

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



**ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE PROTEÍNAS DE
SECRECIÓN EN OVOCITO BOVINO**

POR:

M.V.Z. DANIELA ADIANEZ BRISEÑO ANAYA

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

ÁREA MAYOR: REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA ANIMAL



Asociación de la expresión génica de proteínas de secreción en ovocito bovino. Tesis presentada por Daniela Adianez Briseño Anaya como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias, ha sido aprobado y aceptada por:

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

D.Ph. Agustín Corral Luna
Secretario de Investigación y Posgrado

Ph.D Ana Luisa Rentería Monterrubio
Coordinador Académico

D.Ph. María Eduvigis Burrola Barraza
Presidente

31 de enero 2019

Fecha

Comité:
M.C. Beatriz Elena Castro
Valenzuela
Dr. Nelson Guadalupe Aguilar
Palma
Dr. José Alfredo Martínez Quintana

© Derechos Reservados
AUTOR. DANIELA
ADIANEZ BRISEÑO
ANAYA
DIRECCIÓN: PERIFÉRICO
FRANCISCO R. ALMADA
KM. 1, CHIHUAHUA,
CHIH., MÉXICO C.P. 31453
ENERO 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente 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.

A MI FAMILIA: Por el apoyo recibido durante años, por el impulso constante para mi desarrollo personal y académico, así como por compartir conmigo sueños que hoy puedo concluir.

A MI ASESORA: María Eduviges Burrola Barraza, Dra. Por todo el apoyo, tiempo y dedicación brindada en el transcurso de esta investigación, por haberme aportado los conocimientos necesarios para la elaboración de este proyecto.

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.

Finalmente, agradezco infinitamente al CONACYT por la beca no. 624557 que me brindó para mis estudios de maestría, así como el financiamiento al proyecto no. 168981, "Identificación de factores parácrinos 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

A DIOS: Primeramente por darme la vida y permitirme llegar hasta hoy, por la oportunidad que me brinda de superarme cada día.

A MIS PADRES: Isaura Anaya Bustos, infinitas gracias por el apoyo siempre tan oportuno durante toda la carrera. Por tu amor, tus consejos, valores y por la motivación constante para seguir adelante. Por ser además de mi madre, mi mejor amiga y uno de mis mejores ejemplos. **Alberto Briseño Vargas,** ejemplo de constancia, perseverancia, valentía y entrega. Doy gracias a Dios por haberme puesto como padre a un hombre como tú, alguien que siempre me ha dado su confianza, su apoyo y siempre su amor desinteresado. ¡Por su apoyo constante y confianza en mí, los amo, gracias!

A MIS HERMANOS: Alberto Johanán Briseño Anaya, Fernando Misael Briseño Anaya, Liliana Abigail Briseño Anaya; por apoyarme siempre y estar conmigo en todo momento.

A MIS AMIGOS: Karina Sigala, Corina Jacquéz y René Domínguez por compartir buenos, malos y divertidos momentos que siempre llevaré conmigo. También por ser de ayuda durante este proyecto, ¡gracias!

CURRICULUM VITAE

La autora nació el 1 de febrero de 1992 en Tampico, Tamaulipas, México.

2010-2015

Estudios de Licenciatura en la Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia “Dr. Norberto Treviño Zapata”

2017- a la fecha

Maestría en Ciencias en la Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia y Ecología, Chihuahua, México

RESUMEN

ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE PROTEÍNAS DE SECRECIÓN EN OVOCITO BOVINO

POR:

M.V.Z. DANIELA ADIANEZ BRISEÑO ANAYA

Maestría en Ciencias en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: D. Ph. María Eduviges Burrola Barraza

In vitro, el éxito del embrión radica en la calidad del ovocito que le dio origen. Esta calidad, denominada competencia, la obtiene el ovocito durante la foliculogénesis a través de la comunicación bidireccional entre el gameto y las células cumulares. En dicha comunicación el ovocito secreta OSF, que actúan activando procesos celulares y moleculares en las células foliculares, promoviendo el desarrollo de un ovocito competente. Como base Castro Valenzuela (2015) encontró probables OSF (SDF2L1, OOSP1, TNFAIP6, PTGS2, POSTN, P4HA3, PTX3, PSAP, SERPINE2, SRGN, INHBA, SRPX, CTSK), el objetivo del presente trabajo fue analizar la expresión de los genes que codifican para dichos OSF en ovocitos bovinos inmaduros y en metafase II (MII), para establecer redes génicas que permitan proponer nuevos prototipos de cultivo celular para mejorar los ovocitos. Los análisis de PCR en tiempo real indicaron que la expresión de *PTX3*, *INHBA*, *TNFAIP6*, *POSTN*, *CTSK*, *SDF2L1*

y *PTGS2* fue significativamente ($P < 0.05$) mayor en ovocito en metafase II. El ACP demostró que los ovocitos se agruparon en dos regiones según su estadio, donde la mayoría de los genes estuvo desplazada hacia la región de MII. Las redes génicas muestran que los genes se organizan diferente en cada estadio. Concluyendo que la expresión de estos genes cambia durante la transición de ovocito inmaduro a MII, además existe una red con correlaciones positivas, organizada: en ovocito inmaduro, *INHBA*, *PTGS2*, *SDF2L1* y *CTSK* y en ovocito MII, *INHBA*, *TNFAIP6*, *CTSK* y *SDF2L1*. Al involucrarse *INHBA* en las correlaciones positivas, podría pensarse que controla la transición de ovocito inmaduro a MII, por lo que podría ser un candidato para mejorar los procesos de cultivos *in vitro*.

ABSTRACT

ASSOCIATION OF GENE EXPRESSION OF SECRETION PROTEINS IN BOVINE OOCYTE

BY:

DANIELA ADIANEZ BRISEÑO ANAYA

In vitro, the success of the embryo lies in the quality of the oocyte that gave rise to it. This quality, called competence, is obtained by the oocyte during folliculogenesis through bidirectional communication between the gamete and the cumular cells. In this communication the secret oocyte OSFs, which act by activating cellular and molecular processes in follicular cells, promoting the development of a competent oocyte. As a basis Castro Valenzuela (2015) found probable OSF (SDF2L1, OOSP1, TNFAIP6, PTGS2, POSTN, P4HA3, PTX3, PSAP, SERPINE2, SRGN, INHBA, SRPX, CTSK), the objective of this work was to analyze the expression of these genes in both, immature and metaphase II oocytes, to establish gene networks that allow to propose new cell cultures prototypes to improve the oocytes. Real-time PCR analysis indicated that the expression of *PTX3*, *INHBA*, *TNFAIP6*, *POSTN*, *CTSK*, *SDF2L1* and *PTGS2* was significantly ($P < 0.05$) higher in the metaphase II oocyte. The ACP showed that the oocytes were grouped into two regions according to their stage, where most of the genes were displaced towards the MII region. Networks show that genes are organized differently at each stage. Concluding that the expression of these genes was change during the transition from immature oocyte to MII, there is also a network with positive correlations, organized: in immature oocyte, *INHBA*,

PTGS2, *SDF2L1* and *CTSK* and in oocyte MII, *INHBA*, *TNFAIP6*, *CTSK* and *SDF2L1*. By involving *INHBA* in positive correlations, it could be thought that it controls the transition from immature oocyte to MII, so it could be a candidate to improve oocyte culture medium.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Foliculogénesis (gonadotropinas independiente-dependiente).....	4
Competencia el Ovocito.....	9
Comunicación Bidireccional de las CCs y ovocitos.....	10
Uniones GAP y Comunicación por Receptores.....	11
Factores de Secreción del Ovocito (OSFs).....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Obtención de las Muestras.....	16
Maduración de los COCs.....	16
Extracción de ARN.....	18
Curvas de Eficiencia.....	19
PCR en Tiempo Real.....	20
Análisis Estadístico.....	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
Análisis de la Expresión Génica de Factores de Secreción del	

Ovocito.....	23
Análisis de Componentes Principales de Ovocito Inmaduro y Ovocito en MII.....	27
Correlación de Pearson en Ovocito Inmaduro y en Ovocito en MII.....	29
Redes Génicas.....	32
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	41
LITERATURA CITADA.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Medias de expresión génica (\pm error estándar) de transcritos de OSF en el ovocito inmaduro y en ovocito en metafase II.....	24
2	Análisis de componentes principales de transcritos de OSFs en el ovocito inmaduro y ovocito en metafase II.....	28
3	Matriz colorimétrica de correlación de Pearson de transcritos de OSFs en el ovocito inmaduro (color verde hacia el rojo con valores de -1 a 1 respectivamente).....	30
4	Matriz colorimétrica de correlación de Pearson de factores de secreción en el ovocito en metafase II (color verde hacia el rojo con valores de -1 a 1 respectivamente).....	31
5	Red de correlaciones de transcritos de OSFs en el ovocito inmaduro.....	33
6	Red de correlación de transcritos de OSFs en el ovocito en metafase II.....	34
7	Red de correlación de genes significativos en prueba t-Student en ovocito inmaduro.....	36
8	Red de correlación de genes significativos en prueba t-Student en ovocito en metafase II.....	37

INTRODUCCIÓN

El acelerado crecimiento de la población mundial es motivo de preocupación y estudio por parte de personalidades e instituciones en todo el planeta. Junto con esto, también crecen las demandas de una mejor calidad de vida y de una alimentación más abundante y variada, por lo que la innovación tecnológica es la principal herramienta para proveer las soluciones ante esta problemática (FAO, 2012). Dentro del área pecuaria destaca el uso de biotecnologías reproductivas dado el gran potencial de innovación que pueden generar en el ganado bovino (Lonergan, 2003).

El uso de biotecnologías reproductivas en la producción animal puede garantizar suficientes alimentos de alta calidad para toda la población. En las últimas décadas, las biotecnologías modernas de reproducción asistida han experimentado un crecimiento y aplicación económica en la medicina veterinaria (Galli y Lazzari, 2008; Hall *et al.*, 2013). Entre estas biotecnologías destaca la producción de embriones *in vitro* (PIV), que ha permitido aumentar la eficiencia de reproducción en una vaca sin comprometer su vida de producción (Bousquet *et al.*, 1999; Hall *et al.*, 2013). Sin embargo, aunque el uso de la PIV ha beneficiado la producción pecuaria, lo cierto es que no ha habido avances significativos en alcanzar los estándares esperados en el desarrollo del embrión *in vitro*, lo cual queda demostrado por baja eficiencia en la tasa de obtención de blastocistos. Esto indica que existe un estancamiento de 20 años en el manejo *in vitro* de los cultivos embrionarios bovinos, lo cuales producen alrededor de un 40 % blastocistos viables para ser transferidos, cifra que es mucho menor al 80 %

que se obtiene en los sistemas *in vivo* (Nagai, 2000; Rizo *et al.*, 2002b; Gilchrist *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014, Bernal-Ulloa *et al.*, 2016; Pereda-Espinoza *et al.*, 2016).

Así pues, el lograr un medio de cultivo ideal para mimetizar las condiciones *in vivo* en el desarrollo embrionario *in vitro* es el objetivo de muchos grupos de investigación. En concordancia con Lonergan y Fair (2013) el éxito en la formación de un blastocisto recae en la calidad del ovocito empleado al inicio del proceso de fertilización *in vitro* (FIV). Por lo tanto entender cómo es que el ovocito adquiere esta calidad es vital para generar nuevos prototipos de cultivo celular que permitan madurar *in vitro* a los ovocitos de una manera más cercana al microambiente folicular *in vivo*.

La adquisición de la competencia del ovocito está estrechamente relacionada con el desarrollo folicular normal, donde el ovocito juega un papel activo en la regulación de las funciones de las células somáticas circundantes (Matzuk *et al.*, 2002). El ovocito de los mamíferos tiene una estrecha relación con las células somáticas que lo rodean durante su crecimiento y maduración; conformando lo que se denomina complejos ovocitos-células cumulares (COC). Los COC se mantienen comunicados por delicadas conexiones de célula a célula entre las células cumulares y el ovocito, así como por la secreción de factores parácrinos del ovocito (OSF), los cuales al ser reconocidos por un receptor específico desencadenan una señalización en el interior de la célula cumular que culmina con la activación de uno o más genes involucrados en el proceso de maduración para la obtención de competencia de este gameto (Moor *et al.*, 1980;

Assidi *et al.*, 2010). Así que los OSF que actúan en este proceso son piezas claves para desarrollar un embrión sano hasta la etapa de blastocisto. Castro Valenzuela (2015) a través de un análisis bioinformático en 2166 secuencias EST de ovocito bovino, reportó que las proteínas SDF2L1, OOSP1, TNFAIP6, PTGS2, POSTN, P4HA3, PTX3, PSAP, SERPINE2, SRGN, INHBA, SRPX y CTSK cumplen con los requisitos necesarios para ser secretados como OSF. Aunque en este trabajo se encontró que los genes que codifican para dichas proteínas estaban expresadas en ovario fetal y adulto, no se realizó un análisis profundo en las diferentes fases de desarrollo del ovocito. Por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue analizar la expresión de estos genes en ovocitos bovinos inmaduros y en metafase II para mediante la conformación de redes génicas, establecer el patrón de expresión necesario para obtener ovocitos maduros *in vitro*, y con esto determinar nuevos prototipos de cultivo celular compuestos por proteínas recombinantes necesarias para mejorar el medio ambiente *in vitro* de los ovocitos al madurar.

REVISIÓN DE LITERATURA

Foliculogénesis (gonadotropinas independiente-dependiente)

La hembra en todas las especies domésticas y primates tiene una reserva finita de células germinales, que se establecen en la etapa fetal y luego se utilizan durante la foliculogénesis. A pesar de esta gran reserva inicial de folículos, aproximadamente sólo el 1 % de esta población alcanza la fase preovulatoria durante la vida reproductiva, convirtiéndose la mayoría en folículos atrésicos (Santos *et al.*, 2013).

Los ovocitos se originan como células germinales primordiales (CGP) del endodermo del saco vitelino embrionario y migran por movimiento ameboide a través del mesenterio dorsal del intestino posterior a la cresta gonadal (Smitz, 2002) al día 35 de gestación (Erickson, 1966). Las CGP sufren un número limitado de divisiones mitóticas durante la migración y su llegada a la cresta gonadal. Durante el proceso de internalización, las CGP cesan la división mitótica, quedando encerradas en cordones de células germinales, compuestas de células epiteliales que se delimitan de las células mesenquimales (estromales) circundantes por una lámina basal, y se denominan ovogonias (Russe, 1983).

Las ovogonias se localizan en los ovarios, y estos actúan como una sola unidad e influye en el desarrollo folicular principalmente a través de rutas endócrinas sistémicas, que implican ovarios y productos uterinos, las gonadotropinas y sus receptores. Los folículos dominantes y subordinados atraviesan fases crecientes, estáticas y regresivas que tienen características morfológicas y bioquímicas distintas (Adams *et al.*, 2008).

La meiosis de la ovogonia (transición a ovocito primario) comienza por los días 75-80 de la gestación en bovinos y la primera división meiótica no procede más allá de la etapa de paquiteno de la profase I (Erickson, 1966), momento en el que los cromosomas son descondensados y contenidos dentro de la membrana nuclear denominada vesícula germinal (Smitz, 2002). Una sola capa de células epiteliales aplanadas de las células germinales se condensa alrededor de la gran mayoría de los ovocitos supervivientes y los envuelve para formar folículos primordiales (Erickson, 1966 y Russe, 1983). Los ovocitos que no están rodeados por células epiteliales se degeneran. Los folículos primordiales, que consisten en un ovocito y varias células de la granulosa que presentan una forma plana, permanecen latentes durante un período de tiempo variable hasta que se activan para crecer (Smitz, 2002).

La iniciación del crecimiento folicular comienza con la transformación de las células aplanadas de la granulosa del folículo primordial en una sola capa de células cuboidales de la granulosa en un folículo primario, es indicativo de la activación del folículo, y en este punto está encerrado en una lámina basal (Russe, 1983; Braw Tal, 1997).

El ovocito permanece detenido en la etapa diploteno de la profase I de la meiosis a medida que el folículo crece, además, durante el crecimiento del folículo, el ovocito también crece, y en el caso del ratón aumenta su tamaño 300 veces en un período de 2 o 3 semanas. Además, el contenido de ARN aumenta en 300 veces y la síntesis de proteínas en 38 (Russe, 1983). La profase meiótica se compone de varias etapas transitorias: preleptoteno, leptoteno, zigoteno,

paquiteno y el estadio diploteno en el que se detiene la primera división meiótica (Baker y Franchi, 1967). Al llegar a la etapa de diploteno de la meiosis en ganado bovino, que ocurre alrededor del día 170 de la post concepción (Baker y Hunter, 1978), el ovocito se rodea de una sola capa de 4-8 células pre-granulosa y una lámina basal intacta, formando efectivamente la primera categoría del folículo, el folículo primordial en reposo. Se cree que los precursores de las células de la granulosa son de origen mesonéfrico, mesotelial o ambos (Byskov *et al.*, 1977). Los ovocitos encerrados en el folículo primordial forman una reserva finita de ovocitos, que permanecen en la fase de reposo hasta que son estimulados a crecer (Erickson, 1966).

A medida que las células de la granulosa de los folículos primarios se dividen se producen múltiples capas celulares, se forman folículos secundarios o preantrales. Las células de la teca, que se forman a partir de células similares a los fibroblastos en el estroma ovárico, se asocian con los folículos en esta etapa. Las células de la teca y la granulosa sostienen al ovocito y también producen hormonas. Los folículos preantrales finalmente ganan espacio lleno de líquido, y luego se clasifican como folículos antrales (Russe, 1983). 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 endócrina 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 (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).

Antes de la pubertad, los folículos que crecen eventualmente sufren atresia, después de la pubertad, sólo unos pocos folículos continúan creciendo mientras que el resto muere. Tanto el ovocito como las células de la granulosa de los folículos atrésicos sufren apoptosis. En respuesta a la FSH, un ovocito crece más rápido y se convierte en el folículo dominante. El folículo dominante luego produce estrógeno e inhibina, que suprime la secreción de FSH e inhibe el crecimiento de los folículos de mantenimiento, el aumento de LH provoca la reanudación de la meiosis (Baker, 1967; Picton *et al.*, 1998). Después de la oleada de LH ovulatoria, se inicia un programa distintivo de producción de matriz extracelular en el complejo cúmulo-ovocito. Este proceso conocido como expansión cumular o mucificación implica la síntesis de un esqueleto de largas cadenas de oligosacáridos de hialuronano, que están entrecruzadas por un complejo de proteínas de la superficie de unión a hialuronano y proteínas de la matriz extracelular, así como proteoglicanos; los componentes activos de la matriz cumular son sintetizados directamente por las células cumulares bajo el control de factores derivados de ovocitos, secretados por las células de la granulosa mural, o ingresan al folículo en el plasma sanguíneo (Russell *et al.*, 2007). La formación de la matriz del COC antes de la ovulación es importante para la liberación del ovocito y su paso eficiente a través del oviducto y la fertilización (Russell *et al.*, 2007; Adams *et al.*, 2008).

Los ovocitos de folículos antrales de tamaño mediano poseen una competencia de desarrollo baja, pero a medida que los folículos avanzan hacia el tamaño preovulatorio, el ovocito adquiere la maquinaria citoplásmica necesaria para apoyar el desarrollo embrionario y fetal (Sirard *et al.*, 2006). En el momento de la formación del antro, las células de la granulosa (CG) se diferencian en dos linajes anatómicos y funcionalmente distintos: las células de la granulosa murales, que recubren la pared del folículo y que tienen principalmente un papel esteroideogénico; y las células del cúmulo (CC), que forman una asociación íntima de soporte vital con el ovocito. A medida que los folículos se desarrollan para formar grandes folículos preantrales, ganan múltiples capas de células granulosas, una zona pelúcida y una teca interna que contiene el receptor de la hormona luteinizante (LH-R) (Scaramuzi *et al.*, 2011).

Los folículos supervivientes se denominan folículos preovulatorios, y en ellos ocurre un segundo arresto meiótico, ocasionado antes de la ovulación en respuesta a las gonadotropinas donde el ovocito reanuda la meiosis y luego se detiene por segunda vez, en metafase II, hasta la fecundación (Russe, 1983).

Durante el curso de la foliculogénesis, el ovocito adquiere tanto maduración nuclear como citoplasmática, lo que le confiere competencia para someterse a una fertilización y apoyar el desarrollo inicial del embrión, para un posterior crecimiento saludable del embrión implantado a término (Hyttel *et al.*, 1997).

Competencia del Ovocito

La maduración de los ovocitos comienza antes del nacimiento a través de la foliculogénesis, que es un proceso prolongado y complejo durante el cual los ovocitos alcanzan la capacidad de desarrollo. A pesar de que las hembras de los mamíferos poseen 68, 000 células germinales al nacer, sólo un pequeño número de estas células tendrán la posibilidad de desarrollarse para una probable fertilización (Farsi *et al.*, 2013).

La competencia de los ovocitos se define como la capacidad intrínseca para experimentar maduración meiótica, fertilización, desarrollo embrionario y finalmente una gestación exitosa. Por lo tanto, la utilización de ovocitos competentes durante la FIV es crucial para garantizar la obtención de embriones de alta calidad y gestación exitosa. Los parámetros morfológicos del citoplasma, el cuerpo polar y las células cumulares se usan rutinariamente para la selección de ovocitos (Li *et al.*, 2008). La competencia del ovocito se adquiere durante la fase antral de la foliculogénesis a través de procesos moleculares bien coordinados, incluida una maduración nuclear adecuada y una maduración citoplasmática final (Assidi *et al.*, 2010).

Las células del cúmulo (CC) se encuentran más cerca del ovocito proporcionándole nutrientes, así como factores favorables para la maduración y un microambiente óptimo para garantizar un desarrollo exitoso y una mayor competencia (Gilchrist *et al.* 2008). El ovocito desempeña un papel dominante en la regulación de las funciones de las CC y en el mantenimiento del microambiente adecuado para el desarrollo de su competencia (Li *et al.*, 2008).

La calidad de los ovocitos es el factor principal para que los embriones lleguen a la etapa de blastocisto (Paramio, 2010). El ovocito fecundado proporciona ARN, proteínas y maquinaria celular para el desarrollo del cigoto temprano, por lo tanto, la calidad del ovocito predice la calidad del embrión y la tasa de implantación (Twigt *et al.*, 2012).

La capacidad de un ovocito para desarrollar un embrión depende de que tenga suficiente información específica en forma de ARNm o proteínas. Si esta información falta o es insuficiente, pueden surgir defectos en la maduración nuclear o citoplasmática, o en ambos procesos, y así afectar el desarrollo *in vitro* de ovocitos fertilizados (Machatkova *et al.*, 2004).

Comunicación Bidireccional de las CCs y ovocitos

Desde el momento de la formación folicular, a través de la foliculogénesis hasta la ovulación, la organización y el funcionamiento normal del ovario depende mucho de las estrechas interacciones entre las células germinales y las células somáticas circundantes. Los folículos que crecen, apoyan el crecimiento del ovocito, la adquisición de la competencia meiótica y de desarrollo, también las células de la granulosa (CG) tienen papeles claramente establecidos en apoyar el crecimiento (Brower y Schultz, 1982) regulando la progresión de la meiosis (Eppig, 1991) y modulando la actividad transcripcional global en el genoma del ovocito (Eppig, 2002). A su vez el ovocito influye en varios aspectos de desarrollo de las CG, incluyendo proliferación, diferenciación, la producción de la matriz extracelular y de hormonas esteroideas (Gilchrist *et al.*, 2008).

El ovocito y sus células foliculares circundantes conviven en un estrecho sistema de comunicación bidireccional, la cual es mediada por receptores y por uniones membrana-membrana denominadas GAP. Esta comunicación facilita la transferencia de señales así como de nutrientes dentro y fuera del ovocito y entre las células foliculares (Fair, 2003).

Uniones GAP. Las uniones GAP son estructuras especializadas que ocurren en puntos de contacto célula-célula muy cercano; consiste en arreglos de canales intercelulares que permiten el intercambio directo de moléculas pequeñas entre las células (Harris, 2001). Estos canales son estructuras hexaméricas ensambladas a partir de una familia grande de subunidades proteicas llamadas conexinas. La expresión de las conexinas (Cx) en bovinos, parece ser específica de cada etapa, por ejemplo, Cx26 se expresa en ovocitos de folículos primordiales, primario y secundarios y en la granulosa de folículos antrales sanos (Johnson *et al.*, 1999). Cx37 también se expresa en folículos preantrales, pero la expresión disminuye significativamente al inicio de la formación antral. Sin embargo, lo contrario ocurre con Cx43, que está débilmente expresado, en los folículos preantrales, lo que sugiere una regulación diferencial de Cx37 y Cx43 a lo largo de la foliculogénesis. Estudios en ratones (Wright *et al.*, 2001) y cerdos (Itahana *et al.*, 1996) indican que la expresión está asociada con la proliferación de las CG y las diferentes conexinas parecen ser específicas del estado diferenciado de la CG o específica de la etapa de la foliculogénesis.

Factores de Secreción del Ovocito OSFs

En lugar de ser un receptor pasivo de soporte nutricional y señales reguladoras de sus CG compañeras, el ovocito desempeña un papel activo durante la foliculogénesis a través de la secreción de factores parácrinos que mantienen un microambiente apropiado para la adquisición de su capacidad de desarrollo (Gilchrist *et al.*, 2004). El ovocito determina la diferenciación y función de las CG para sus propios fines a través de la secreción local de factores de crecimiento potentes, denominados OSF. Dentro de los OSF mejor estudiados destacan, el factor de diferenciación de crecimiento 9 (GDF9) y la proteína morfogenética ósea 15 (BMP15). Algunos de los procesos importantes que los OSF regulan incluyen la regulación de la proliferación de las CG, la tasa de crecimiento folicular, promoción de la glucólisis en las CC requerida para el metabolismo de los ovocitos y además mejorar la calidad de los ovocitos cuando se usan como aditivos en la maduración *in vitro* (Sudiman *et al.*, 2014; Russell *et al.*, 2016). Gilchrist (2007) destaca que *in vitro* la exposición con GDF9 y BMP15 de los COC durante el proceso de maduración, conduce a un aumento del 50% en la competencia de los ovocitos.

Con todo lo anterior, queda claro que los OSF son de importancia vital para el desarrollo del ovocito y dado al poco conocimiento existente, con la finalidad de identificar nuevos OSF, Castro Valenzuela (2015) realizó un análisis bioinformático sobre 2166 secuencias EST de ovocito bovino reportadas en el NCBI, de las cuales obtuvo que las proteínas SDF2L1, OOSP1, TNFAIP6, PTGS2, POSTN, P4HA3, PTX3, PSAP, SERPINE2, SRGN, INHBA, SRPX,

CTSK, cumplen con los requisitos necesarios para ser secretadas por el ovocito. En ese trabajo se analizó la expresión de los genes que codifican para estas proteínas en diversos tejidos como corazón, pulmón, riñón, hígado, bazo, músculo, testículo adulto, testículo fetal, ovario adulto y ovario fetal. Cabe mencionar que, aunque la expresión de dichos genes fue ubicua en los tejidos evaluados, existieron diferencias en los tejidos de ovario y testículo fetal con respecto a ovario y testículo adulto. Tanto en ovario como testículo fetal, se encontró predominantemente la expresión de los genes *INHBA*, *SDFL1* y *SERPINE2*. Mientras que en ovario y testículo adulto predominaron los genes *PSAP*, *SRGN*, *CTSK*, *TIMP1*, *SRPX*, *POSTN*, *TNC* y *PTX3*. Aunque estos resultados son por demás interesante, hace falta realizar un estudio a profundidad sobre la forma en que estos genes se expresan en las diferentes fases del ovocito, inmaduro y maduro.

La función de algunos de estos probables OSF identificados por Castro Valenzuela (2015) es bien conocida. Tal es PTX3 quien juega un papel clave en la formación de la matriz rica en hialuronano en el COC, requerida para la fertilización exitosa. PTX3 es una proteína multimérica que consta de ocho protómeros idénticos mantenidos juntos por una combinación de interacciones no covalentes y enlaces disulfuro, hallazgos recientes sugieren que el estado oligomérico de PTX3 es importante para estabilizar la matriz cumular, ya que se une a las cadenas pesadas de inhibidor de la alfa-tripsina ($\alpha 1$) y TNFAIP6, la cual es esencial para la formación de la matriz cumular y permite la interacción con hialuronano; manteniendo así una estructura expandida del COC, lo que es

esencial para la liberación del ovocito durante la ovulación (Levoli *et al.*, 2011; Levoli *et al.*, 2011;. Salustri *et al.*, 2004 y Russell *et al.*, 2007).

El producto de TNFAIP6 es una glicoproteína de aproximadamente 37 kDa, cuya síntesis depende del estímulo de la LH. Como se mencionó arriba es capaz de unirse específicamente a hialuronano y puede formar un complejo con Ial, actuando como un estabilizador de matriz extracelular (Fülöp *et al.*, 2003; Carrette *et al.*, 2001).

El gen *INHBA* codifica la subunidad βA que está involucrada en la formación de tres tipos de proteínas activina A, activina AB e inhibina A; todas son glicoproteínas unidas a disulfuro que pertenecen a la superfamilia TGF- β (Sidis *et al.*, 1998). La combinación de dos subunidades βA forman el homodímero activina A, y la combinación de la subunidad βA con las subunidades βB o βC forman los heterodímeros activina AB y la inhibina A, respectivamente. Las activinas y las inhibinas son conocidas principalmente por su función antagónica, las activinas estimulan la liberación de FSH desde la hipófisis anterior, mientras que las inhibinas suprimen la secreción de FSH. Además, las activinas tienen varios roles intraováricos que incluyen la supervivencia de células germinales y el ensamblaje del folículo primordial; crecimiento del folículo desde la etapa preantral hasta la antral media; supresión de la producción de andrógenos de las células de la sangre; promoción de la proliferación de células granulosas, expresión de *FSHR* y *CYP19A1*; mejora de la competencia en el desarrollo de ovocitos; retraso de la luteinización y/o atresia folicular y participación en la luteólisis (Kretser *et al.*, 2002).

Al igual que las gonadotropinas, las prostaglandinas median sus acciones a través de sus receptores de superficie celular acoplados a proteína G, la activación del receptor PTGER2 da como resultado la estimulación de la adenil ciclasa y el aumento de cAMP intracelular (Marei *et al.*, 2013), la prostaglandina E2 (PGE2) es derivada de la actividad de prostaglandina G / H sintasa2 (PTGS2), que es un factor de supervivencia. La expresión de PTGS2 en el cúmulo y la producción de PGE2 son fundamentales para la expansión exitosa del cúmulo y los procesos de maduración de los ovocitos (Nuttinck *et al.*, 2011).

Las catepsinas (CTSK) se sintetizan como (pre) proenzimas, que se procesan en enzimas proteolíticas catalíticamente activas (Oksjoki *et al.*, 2001), las catepsinas, junto con las metaloproteinasas de matriz (MMP), desempeñan un papel activo en la degradación de la matriz extracelular, por lo que se cree que juega un papel importante en la función ovárica como en la diferenciación de las células germinales en folículos primordiales, su posterior crecimiento en folículos ovulatorios funcionales y su ruptura (Oksjoki *et al.*, 1999). Oksjoki *et al.* (2001) detectaron en ratón que CTSK está presente en la teca externa, en epitelio germinal y en el ovocito del folículo primordial y primario, así como en CG, de la teca y ovocito del folículo secundario y antral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las Muestras

Para la obtención 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. 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 complejos ovocitos-células cumulares (COC) 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. Al término de la aspiración, se permitió sedimentar la pastilla celular obtenida, para posteriormente seleccionar los ovocitos con más de 3 capas de CCs no expandidas y citoplasma homogéneamente granuloso para MIV.

Maduración de los COC

Los COC seleccionados se colocaron en el medio de manejo H-CDM con la finalidad de enjuagarlos y retirar cualquier remanente celular externo al COC. Después, para madurar, los COC obtenidos se agruparon y se colocaron en cajas de 4 pozos. Cada pozo contenía 50 COCs y 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/µl de factor de crecimiento epidermal (EGF marca SIGMA) y 0.1 mM de cisteamina. Posteriormente se incubaron a 38.5 °C con 5 % de CO₂ durante 23 h. Transcurrido este tiempo, se retiraron las CC de los presuntos ovocitos maduros mediante vórtex, luego se colocaron en amortiguador fosfato-salino (PBS) en una caja Petri donde los ovocitos se observaron al microscopio para cerciorarse de la presencia de un cuerpo polar, lo que indica que la primera meiosis ha concluido, es decir, que 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 ovocitos maduros obtenidos (dos repeticiones de 200 ovocitos maduros con cuerpo polar) cada repetición se colocó en 40 µl de “RNA Later™” (Applied Biosystems) a -20 °C hasta la extracción de ARN total. Además de las células mencionadas, se utilizaron ovocitos inmaduros. Estos se obtuvieron seguida la aspiración, se seleccionaron los ovocitos con más de tres capas de CC no expandidas y citoplasma homogéneamente granulado, estos ovocitos también fueron desprovistos de la zona pelúcida de igual forma, posteriormente se separaron las CC del ovocito, mediante vórtex y de igual manera los ovocitos (dos repeticiones de 200 ovocitos inmaduros) fueron colocados en 40 µl de “RNA Later™ (Applied Biosystems)” a -20 °C hasta la extracción de ARN total.

Extracción de ARN y Síntesis de ADNc

La extracción de ARN total se realizó utilizando el “kit *mirVana*[™] miRNA Isolation Kit, with phenol” (Thermo Fisher Cientific) siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, se colocaron las muestras en hielo para descongelar, éstas se encontraban en un tubo de 1.5 mL, el lisado inicial debe ser de 30 µl debido a la capacidad de la unidad de filtración, por lo cual fue necesario remover “RNA Later” y adicionar 300 µl de solución “Lysis/Binding” por 100 o 10⁷ células, posterior a ello se dio vórtex para obtener un lisado homogéneo y se adicionó 1/10 (30 µl) volumen de “miRNA homogenate additive” para luego mezclar mediante vórtex. La solución se colocó sobre hielo durante 10 min, posterior a este tiempo se añadió un volumen de cloroformo-fenol ácido y nuevamente se dio vórtex durante 30-60 segundos, pasado este tiempo los tubos centrifugaron durante 5 min a 10,000 RFC (máxima velocidad) a temperatura ambiente (30 °C), esto para separar la fase acuosa de la orgánica, cuidadosamente se removió la fase acuosa (arriba) sin destruir la fase inferior y se transfirió a un nuevo tubo. Al volumen removido se le adicionó 1.25 volúmenes de etanol grado biología molecular al 100% a temperatura ambiente, se colocó una columna en un tubo de colección, se mezcló la muestra con etanol y se colocó dentro de la columna. Posteriormente luego de centrifugar 15 segundos a 10000 RFC a 30 °C se decantó el filtrado y se repitió hasta filtrar toda la mezcla. La columna se lavó con 700 µl de “miRNA wash solution” 1, se centrifugó durante 5-10 segundos y se decantó el filtrado, posteriormente se adicionaron 500 µl de solución de lavado 2/3, de igual manera se centrifugó y se hizo una repetición de este lavado,

después de decantar el filtrado se colocó la columna y se centrifugó una vez más durante 2 minutos para remover el fluido residual. Finalmente la columna se transfirió a un nuevo tubo de colección y se adicionaron 50 µl de solución de elución precalentada a 60 ° C y se centrifugó durante 15 segundos a máxima velocidad para recuperar el ARN total. La concentración del ARN extraído fue determinada a través del Espectrofotómetro NanoDrop (ThermoScientific). La pureza de este ácido nucleico se determinó calculando la relación de absorbancia entre 260 y 280 nm. Se realizó electroforesis para observar la integridad del ARN en un gel de agarosa al 2% con agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC). El ARN obtenido se almacenó a - 80 °C hasta la síntesis de ADNc. La síntesis de ADNc se realizó utilizando el “kit High-Capacity RNA-to cDNA” (Applied Biosystems), siguiendo las indicaciones del fabricante, para lo cual se realizó una mezcla con 50 ng de ARN, 10 µl del amortiguador 2X RT, 1 µL de la enzima 20X RT y 8 µL de agua libre de nucleasas. Las reacciones se colocaron en un termociclador CORBETT bajo el siguiente programa: temperatura de 37 °C durante 60 min, seguida de la temperatura para la desactivación de la enzima, 5 min a 95 °C y por último se conservó el sistema a 4 °C. El ADNc se almacenó a - 20 °C hasta su posterior uso.

Curvas de Eficiencia

La eficiencia de la PCR es particularmente importante cuando se informan concentraciones de ARNm para genes diana en relación con los genes de referencia. En este experimento se utilizó el gen gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) como gen de referencia. Para que el gen de interés

sea comparable con el gen de referencia, estos deben amplificar con las mismas eficiencias, por lo cual se realizaron PCR en tiempo real para obtener las curvas estándar.

Las muestras (ovario y CG) utilizadas para realizar las curvas estándar fueron independientes a las del estudio, se realizaron diluciones 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 del ADNc de la muestra, en la reacción se adicionó 1 µl de ADNc, 8 µl de agua libre de nucleasas, 10 µl de “TaqMan Universal Master Mix II” y 1 µl de “TaqMan Gene Expression Assays”, esto para cada uno de los genes de interés, una buena reacción debe tener una eficiencia entre 90 % y 110 %, que corresponde a una pendiente de entre - 3.58 y - 3.10 (Bustin *et al.* 2009). Una vez obtenidas las curvas estándar fue posible realizar la PCR en tiempo real para la cuantificación de la expresión de cada gen de interés.

PCR en Tiempo Real

Todas las reacciones se realizaron en el equipo “7500 Real-Time PCR System” (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 de referencia *GAPDH*. Se realizaron cuatro réplicas técnicas para cada ensayo, las reacciones se llevaron a cabo conforme las condiciones del fabricante. En la preparación de la reacción se adicionó 1 µl de ADNc, 8 µl de agua libre de nucleasas, 10 µl de “TaqMan Universal Master Mix II” y 1 µl de “TaqMan Gene Expression Assays”. Las sondas tipo “TaqMan” que se utilizaron

amplificaron los genes correspondientes a las proteínas identificadas como secretoras por Castro-Valenzuela *et al.* en 2018 (*SDF2L1*, *OOSP1*, *TNFAIP6*, *PTGS2*, *POSTN*, *P4HA3*, *PTX3*, *PSAP*, *SERPINE2*, *SRGN*, *INHBA*, *SRPX*, *CTSK*). La cuantificación de la expresión de estos genes se normalizó tomando como referencia la amplificación del gen de referencia.

Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos cuantitativos se trabajó con dos repeticiones de 200 células por cada muestra de ovocito inmaduro y maduro. Para cada caso, se realizó una base de datos en el programa Microsoft EXCEL en donde se calculó los valores relativos de expresión génica mediante el método $2^{-\Delta CT}$ sugerido por Livak y Schmittgen (2001). Los valores relativos de expresión génica fueron transformados a valores Z para cumplir el supuesto de normalidad, mismo que fue evaluado mediante la prueba Shapiro Wilks. Con la finalidad de conocer si había diferencias significativas entre las medias de expresión génica de cada tipo de muestra se llevó a cabo una prueba t-Student para muestras relacionadas, el valor de significancia exigido fue de $P < 0.05$; utilizando el programa SAS (Versión 9.0; SAS Institute, Inc., 2006). La correlación de Pearson fue obtenida con el programa Correlation Calculator Version 1.0.1. Con la intención de analizar la relación entre el estadio del ovocito inmaduro y el estadio de ovocitos en MII, se realizó un análisis de componentes principales (ACP), utilizando la correlación de Pearson, donde se rotaron los componentes principales (PC) con el método Equamax y se mostró el resultado en un gráfico biplot. El análisis de componentes principales (ACP) se realizó con la versión XLSTAT BASE.

Mediante el algoritmo de Metscape (Basu *et al.*, 2017) las asociaciones entre los genes fueron visualizados como una matriz colorimétrica (heat map) compuesta de un espectro de color que va del verde hacia el rojo con valores de correlación del -1 a 1, respectivamente. Estos datos también fueron analizados como un agrupamiento jerárquico y con ellos se generó una de red de genes utilizando la aplicación MetScape del programa Cytoscape 3.4 (Su *et al.*, 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de la Expresión Génica de Factores de Secreción en el Ovocito

Tomando como base los resultados obtenidos por Castro Valenzuela en 2015, se procedió a analizar la expresión de los genes *SDF2L1*, *OOSP1*, *TNFAIP6*, *PTGS2*, *POSTN*, *P4HA3*, *PTX3*, *PSAP*, *SERPINE2*, *SRGN*, *INHBA*, *SRPX* y *CTSK*; en ovocitos en estadio inmaduro y ovocito en metafase II. En la Figura 1 se muestran las medias de expresión de cada gen en ambas condiciones, donde a simple vista el gen *P4HA3* sobresale del resto debido a su elevada expresión en la condición de ovocito en metafase II comparado con el estadio inmaduro (6.1 ± 0.7 vs 0.51 ± 0.03 medias de $2^{-\Delta CT} \pm$ error estándar, respectivamente; $P > 0.05$). Sin embargo tras el análisis estadístico realizado mediante la prueba t-Student, se observó que no existen diferencias significativas entre ambos estadios. Esto llama mucho la atención debido a la enorme diferencia que existe entre las medias obtenidas en los dos estadios. Esta discrepancia pudo deberse a que los datos obtenidos en cada replica técnica fueron distintos, lo que indica la variabilidad en el ensayo y por ende la ausencia de diferencia estadística; por lo que sería necesario repetir de nuevo los ensayos de tiempo real. Dado estos inconvenientes, los datos obtenidos en relación a la expresión del gen *P4HA3* no fueron confiables y debido a esto no se tomaron en cuenta para realizar las correlaciones genéticas tanto el ovocito inmaduro como en ovocito en metafase II.

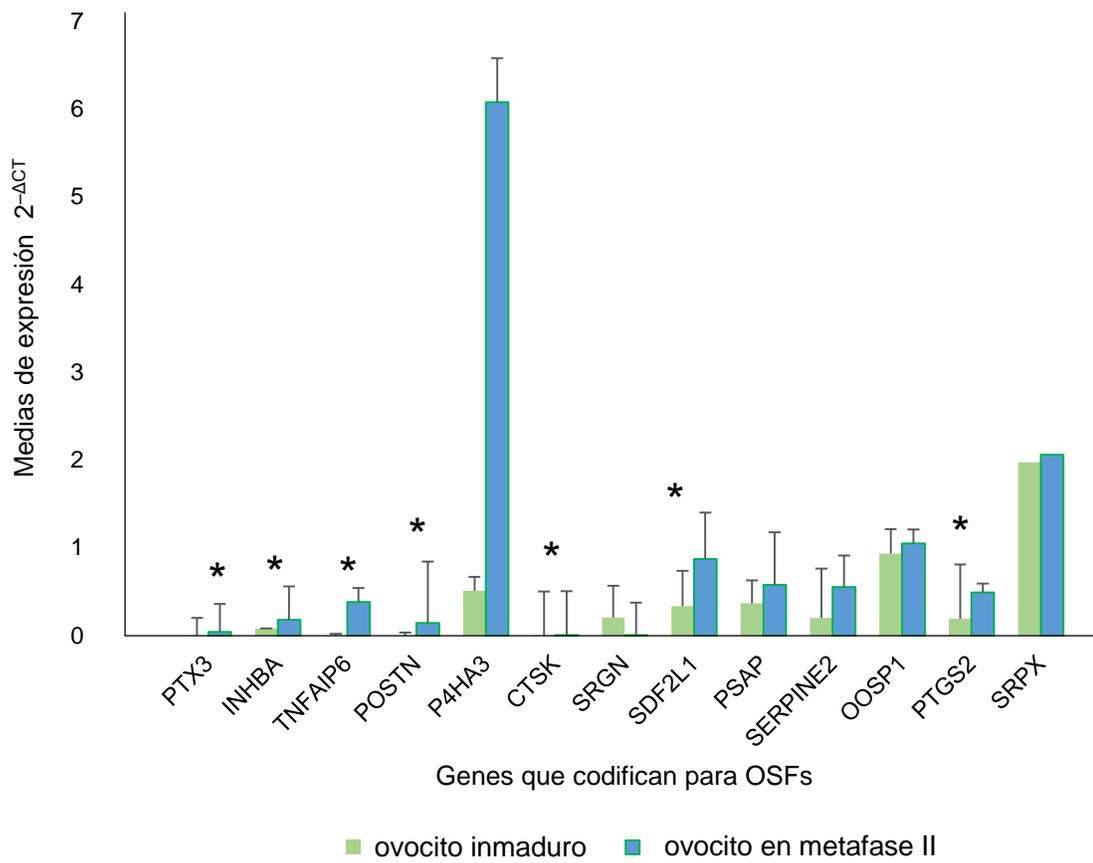


Figura 1. Medias de expresión génica (\pm error estándar) de los transcritos de OSFs en el ovocito inmaduro y en ovocito en metafase II.
 *($P < 0.05$)

Por otro lado la expresión de los genes *PTX3*, *INHBA*, *TNFAIP6*, *POSTN*, *CTSK*, *SDF2L1* y *PTGS2* fue significativamente ($P < 0.05$) mayor en ovocito en metafase II (0.042 ± 0.23 , 0.18 ± 0.32 , 0.39 ± 0.38 , 0.14 ± 0.16 , 0.006 ± 0.16 , $0.87 \pm 0.5 \pm 0.16$ medias de $2^{-\Delta CT} \pm$ error estándar, respectivamente), que en ovocito inmaduro (0.001 ± 0.02 , 0.08 ± 0.2 , 0.0014 ± 0.002 , 0.0035 ± 0.02 , 0.0012 ± 0.16 , 0.34 ± 0.36 , 0.2 ± 0.28 medias de $2^{-\Delta CT} \pm$ error estándar, respectivamente).

Su *et al.*, (2007) reportaron que en ratones durante la transición de la vesícula germinal (GV) a la fase metafase II, la expresión de *PTX3* y *TNFAIP6* se expresan en células de cúmulos expandidos y no en ovocitos. Lo que es claramente diferente a lo que se obtuvo en este trabajo, ya que la expresión de estos genes se observó en los dos estadios del ovocito. Esto implica, dado que no hay reportes al respecto, que en el modelo bovino el patrón de expresión de estos genes es diferente al reportado en modelo de ratón. Tanto *PTX3* como *TNFAIP6* participan en la formación de la matriz extracelular (Carrette *et al.*, 2001; Fülöp *et al.*, 2003; Levoli *et al.*, 2011), la cual es requerida para la formación del folículo antral y su posterior luteinización. Salustri *et al.*, en el 2004 demostraron que los ratones hembra que carecen de *PTX3* no ensamblan correctamente la matriz del cúmulo, y en consecuencia, los ovocitos no se fecundan. En nuestro estudio *PTX3* y *TNFAIP6* se expresan más en ovocito en metafase II que en inmaduro, lo que indica que el ovocito participa activamente en la conformación de la matriz extracelular necesaria para la expansión de las CC y brindando espacio para su fecundación.

La diferenciación de células germinales hacia folículos primordiales y su posterior crecimiento en un folículo ovulatorio funcional que llegue a la ruptura y a la formación del cuerpo lúteo, requieren de una reorganización de la matriz extracelular. Oksjoki *et al.*, (2001) demostraron en ratón, que la presencia de ARNm de *CTSK* se encuentra sólo en el ovocito dentro de folículos primordiales y primarios, y a partir del folículos secundarios hasta antrales la señal se muestra positiva, además de en ovocito también en las células cumulares. En este estudio aunque *CTSK* fue significativamente mayor en ovocito en metafase II, la expresión también se da en ovocito inmaduro.

Gilbert *et al.*, (2012) demostraron que aquellos ovocitos que alcanzan la competencia se relacionan con una elevada expresión del gen *INHBA*, lo que coincide con nuestros resultados. Asou *et al.*, (2006) identificaron los transcriptomas expresados diferencialmente entre ovocito maduro e inmaduro y en células cumulares, encontró que *INHBA* se encuentra expresadas 5 y 34 veces más en las CC que en ovocitos, respectivamente. En el presente estudio sólo se analizó la expresión en ovocitos maduros e inmaduros, valdría la pena ver como es el comportamiento de este gen en las CC. Además Ireland *et al.*, (2009) demostraron que la expresión de *INHBA* se altera significativamente más durante la maduración de los ovocitos bovinos.

McKenzie *et al.* en el 2004, al correlacionar los niveles de expresión de *PTGS2* en ovocitos humanos contra el estadio de madurez, observaron que los niveles de expresión del gen aumentaron después de la reanudación de la meiosis. Calder *et al.* (2001) examinaron también la expresión de *PTGS2* y el

ARNm del receptor de prostaglandina en COC bovinos, y encontraron que la expresión de *PTGS2* depende del tiempo de maduración y de la calidad de los ovocitos. Marei *et al.*, (2013) estudiaron la dinámica de la expresión del gen *PTGS2* durante la maduración de los ovocitos y tuvieron como resultado que este gen aumentó a las 6 h para alcanzar concentraciones máximas a las 12 h después de la incubación en medios de maduración que contenían gonadotropinas, coincidiendo en nuestro estudio donde *PTGS2* es mayormente expresado en ovocito en metafase II provenientes de un proceso de maduración *in vitro*.

Componentes Principales de Ovocito Inmaduro y Ovocito en MII

El análisis de componentes principales (ACP) distribuyó la mayoría de la varianza en dos componentes principales como se muestra en la Figura 2, donde el componente principal uno absorbe el 53.68% de la varianza, mientras que el componente principal dos absorbió el 17.82%, obteniendo en conjunto un 71.5%, lo que implica que se tiene suficiente información para interpretar los aspectos más importantes de la distribución génica de los OSF evaluados en ovocito inmaduro y en ovocito en metafase II. Como puede observarse los ovocitos se agruparon en dos regiones según su estadio, donde la mayoría de los genes estuvo desplazada hacia la región de MII. La maduración nuclear del ovocito sucede cuando se reanuda la meiosis desde profase I a la metafase II, con el primer cuerpo polar extruido. Tanto, *in vivo* como *in vitro*, este proceso se activa mediante las acciones de FSH y LH (Dumesic, *et al.*, 2015). La agrupación de la mayoría de los genes hacia la región de MII, puede atribuirse a que el ovocito en

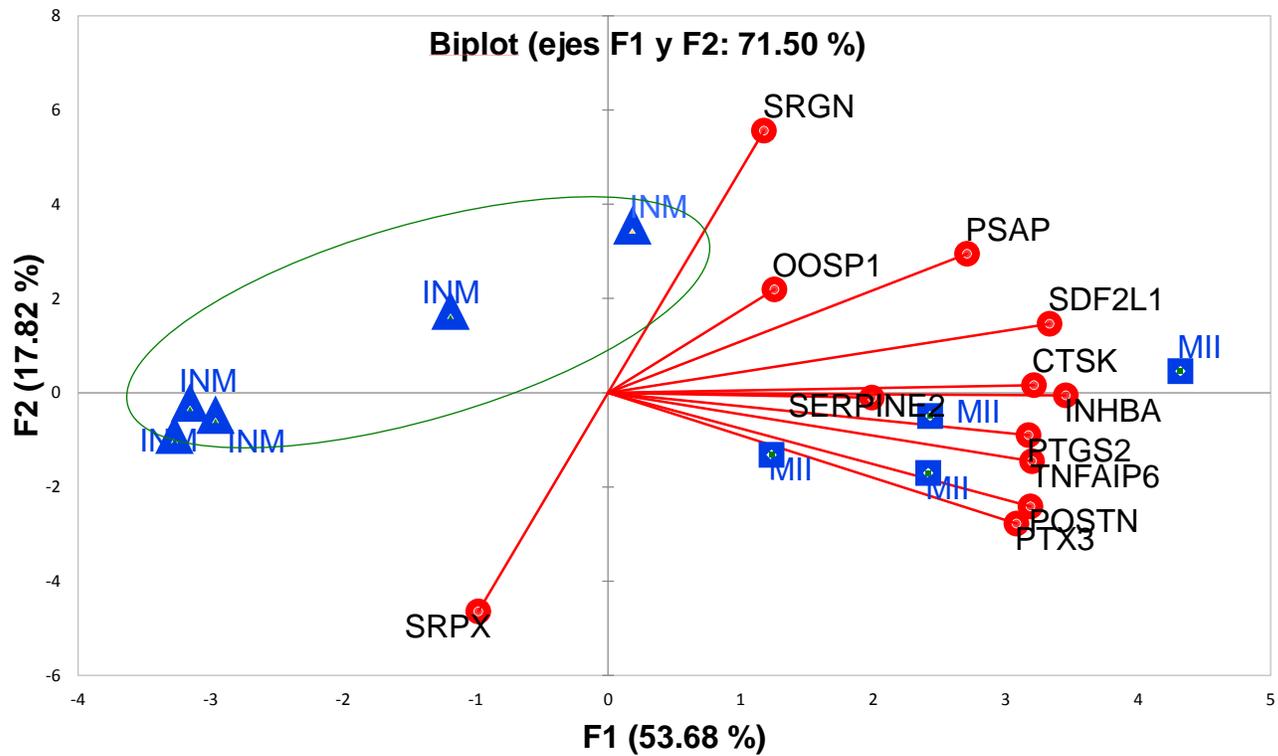


Figura 2. Análisis de componentes principales de los transcritos de OSFs en el ovocito inmaduro y ovocito en metafase II.

este estadio requiere contar con lo necesario, proteínas y ARNm, que le permitan cumplir con el desarrollo posterior a su fertilización. La capacidad de lograr dicho desarrollo, es a lo que se conoce como competencia del ovocito, por lo que éxito de la maduración final de los ovocitos es un proceso complicado que implica diversos factores, tales como calidad intrínseca, el diálogo con el compartimento somático vecino y las uniones GAP (Assidi *et al.*, 2010), también los ovocitos determinan la diferenciación y función de las células del cúmulo para sus propios fines, a través de la secreción local de factores denominados OSF (Russell *et al.*, 2016).

Correlación de Pearson en Ovocito Inmaduro y Ovocito en MII

Tanto para los ovocitos inmaduros (Figura 3) como para el ovocito en metafase II (Figura 4), se obtuvo una matriz de correlación de Pearson colorimétrica (heatmap), donde se demuestra el grado de correlación de un gen con respecto a otro, siendo verde una correlación negativa mientras que la tendencia al rojo demuestra correlación positiva. En la Figura 3 se puede observar el agrupamiento jerárquico en el estadio de ovocito inmaduro, donde la expresión génica se organizó en dos clados, clado A y clado B. El clado A, agrupó en A.1 a los genes *SRGN*, *SDF2L1*, *PSAP* y *CTSK*; mientras que la rama A.2 agrupó a *SERPINE2*, *INHBA*, *PTGS2* y *OOSP1*. El clado B agrupó, en la rama B.1 sólo al gen *TNFAIP6*, mientras que en B.2 agrupó *POSTN*, *PTX3* y *SRPX*. Por su parte en el ovocito en metafase II, la expresión génica se organizó en 2 clados, el clado A con A.1 que incluye los genes *CTSK*, *TNFAIP6*, *INHBA* y *SRGN*; y A.2 que agrupó *PSAP*, *SDF2L1*, *POSTN* y *PTX3*; y el clado B agrupó a

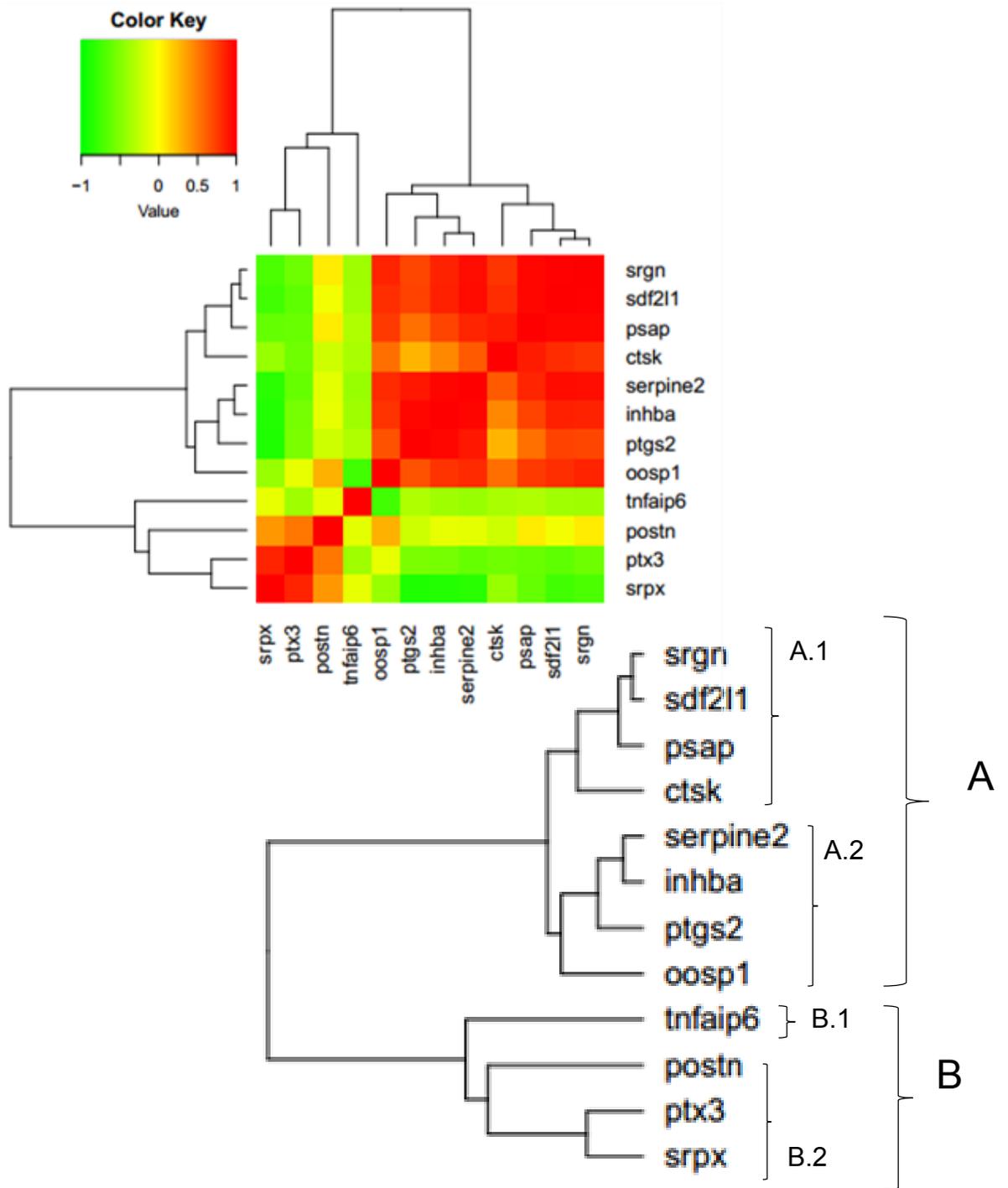


Figura 3. Matriz colorimétrica de correlación de Pearson de los transcritos de OSFs en el ovocito inmaduro (color verde hacia el rojo con valores -1 a 1, respectivamente).

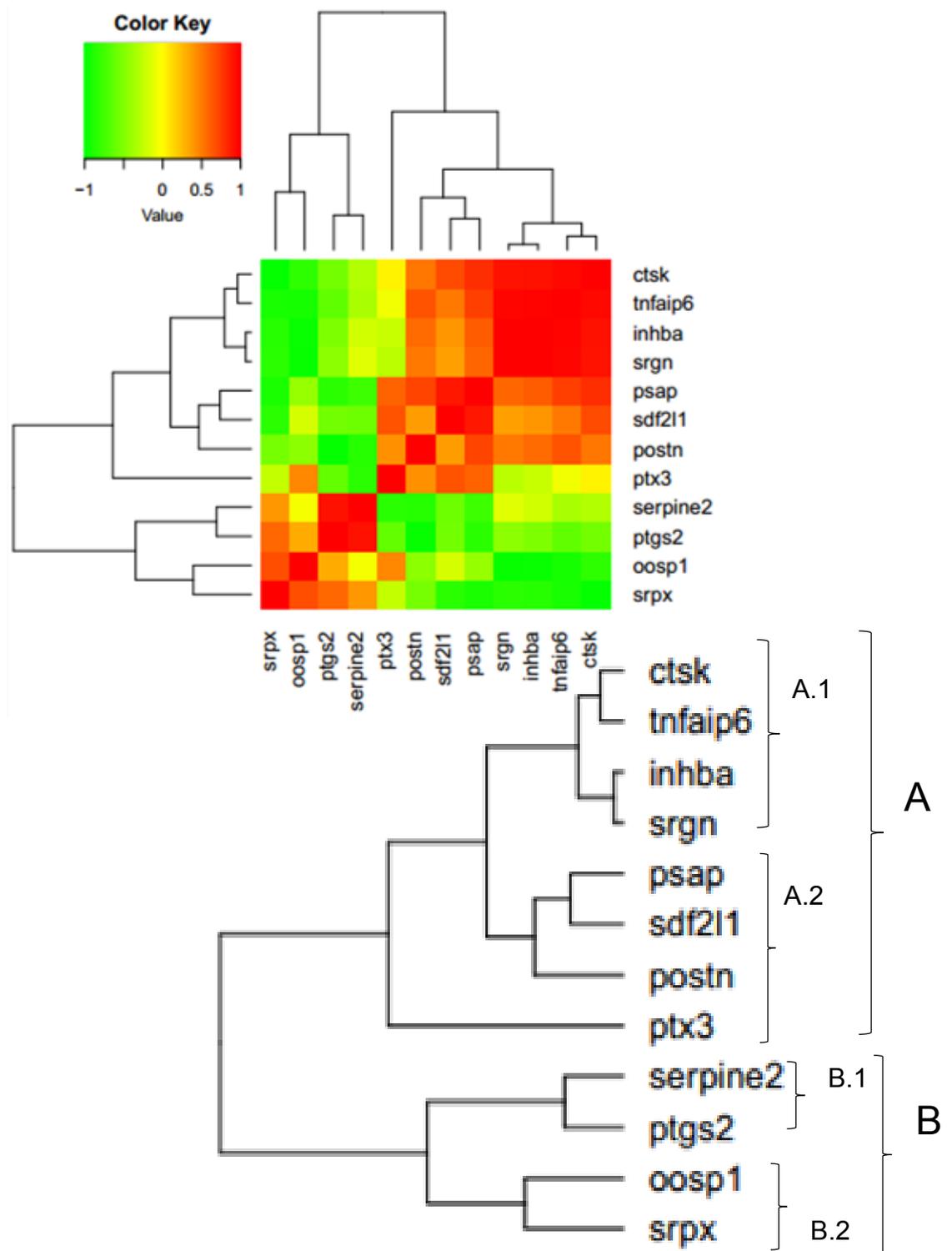


Figura 4. Matriz colorimétrica de correlación de Pearson de los transcritos de OSFs en el ovocito en metafase II (color verde hacia el rojo con valores -1 a 1, respectivamente).

B.1 con *SERPINE2* y *PTGS2* y en B.2 a *OOSP1* y *SRPX* (Figura 4). Al comparar los dos agrupamientos jerárquicos se puede observar claramente que la expresión génica de los genes evaluados, se organiza de manera diferente en cada estadio.

Si bien se mantienen los dos clados A y B, los genes cambian de posición por ejemplo el gen *INHBA* en estadio inmaduro se encuentra dentro de la rama A.2 al mismo nivel que el gen *SERPINE2*; en contra parte en el estadio de metafase II, *INHBA* se coloca en el clado A.1 junto con el gen *SRGN*. Estos resultados muestran que el patrón génico de expresión de los genes evaluados actúa de manera estadio específico.

Redes Génicas

Para determinar el grado de correlación positiva y/o negativa dentro de los genes, en los diferentes estadios del ovocito, de acuerdo con el agrupamiento jerárquico en la Figura 3 y 4, se realizó una red de genes tanto para el estadio de ovocito inmaduro (Figura 5), como para el ovocito en MII (Figura 6).

En ovocito inmaduro se obtuvo una fuerte correlación positiva entre los genes *SRGN*, *SDF2L1*, *PSAP* y *PTGS2*, *INHBA* y *SERPINE2*, y una marcada correlación negativa entre los genes *SRPX*, *PTGS2*, *INHBA* y *SERPINE2*, así como en los genes *TNFAIP6* con *OOSP1*. En el ovocito en MII se obtuvo una fuerte correlación positiva entre los genes *SRGN*, *INHBA*, *TNFAIP6* y *TNFAIP6* con *CTSK*, por el contrario la correlación negativa en el mismo estadio fue entre los genes *POSTN* con *PTGS2*, *SRPX* con *CTSK* y *SRGN* con *INHBA* y *OOSP1*. Si bien este análisis mostró un panorama general de la correlación de los genes

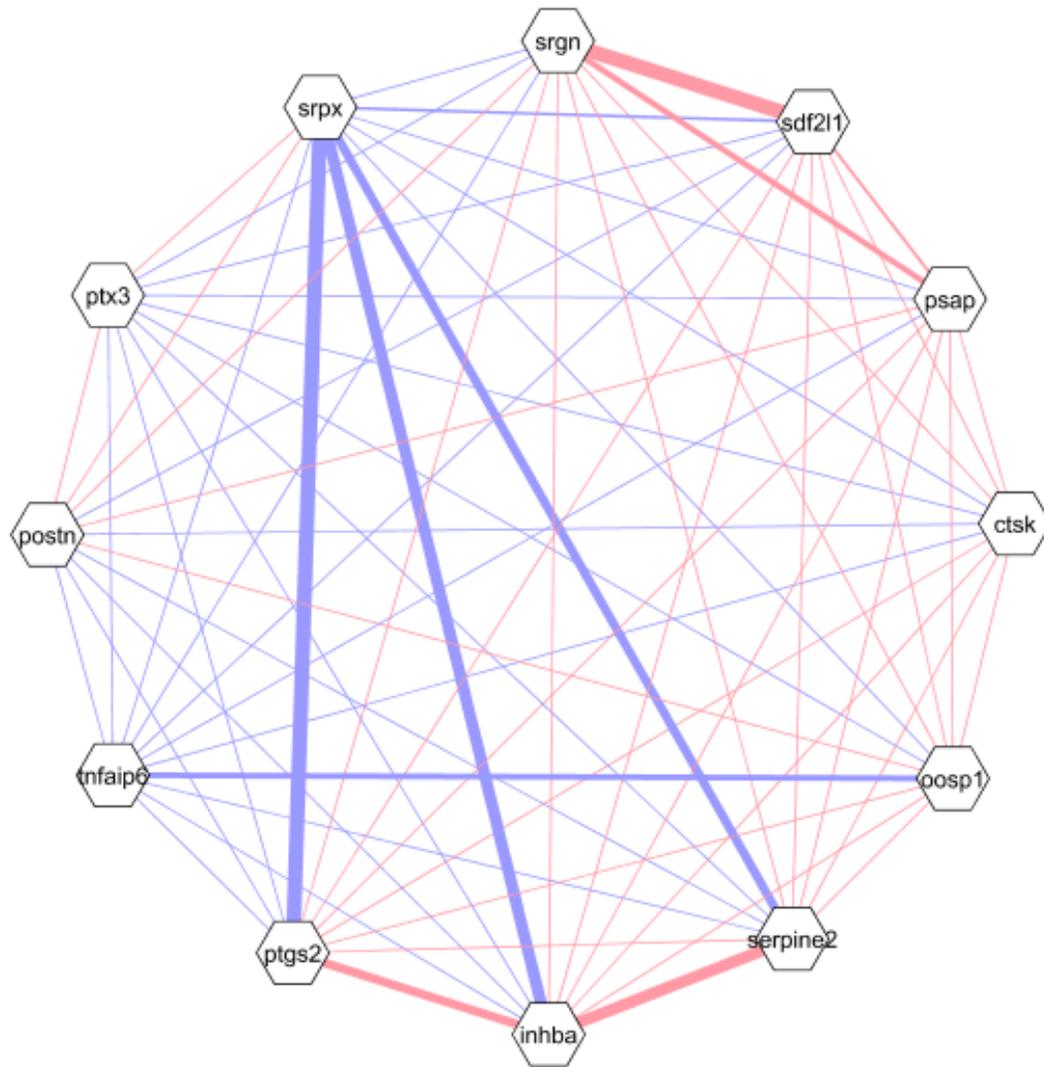


Figura 5. Red de correlaciones de transcritos de OSFs en el ovocito inmaduro (en color azul negativa, rosa positiva).

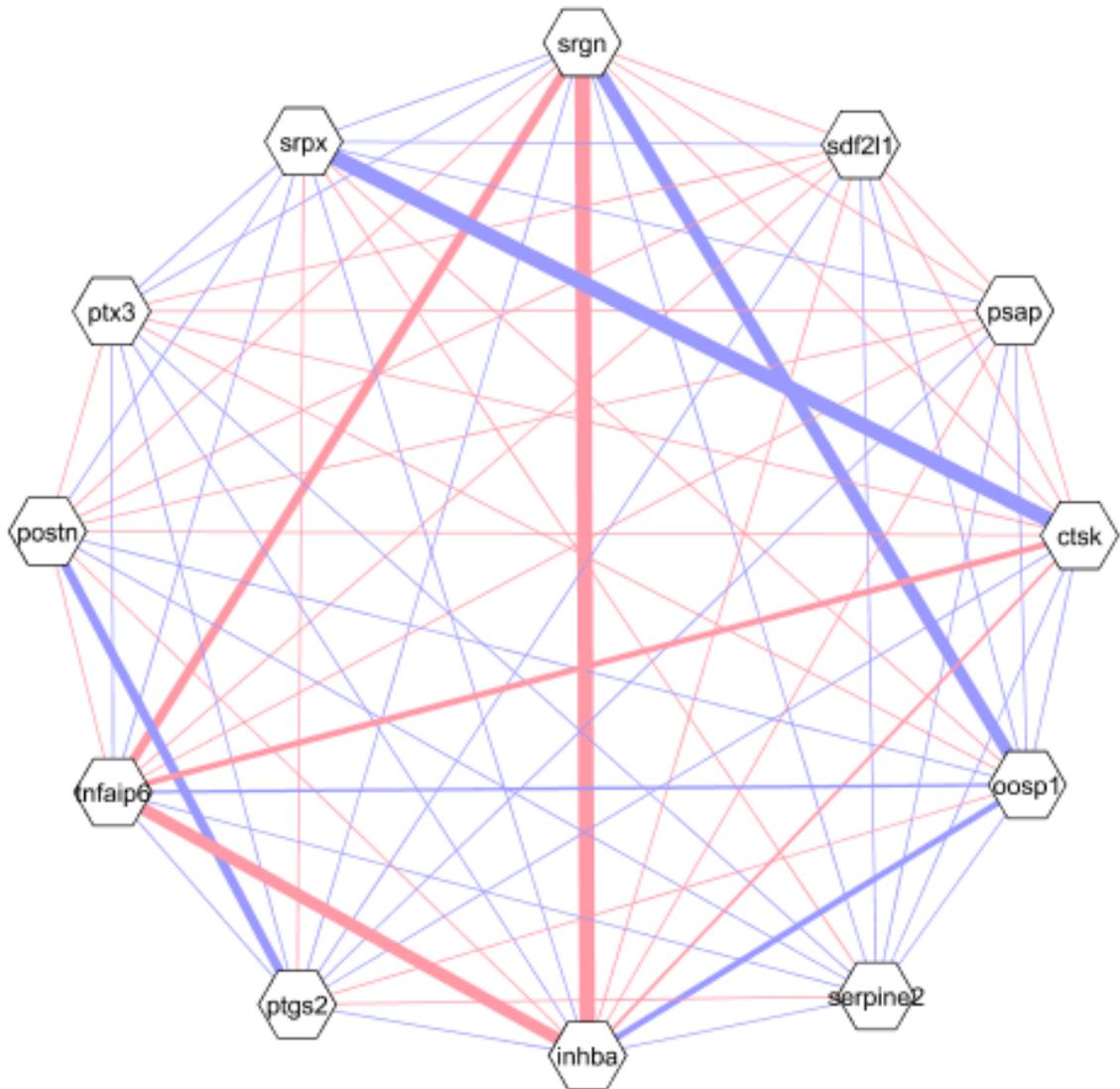


Figura 6. Red de correlación de transcritos de OSFs en el ovocito en metafase II (en color azul negativo, rosa positiva).

evaluados, los resultados obtenidos en la Figura 1 indicaron que no todos los genes tienen una expresión significativamente diferente entre el ovocito maduro y el inmaduro. Tomando esto en cuenta se realizó de nuevo las redes génicas considerando solo los genes cuya expresión fue significativa tras haber realizado la prueba t-Student.

En ovocito inmaduro (Figura 7) la correlación fue enlazada de forma positiva entre los genes *INHBA*, *PTGS2*, *SDF2L1* y *CTSK*, mientras que negativamente se observa la correlación del *PTX3* hacia los genes *PTGS2*, *SDF2L1*, *CTSK* e *INHBA*. De forma contraria en el ovocito en MII (Figura 8) la correlación positiva implicó un fuerte entrecruzamiento de los genes *INHBA*, *CTSK* y *TNFAIP6*, y en menor grado *TNFAIP6*, *POSTN*, *CTSK* y *SDF2L1*, por el contrario la correlación negativa se enlazó del gen *PTGS2* hacia los genes *SDF2L1*, *POSTN*, *TNFAIP6* y *PTX3*.

Desde la comparación de los agrupamientos jerárquicos (Figura 3 y 4), se muestra que el patrón de los genes evaluados se expresa de una manera estadio específico. Al realizar las redes génicas este patrón queda más claro debido a que es posible observar el grado de intensidad en la correlación generada entre dichos genes. De forma particular sobresale el comportamiento del gen *INHBA* cuya expresión durante el estadio inmaduro, esta correlacionada de manera muy fuerte con la presencia de los genes *PTGS2* y *SDF2L1*; más no con el gen *PTX3* (Figura 7). Después del proceso de maduración *in vitro* (Figura 8), la expresión de *INHBA* cambia, correlacionándose positivamente con los genes *TNFAIP6* y *CTSK*, y aunque sigue correlacionada negativamente con *PTX3*, esta correlación

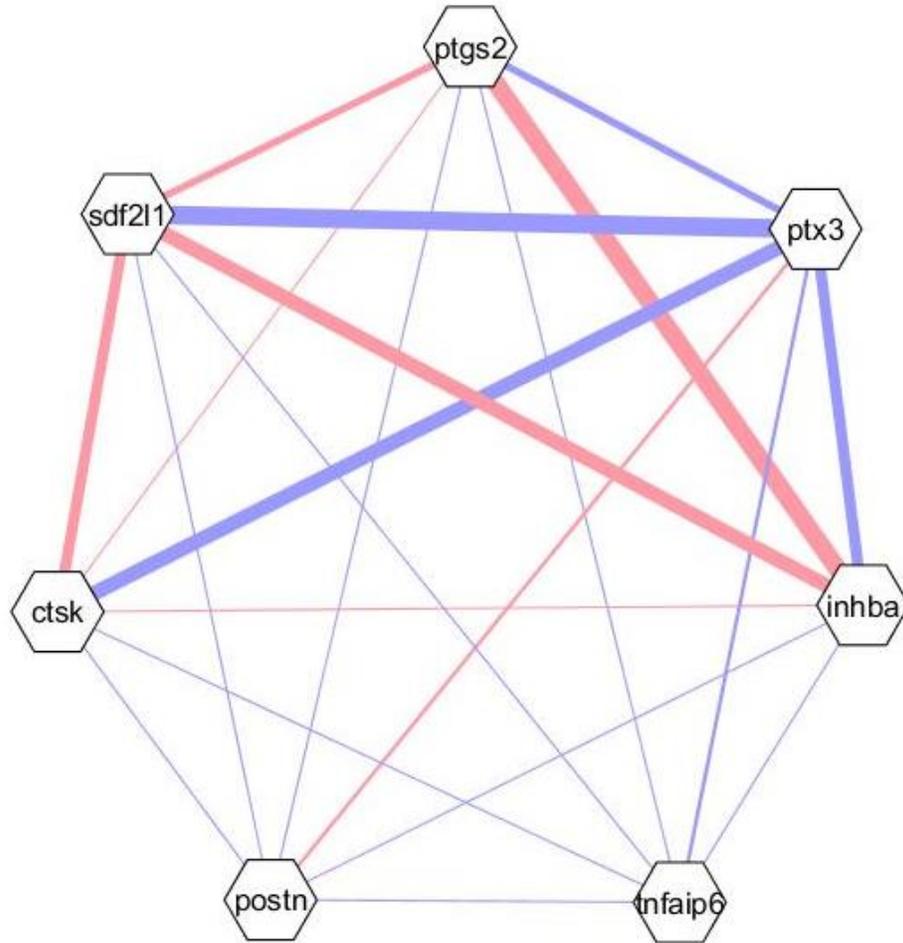


Figura 7. Red de correlación de genes significativos en prueba t-student en ovocito inmaduro (en color azul negativa, rosa positiva).

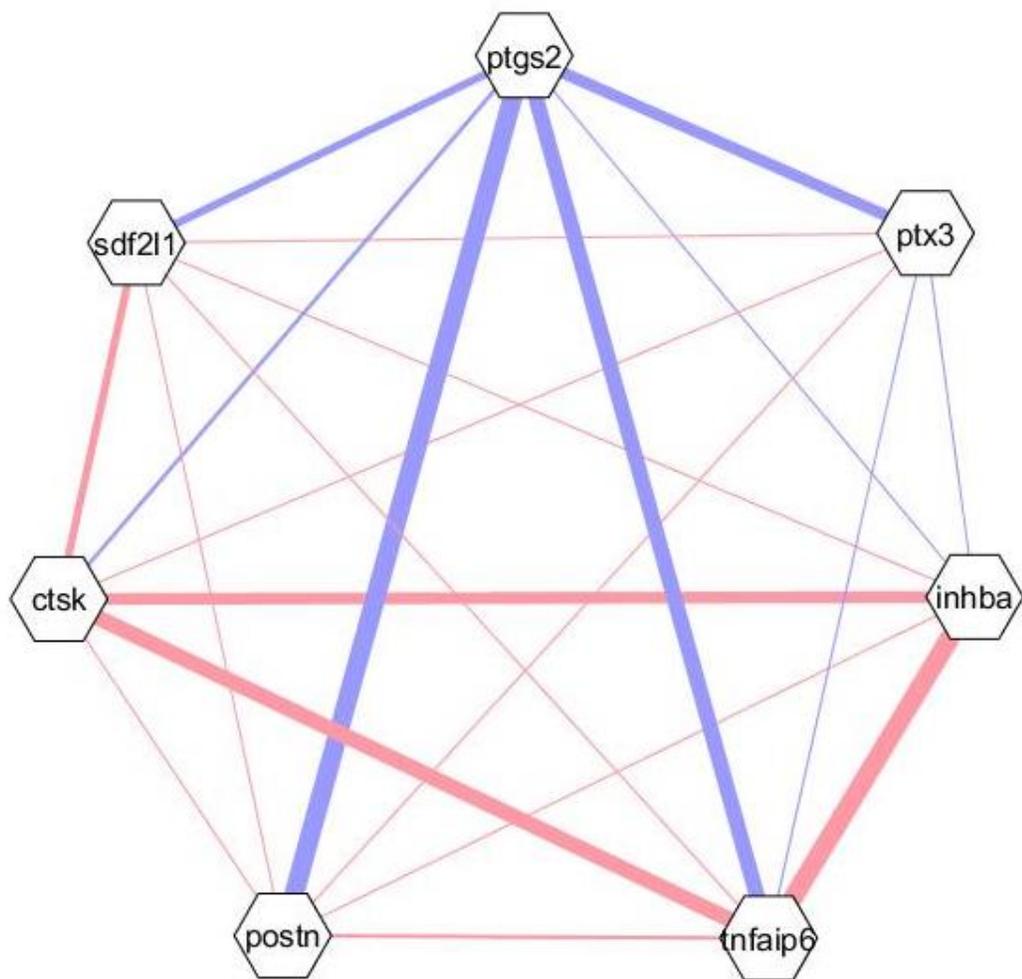


Figura 8. Red de correlación de genes significativos en prueba t-Student en ovocito en metafase II (en color azul negativa, rosa positiva).

es con mucha menor fuerza. Siendo *INHBA* un gen que codifica para la subunidad βA que está involucrada en la formación de tres tipos de proteínas activina A, activina AB e inhibina A; resulta fácil suponer que la expresión de este gen es quien dirige el cambio de patrón génico dependiendo del estadio del ovocito. Ahora bien, en el presente estudio sólo se evaluó la expresión del gen *INHBA* que representa la subunidad βA , no se evaluó a las proteínas activina A, o AB, ni a la proteína inhibina A, lo cual podría ser la clave de la diferencia del patrón en las redes génicas obtenidas.

Como se mencionó anteriormente las activinas y las inhibinas tienen una función antagónica, cuyo balance entre ellas durante el desarrollo folicular es importante. Durante los estadios foliculares tempranos las activinas permanece en altos niveles. (Knight *et al.*, 2012), y ejercen su función en la célula blanco, por medio de su unión con el receptor ACVR2, el cual a su vez activa vía fosforilación a la proteína transmembranal ALK4, quien desencadena la vía de señalización de las proteínas SMADs (SMAD 2, 3 y 4), con la consecutiva expresión de genes como el FSHR, necesario para unir la FSH y pasar al estadio de folículos antrales (Wiater y Vale, 2002). Una vez que el folículo es sensible a la acción de la FSH, los niveles de las activinas decrecen mientras aumentan los niveles de inhibina A, comenzando así el estadio de folículo antral. La inhibina A reconoce el mismo receptor que la activinas, la diferencia es que cuando la inhibina A se une al receptor ACVR2 no se activa la proteína ALK4, por lo tanto la vía de las SMADs se inactiva. En este estadio antral lo niveles de LH aumentan estimulando notablemente la secreción de progesterona (P4) a partir de las células de la

granulosa, lo que provoca la ovulación. La secreción de P4 se sincroniza con la expresión de *PTGS2* (Tamura *et al.*, 2016), que a su vez activa una producción sostenida de cAMP lo que provoca la síntesis de proteínas que conforman la matriz extracelular como *TNFAIP6*, *CTSK* y *POSTN* (Russell *et al.*, 2007).

En este estudio la red génica obtenida para el estadio inmaduro del ovocito, muestra que el gen *INHBA* se correlaciona fuertemente de forma positiva con *PTGS2*, y de acuerdo a lo anterior esto sería el reflejo de un ovocito dentro de un folículo en estadio antral. Esto hace sentido debido a que los ovocitos inmaduros utilizados en este estudio, se aspiraron de folículos ováricos de aproximadamente 10 mm, lo que implica la obtención de un COC en estadio antral temprano o tardío (Adams *et al.*, 2008). *INHBA* y *PTGS2* mostraron una correlación positiva con *SDF2L1*, gen inducido por el estrés, el retículo endoplasmático es el sitio donde se sintetiza, produce el plegamiento y ensamblaje de proteínas (Fukuda *et al.*, 2001), pudiendo atribuir esto al estrés que se sufre en la transición de la etapa de ovocito inmaduro al estadio de ovocito en MII (Dumesic *et al.*, 2015).

El ovocito al encontrarse en el estadio de inmaduro se encuentra rodeado por las CC muy cercanamente, por lo que no hay presencia de matriz extracelular (Gilchrist *et al.* 2008), de ahí la correlación negativa de *INHBA* con *PTX3* en ovocitos inmaduros. La formación de matriz extracelular circundando el COC, provoca la expansión de las CC. Esta expansión es un reordenamiento extenso del citoesqueleto a través del montaje de microfilamentos de actina y la inducción de la síntesis de ácido hialurónico, que transforman las CC apretadamente

empaquetadas en una masa mucho más grande de células mucificadas, esta expansión es necesaria para la extrusión óptima del ovocito-cúmulo del folículo en la ovulación. Después del proceso de maduración *INHBA* mantiene una relación importante con *TNFAIP6* en el ovocito en metafase II (Figura 8), para mantener estable la matriz extracelular y dar espacio a la posterior fecundación (Diaz *et al.*, 2006; Dragovic *et al.*, 2005, 2007).

Después del proceso de maduración, las capas celulares y la matriz extracelular en el ápice folicular se adelgazan y la membrana basal circunferencial se degrada a través de acciones proteolíticas (Russell *et al.*, 2007), por lo que la presencia de *CTSK* al pertenecer a una familia de cisteína proteinasas lisosómicas, participa en varios procesos proteolíticos, incluyendo la matriz extracelular, pudiendo asumir su participación en la ovulación.

En relación a la correlación positiva que se tiene entre *INHBA* y *PTGS2* (Figura 7), se pudiera pensar que esto se debe a que justo antes de la ovulación los niveles de activinas disminuye, mientras que la inhibina A se aumentan y por consiguiente los receptores para LH y secreción de progesterona, lo que traen consigo la expresión de *PTGS2* (Tamura *et al.*, 2016). Posterior a esto, en el estadio de ovocito en metafase II (Figura 8), hay un decaimiento en la producción de inhibina A lo que a su vez disminuye la expresión de *PTGS2*, coordinando de esta forma la síntesis de genes de la matriz extracelular requeridos para expansión exitosa de las células cumulares (Nuttinck *et al.*, 2011).

CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

El desarrollo de la competencia del ovocito involucra una serie de cambios a nivel genético que implica un reajuste continuo en el contenido de su material celular. Con este estudio se concluye que la expresión génica de los genes *PTX3*, *INHBA*, *TNFAIP6*, *POSTN*, *CTSK*, *SDF2L1* y *PTGS2* cambia durante la transición de ovocito inmaduro a ovocito en metafase II y que además existe una red genética constituida por los mismos; cuya expresión génica está organizada de la siguiente forma: en el estadio de ovocito inmaduro, se correlaciona positivamente *INHBA*, *PTGS2*, *SDF2L1* y *CTSK* y en ovocito en Metafase II correlacionándose positivamente *INHBA*, *TNFAIP6*, *CTSK* y *SDF2L1*.

Al observarse involucrado el gen *INHBA* en las correlaciones positivas en ambos estadios, se podría pensar que controla la transición de ovocito inmaduro a ovocito en metafase II, por lo que podría ser un candidato para mejorar la maduración *in vitro*.

Se recomienda analizar la expresión de los genes en CG inmaduras, así como en maduras.

LITERATURA CITADA

- Adams G.P., R. Jaiswal, J. Singh, P. Malhi. 2008. Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Alberta, Canada. Canadian Food Inspection Agency, Lethbridge, Alberta, Canadá. 69:72–80.
- Assidi M., S.J. Dieleman, M.A. Sirard. 2010. Cumulus cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence. Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction, Université Laval, Québec, Québec, G1K 7P4, Canada.
- Assou S., T. Anahory, V. Pantesco, T. L. Carrour, F. Pellestor, B. Klein, L. Reyftmann, H. Dechaud, J. De Vos y S. Hamama. 2006. The human cumulus–oocyte complex gene-expression profile. CHU Montpellier, Institut de Recherche en Biothérapie, Hôpital Saint-Eloi, Montpellier, France.
- Baker T.G. y R. H. F. Hunter. 1978. Oogenesis and follicular growth in the cow: implications for superovulation. In: Sreenan J.M. (Ed.), Control of Reproduction in the Cow. CEC Publications, Luxembourg.
- Baker, T.G. y L.L. Franchi. 1967. The fine structure of chromosomes in bovine primordial oocytes. J. Reprod. Fertil. 14:511–513.
- Basu S., W. Duren, C. R. Evans, C. F. Burant, G. Michailidis y A. Karnovsky. 2017. Sparse network modeling and metscape-based visualization methods for the analysis of large-scale metabolomics data. Department of Statistics, University of California, Berkeley, CA, USA.
- Bernal-Ulloa S. M., A. Lucas-Hahn, D. Herrmann, et al. 2016. Oocyte pre-IVM with caffeine improves bovine embryo survival after vitrification. Theriogenology. 86(5):1222-30
- Bousquet D., H. Twagiramungu, N. Morin, C. Brisson, G. Carboneau y J. Durocher. 1999. *In vitro* Embryo Production in the Cow: An Effective Alternative to the Conventional Embryo Production Approach. L'Alliance Boviteq inc., Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada.
- Braw-Tal R, S. Yossefi. 1997. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. J Reprod Fertil. 109:165–171.
- Brower P.T., R.M. Schultz. 1982. Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible nutritional role during oocyte growth. Dev. Biol. 84:455–464.

- Byskov A.G., N.E. Skakkebaek., G. Stafanger y H. Peters. 1977. Influence of ovarian surface epithelium and rete ovary on follicle formation. *J. Anat.* 123:77–86.
- Calder M. D., A. N. Caveney, M. E. Westhusin y A. J. Watson. 2001. Cyclooxygenase 2 and prostaglandin E2 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.
- Carrette O., Nemade R. V., Day A. J., Brickner A. y Larsen W. J. 2001. TSG-6 Is concentrated in the extracellular matrix of mouse cumulus oocyte complex through hyaluronan and inter-alpha-inhibitor binding. *Biology of Reproduction*, 65:301-308.
- Castro Valenzuela B. E. 2015. Análisis del secretoma del ovocito bovino (*Bos taurus*). Reproducción y Genética Animal. Chihuahua, Chihuahua, México.
- Cunningham, J. G., y B. G. Klein. 2007. *Textbook of Veterinary Physiology*. 4aed. Editorial ELSEVIER. St. Louis, Missouri, USA.
- Diaz, F.J., M.J. O'Brien, K. Wigglesworth, y J.J. Eppig. 2006. The preantral granulosa cell o cumulus cell transition in the mouse ovary: development of competence to undergo expansion. *Dev. Biol.* 299(1):91-104.
- Dragovic R.A., L.J. Ritter, S.J. Schulz, F. Amato, D.T. Armstrong y R.B. Gilchrist. 2005. Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology*, 146(6):2798-2806.
- Dragovic R.A., L.J. Ritter, S.J. Schulz, F. Amato, J.G. Thompson, D.T. Armstrong y R.B. Gilchrist. 2007. Oocyte-secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse cumulus cell expansion. *Biol. Reprod.* 76(5):848-857.
- Dumesic D.A., D.R. Meldrum, M.G. Katz-Jaffe, R.L. Krisner, W.B. Schoolcraft. 2015. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril.* 103:303-16.
- Eppig J.J, K. Wigglesworth, F.L. Pendola. 2002. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:2890–2894.
- Eppig J.J. 1991. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays.* 13:569–574.

- Erickson B.H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *J. Reprod Fertil.* 1966.10:97–105.
- Fair T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. Department of Animal Science and Production and the Conway Institute for Biomedical and Biomolecular Research, University College Dublin, Lyons Research Farm, Newcastle, County Dublin, Ireland. *78:203–216.*
- FAO. 2012. La población mundial y la demanda global de alimentos. AFAQUIMA. Rif: J00313850-9.
- Farsi M.M, N. Kamali y M. Pourghasem. 2013. Embryological Aspects of Oocyte *in vitro* maturation. Celular and Molecular Biology Research Center, Babol University of Medical Science, Babol, Iran.
- Fukuda S., M. Sumii, Y. Masuda, M. Takahashi, N. Koike, J. Teishima, H. Yasumoto, T. Itamoto, T. Asahara, K. Dohi y K. Kamiya. Murine and Human SDF2L1 Is an Endoplasmic Reticulum Stress-Inducible Gene and Encodes a New Member of the Pmt/rt Protein Family. Division of Molecular Biology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan.
- Fülöp, C., Szántó S., Mukhopadhyay d., Bárdos T., Kamath R. V., Rugg M. S., Day A., Salustri A., Hascall V., Glant T. y Mikecz K.. 2003. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. *Development.* 130:2253-2261.
- Galli C., G. Lazzari. 2008. The Manipulation of Gametes and Embryos in Farm Animals. *Reproduction in domestic animals Volume 43, Issues2.*
- Gilbert I., C. Robert, C. Vigneault, P. Blondin, M. A. Sirard. 2012. Impact of the LH surge on granulosa cell transcript levels as markers of oocyte developmental competence in cattle. *Reproduction 2012 v.143 no.6* *Reproduction 2012 v.143 no.6 pp. 735-747.*
- Gilchrist R.B., L.J. Ritter, D.T. Armstrong. 2004. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci.*; 82–83:431–446.
- Gilchrist R. B. y J. G. Thompson. 2007. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. *Theriogenology*, 67(1), 6–15.

- Gilchrist R.B., M. Lane y J.G. Thompson. 2008. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update* 14 159–177.
- 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.
- Harris A.L. 2001. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the GAP. *Q. Rev. Biophys*, 34(3):323-472.
- Hyttel P., T. Fair, H. Callesen y T. Greve. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47:23–32.
- Ireland. J.J., A. E. Zielak-Steciwo, F. Jimenez-Krassel, J. Folger, A. Bettegowda, D. Scheetz, S. Walsh, F. Mossa, P.G. Knight, G.W. Smith. 2009. Variation in the Ovarian Reserve Is Linked to Alterations in Intrafollicular Estradiol Production and Ovarian Biomarkers of Follicular Differentiation and Oocyte Quality in Cattle... Show more. *Biology of Reproduction*, Volume 80.
- Itahana K., Y. Morikazu, T. Takeya. 1996. Differential expression of four connexin genes, Cx-26, Cx-303, Cx-32 and Cx-43, in the porcine ovarian follicle. *Endocrinology*. 137:5036–5044.
- Johnson M.L., D.A. Redmer, L.P. Reynolds y A.T. Grazul-Bilska. 1999. Expression of GAP junctional proteins connexin 43, 32 and 26 throughout follicular development and atresia in cows. *Endocrine*. 10:43–51.
- Knight, P. G., L. Satchell y C. Glister. 2012. Intra-ovarian roles of activins and inhibins. *Mol. Cell. Endocrinol.* 359:53-65.
- Kretser de D.M., M. P. Hedger, K. L. Loveland y D. J. Phillips. 2002. Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Centre for Molecular Reproduction and Endocrinology*.
- 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. *Molecular Human Reproduction* 14:673–678.
- Li Y., R. Q. Li, S. B. Ou, et al. 2014. Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and

- embryo quality in humans. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 12(1):81.
- 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. Oocyte and Embryo Quality: Effect of Origin, Culture Conditions and Gene Expression Patterns. Department of Animal Science and Production, Conway Institute of Biomolecular and Biomedical Research, University College Dublin, Lyons Research Farm, Newcastle, County Dublin, Ireland; 2Dpto.de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zootécnicos, INIA, Ctra de la Coruña Km 5.9, Madrid 28040, Spain. 38:259–267.
- Lonergan P. y T. Fair. 2014. The ART of studying early embryo development: progress and challenges in ruminant embryo culture. *Theriogenology* . 86(1):49-55.
- Machatkovaa M. K. Krausovaa, E. Jokesova, M. Tomanek. 2004. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. *Veterinary Research Institute, Hudcova* 70:621 32 Brno, Czech Republic.
- Marei Waleed F., D. Robert, E. Abayasekara, D. C. Wathes, A. A. Fouladi-Nashta. 2013. Role of PTGS2-generated PGE2 during gonadotrophin-induced bovine oocyte maturation and cumulus cell expansion. Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, Giza 12211, Egypt.
- Matzuk M.M., K.H Burns, M.M Viveiros y J.J Eppig. 2002. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. Department of Pathology, Baylor College of Medicine, 1 Baylor Plaza, Houston, TX 77030, USA.
- McKenzie L.J., S.A. Pangas, S. A. Carson, E. Kovanci, P. Cisneros, J. E. Buster, P. Amato, M. M. Matzuk. 2004. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. Department of Obstetrics, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA.
- Moor RM, M.W., Smith, R.M.C. Dawson. 1980. Measurement of intercellular coupling between oocytes and cumulus cells using intracellular markers. *Exp Cell Res*. 126:15-29.

- Nagai T. 2000. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*. 55:1291-1301.
- Nuttinck F., L. Gall, S. Ruffini, L. Laffont, L. Clement, P. Reinaud, P. Adenot, B. Grimard, G. Charpigny, 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.
- Oksjoki S., S. Sallinen, E. Vuorio. 1999. Expresión cíclica de las transcripciones de RNAm para los componentes del tejido conectivo en el ovario de ratón. *Mol. Tararear. Reprod*, 5:803-808.
- Paramio M.T. 2010. *In vivo* and *in vitro* embryo production in goats. Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.
- Pereda-Espinoza B. E., M. E. Burrola-Barraza, F. A. Rodríguez-Almeida, J. Antillon-Ruíz, A. Anchondo-Garay. 2016. Reduced mineral oil ratio improves blastocyst yield in well-of-thewell (WOW) and polyester mesh (PM) single-embryo cultures-short communication. *Veterinarski Arhiv* 86 (3), 467-474.
- Picton, H., D. Briggs y R. Gosden. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol*. 145:27-37.
- Rizos D., P. Lonergan, M.P. Boland, R. Arroyo-Garcia, B. Pintado, J. la Fuente, A. de Gutierrez-Adan. 2002b: Analysis of differential mRNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: Implications for blastocyst quality. *Biol. Reprod*. 66:589–595.
- Russe I. 1983. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliography of Anatomy* 24:77-92.
- Russell D. L., R. B. Gilchrist, H. M. Brown, J. G. Thompson. 2016. Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: Old hands and new players?. School of Medicine, the Robinson Research Institute, The University of Adelaide, Adelaide, Australia.
- Russell, D. L. y R. L. Robker. 2007. Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex. *Hum. Reprod. Update*. 13:289-312.

- Salustri A., C. Garlanda, E. Hirsch, M. De Acetis, A. Maccagno, B. Bottazzi, A. Doni, A. Bastone, G. Mantovani, P.P. Beck, G. Salvatori, D. J. Mahoney, A. J. Day, G. Siracusa, L. Romani, A. Mantovani, 2004. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and *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.
- Scaramuzzi R. J., D. T. Baird, B. K. Campbell, M. A. Driancourt, J. Dupont, J. E. Fortune , R. B. Gilchrist, G. B. Martin, K. P. McNatty , A. S. McNeilly, P. Monget, D. Monniaux, C. Vinñoles y R. 2011. Webb. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Centre INRA de Tours, 37380 Nouzilly, France.
- 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.
- Sirard M. A., F. Richard, P. Blondin y C. Robert. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65, 126–136.
- Smitz J, R. Cortvrindt. 2002. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. *Reproduction* 123:185–202.
- Su G., J. H. Morris, B. Demchak, G. D. Bader. 2015. Biological Network Exploration with Cytoscape 3. *Current protocols in bioinformatics* Volume47, Issue1.
- Su You-Qiang, K. Sugiura, Y. Woo, K. Wigglesworth, S. Kamdar, J. Affourtit, J. J. Eppig. 2007. Selective degradation of transcripts during meiotic maturation of mouse oocytes. The Jackson Laboratory, 600 Main Street, Bar Harbor, ME 04609, USA
- Sudiman J., L.J. Ritter, D.K. Feil, X. Wang, K. Chan, D.G. Mottershead. 2014. Effects of differing oocyte-secreted factors during mouse *in vitro* maturation on subsequent embryo and fetal development. *J Assist Reprod Genet*; 31:295–306.

- Tamura K., H. Naraba, T. Harac, K. Nakamura, M. Yoshie, H. Kogo, E. Tachikawa. 2016. A positive feedback loop between progesterone and microsomal prostaglandin E synthase-1-mediated PGE2 promotes production of both in mouse granulosa cells. Department of Endocrine and Neural Pharmacology, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan.
- Twig J., S. Theunissen, R. P. Bezstarosti, K. Demmers, J. A. 2012. Proteomic analysis of the microenvironment of developing oocytes. *Proteomics*, 12:1463-1471.
- Wiaterski E. and Wylie Vale. Inhibin Is an Antagonist of Bone Morphogenetic Protein Signaling. 2002. Clayton Foundation Laboratories for Peptide Biology, the Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, California.
- Wright, C., D.L. Becker, J.S. Lin, A.E.K.H. Warner. 2001. Stage-specific and differential expression of GAP junctions in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation. *Reproduction* 121:77–88.