff, T. K. y L. D. Shea. 2007. The role of the extracellular matrix in ovarian follicle development. *Reprod. Sci.* 14:6-10.
- Yan, C., F. L. Pendola, R. Jacob, A. L. Lau, J. J. Epigg y M. M. Matzuk. 2001. Oosp1 Encodes a novel mouse Oocyte-Secreted Protein. *Genesis.* 31:105-110.
- Yasuda, K., E. Hagiwara, A. Takeuchi, C. Mukai, C. Matsui, A. Sakai y S. Tamotsu. 2005. Changes in the distribution of tenascin and fibronectin in the mouse ovary during folliculogenesis, atresia, corpus luteum formation and luteolysis. *Zool. Sci.* 22:237-245.
- Yoshioka, S., S. Ochsner, D. L. Russell, T. Ujioka, S. Fujii, J. S. Richards y L. L. Espey. 2000. Expression of Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene-6 in the Rat Ovary in Response to an Ovulatory Dose of Gonadotropin 1. *Endocrinology.* 141:4114-4119.
- Zhang, Z., F. Nie, X. Chen, Z. Qin, C. Kang, B. Chen, J. Ma, B. Pan y Y. Ma. 2015. Upregulated periostin promotes angiogenesis in keloids through activation of the ERK 1/2 and focal adhesion kinase pathways, as well as the upregulated expression of VEGF and angiopoietin-1. *Mol. Med. Rep.* 11:857-864.