



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

ESCUELA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA

**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN METIONINA SULFÓXIDO REDUCTASA
A (MSRA) EN CÉLULAS FOLICULARES BOVINAS EN DIFERENTES ESTADIOS”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Previo a la obtención del título de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

AUTOR:

MARCELO ISRAEL LEMA VELOZ

RIOBAMBA – ECUADOR

2017

Esta tesis fue aprobada por el siguiente tribunal



PRESIDENTE DEL TRIBUNAL
Ing. MsC. Julio César Benavides Lara



DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN
Ing. MsC. Paula Alexandra Toalombo Vargas



ASESOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN
Dr. MsC. Alex Arturo Villafuerte Gavilánez

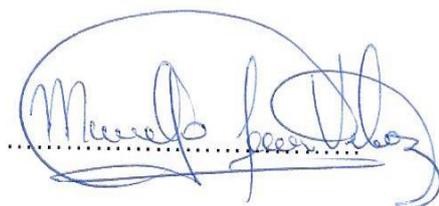
Riobamba 04 de julio del 2017

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Marcelo Israel Lema Veloz, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados mismos son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de éste trabajo de titulación.

Riobamba, 04 de julio del 2017.



Marcelo Israel Lema Veloz

C.I: 060410696-3

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios en primera instancia por darme la vida y salud con la que he podido obtener este logro de gran importancia en mi vida personal y familiar.

Agradezco a mis padres Luis y Nancy por ser un apoyo diario en mi vida, forjándome desde pequeño con lo mejor de sus valores y principios al igual que a mis hermanos Jonathan, Cristina y mi querido sobrino Matías por ser quienes me sacaban una sonrisa cuando más lo necesitaba y fueron partícipes de llegar a ser lo que soy ahora.

También quiero agradecer a todos mis familiares por aportar de una u otra manera en este éxito obtenido, a mis buenos amigos que entre buenas y malas circunstancias siempre estuvieron ahí, de manera especial agradezco a mi prima María Fernanda por ser partícipe de mi éxito y seguir siéndolo.

Finalmente agradezco a todos los buenos amigos que hice en la Universidad Autónoma de Chihuahua que me ayudaron de buena intención, siempre preocupados de que mi estancia sea venidera y participar en este grandioso logro.

DEDICATORIA

Este logro lo dedico a mis padres, hermanos, mi querido sobrino por ser el pilar fundamental de mi vida, ya que su perenne amor hacia mi han logrado convertir en lo que alguna vez fue un niño lleno de sueños e ilusiones en un hombre de provecho y porvenir.

Al igual que a mi buena familia y amigos que también de una u otra manera mediante sus gestos de cariño, preocupación y desinterés pudieron marcar mi vida con infinito amor y agradecimiento.

CONTENIDO

| | Pág. |
|--|-------------|
| Resumen | v |
| Abstract | vi |
| Lista de Cuadros | vii |
| Lista de Gráficos | viii |
| Lista de Anexos | ix |
| | |
| I. <u>INTRODUCCIÓN.</u> | 1 |
| II. <u>REVISIÓN DE LITERATURA.</u> | 3 |
| A. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA BOVINO. | 3 |
| 1. <u>Ovarios.</u> | 3 |
| 2. <u>Funciones.</u> | 3 |
| B. CICLO ESTRAL. | 4 |
| 1. <u>Proestro.</u> | 4 |
| 2. <u>Estro o celo.</u> | 4 |
| 3. <u>Metaestro.</u> | 5 |
| 4. <u>Diestro.</u> | 5 |
| C. OVOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS EN BOVINOS. | 6 |
| 1. <u>Ovogénesis.</u> | 6 |
| 2. <u>Foliculogénesis.</u> | 7 |
| 3. <u>Crecimiento folicular.</u> | 9 |
| 4. <u>Folículos primarios.</u> | 12 |
| 5. <u>Folículos secundarios.</u> | 13 |
| 6. <u>Folículos terciarios.</u> | 14 |
| D. RADICALES LIBRES. | 17 |
| 1. <u>Radical anión superóxido (O₂).</u> | 18 |
| 2. <u>Radical hidroxilo (OH).</u> | 18 |
| E. ESTRÉS OXIDATIVO. | 19 |
| F. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO). | 20 |
| G. Metionina Sulfóxido Reductasa A (MSRA). | 23 |
| 1. <u>Oxidación de la metionina por ROS y acción de las metionina sulfóxido reductasas (Msrs).</u> | 23 |
| 2. <u>Determinación de la protección de MSRA contra el daño oxidativo.</u> | 25 |

| | | |
|------|---|----|
| H. | INVESTIGACIÓN MOLECULAR Y EXPRESIÓN GÉNICA. | 26 |
| 1. | <u>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).</u> | 26 |
| 2. | <u>Transcripción inversa (RT-PCR).</u> | 27 |
| 3. | <u>Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).</u> | 27 |
| III. | <u>MATERIALES Y MÉTODOS.</u> | 29 |
| A. | LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO. | 29 |
| B. | UNIDADES EXPERIMENTALES. | 29 |
| C. | MATERIALES EQUIPOS E INSTALACIONES. | 30 |
| 1. | <u>Materiales.</u> | 30 |
| 2. | <u>Equipos.</u> | 30 |
| 3. | <u>Reactivos.</u> | 31 |
| 4. | <u>Instalaciones.</u> | 31 |
| D. | TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL. | 31 |
| E. | MEDICIONES EXPERIMENTALES. | 31 |
| F. | ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA. | 32 |
| G. | PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL. | 32 |
| 1. | <u>Corroboración de ARN puro.</u> | 32 |
| 2. | <u>Síntetisis ADN complementario.</u> | 33 |
| 3. | <u>Análisis de la expresión del gen MSRA.</u> | 33 |
| H. | METODOLOGÍA DE LA EVALUACIÓN. | 33 |
| 1. | <u>Integridad de ARN.</u> | 33 |
| 2. | <u>Síntetisis ADN complementario.</u> | 34 |
| 3. | <u>Expresión del gen MSRA.</u> | 34 |
| IV. | <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</u> | 35 |
| A. | ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN MSRA EN CÉLULAS FOLICULARES BOVINAS. | 35 |
| 1. | <u>Integridad de ARN.</u> | 35 |
| 2. | <u>Síntetisis ADN complementario.</u> | 38 |
| 3. | <u>Expresión del gen MSRA.</u> | 40 |
| V. | <u>CONCLUSIONES.</u> | 44 |
| VI. | <u>RECOMENDACIONES.</u> | 45 |
| VII. | <u>LITERATURA CITADA.</u> | 46 |

ANEXOS

RESUMEN

Se evaluó la expresión del gen Metionina Sulfóxido Reductasa A (MSRA) en muestras de Cocs (Grupo Cumulus-Ovocito) maduros 1 y 2 e inmaduros 1 y 2 al igual que de Células Cumulares maduras 1 y 2 e inmaduras 1 y 2, en el laboratorio de transgénesis y fertilización in vitro de la Universidad Autónoma de Chihuahua perteneciente al estado de Chihuahua - México mediante síntesis de ADN y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). El experimento se manejó mediante un análisis de estadística descriptiva pero para cada muestra analizada se realizaron tres replicas técnicas más un control de ADN Negativo, los resultados fueron sometidos a una prueba T-Student a una $P \geq 0.05$. Los datos presentados para las variables que expresaron el gen no mostraron diferencias estadísticas significativas; sin embargo se demostró la presencia del gen MSRA en COCs maduros 2 e inmaduros 1 y 2. Es por ello que la identificación del gen MSRA en las células foliculares bovinas podría tener un impacto de relevancia dando la importancia en el proceso de maduración de ovocitos ya que las células con presencia del gen podrían ser más eficientes al desechar residuos de procesos metabólicos celulares y elevar el porcentaje de obtención de blastocitos en el método in vitro al igual que se recomienda seleccionar Cocs que expresen el gen Metionina Sulfóxido Reductasa A (MSRA) en procesos de fertilización in vitro, ya que tiene un papel importante de eliminación de especies reactivas de oxígeno (EROS) en el proceso de foliculogénesis bovina.



ABSTRACT

At the Autonomous University of Chihuahua-Mexico, evaluated expression of the Methionine Sulphoxide Reductase A (MSRA) gene was evaluated in samples of mature Cocs (Cumulus-Ovocyte Group) 1 and 2 and immature 1 and 2 as well as mature Cumulus 1 and 2 and immature 1 and 2 by complementary DNA synthesis and real-time polymerase chain reaction (qPCR). Data were analyzed using descriptive statistics, with three replicates plus a Negative DNA control; the results were subjected to a T-Student test at one ($P \leq 0.05$). The data presented for the variables that expressed the gene did not show significant statistical differences; however, the presence of the MSRA gene was demonstrated in immature Coc 2 and mature Coc 1 and 2. This is why the identification of the MSRA gene in bovine follicular cells could have a relevant impact in the oocyte maturation process, and That cells with the presence of the gene could be more efficient in discarding residues of cellular metabolic processes and raise the rate of blastocyst production in in vitro fertilization, as it is recommended to select Cocs that express the gene Methionine Sulfoxide Reductase A (MSRA) In vitro processes, due to its relevance in the elimination of oxygen species (EROS) in the process of bovine folliculogenesis.



LISTA DE CUADROS

| N° | | Pág. |
|-----------|--|-------------|
| 1. | ASPECTOS MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE FOLÍCULOS OVÁRICOS. | 11 |
| 2. | CLASIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FOLÍCULOS BOVINOS PEQUEÑOS. | 14 |
| 3. | CONDICIONES METEOROLÓGICAS DEL ESTADO DE CHIHUAHUA | 29 |
| 4. | CANTIDAD DE ÁCIDOS NUCLEICOS. | 37 |

LISTA DE GRÁFICOS

| N° | | Pág. |
|-----------|---|-------------|
| 1. | Cambios Ováricos y hormonales de la vaca. | 6 |
| 2. | Representación esquemática del desarrollo folicular completo. | 12 |
| 3. | Arquitectura histológica de los folículos ováricos. | 17 |
| 4. | Respuesta celular frente a la formación de EROS a través de estímulos fisiológicos. | 23 |
| 5. | Mecanismo catalítico de tres pasos de Msrs. | 25 |
| 6. | Bandeo de las muestras de ARN. | 36 |
| 7. | Bandeo de ARN después de aplicar el lisador de ADN. | 38 |
| 8. | Cycles tresholds de la qPCR para ADN complementario. | 40 |
| 9. | Expresión génica del COCI2. | 41 |
| 10. | Expresión Génica del COCM1. | 42 |
| 11. | Expresión génica del COCM2. | 42 |

LISTA DE ANEXOS

N°

1. RESULTADOS ABALIZADOS POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA.
2. T-STUDENT COCI2 (HISTONA-MSRA).
3. T-STUDENT COCM1 (HISTONA-MSRA).
4. T-STUDENT COCM2 (HISTONA-MSRA).
5. MUESTRAS DE COC MADURO E INMADURO AL IGUAL QUE DE CÉLULAS CUMULARES MADURAS E INMADURAS
6. CAMPANA DE RAYOS UV UTILIZADA PARA DESINFECCIÓN DE MATERIALES Y REACTIVOS.
7. EQUIPO DE TERMOCICLADOR.
8. INSERCIÓN DE MUESTRAS TERMOCICLADAS AL GEL DE AGAROSA.
9. CÁMARA DE ELECTROFORESIS.
10. FOTODOCUMENTADOR UTILIZADO PARA OBSERVAR GELES DE AGAROSA UNA DESPUÉS QUE HAYA PASADO POR ELECTROFORESIS.
11. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS EN EL EQUIPO DE NANODROP PARA OBTENER LA CANTIDAD DE ÁCIDOS NUCLEICOS PRESENTES Y SU PUREZA.
12. INSERCIÓN DE LAS MUESTRAS MÁS EL MIX DE MSRA E HISTONA PARA SER ANÁLIZADAS EN EL EQUIPO DE PCR EN TIEMPO REAL.

13. EQUIPO DE PCR EN TIEMPO REAL (qPCR)
14. SONDAS DE HISTONA Y METIONINA SULFÓXIDO REDUCTASA A (MSRA).
15. RESULTADOS OBTENIDOS AL SER ANALIZADOS LA PRESENCIA DE ADN COMPLEMENTARIO EN EL EQUIPO DE PCR EN TIEMPO REAL.
16. RESULTADOS OBTENIDOS POR EL PROGRAMA DEL PCR EN TIEMPO REAL AL ANALIZAR LA EXPRESIÓN GÉNICA PARA MSRA.

INTRODUCCIÓN.

La ganadería Ecuatoriana es una de las principales factorías alimentarias y tiene como principal autor la explotación de ganado lechero siendo subsecuente la producción de ganado de carne, ocupando un gran campo de aprovechamiento pecuario a nivel nacional, sin embargo esta firme industria tiene sus falencias.

Los productores ganaderos hablando a nivel reproductivo tienen como principal limitante la obtención de crías de alto valor genético por año viéndose perjudicados por varios factores sin embargo las biotecnologías reproductivas como la MOET (multiovulación y transferencia de embriones), las técnicas in vitro como (fertilización y cultivo de embriones in vitro, recolección y maduración de ovocitos), las manipulaciones genéticas (clonación, transgénicos) y el semen sexado ayudan a mitigar esta problemática.

En la actualidad las biotecnologías reproductivas son utilizadas a gran escala en el país siendo la fertilización in vitro una de las más usadas, por ello se ha visto la necesidad de buscar mejoras en la conservación de ovocitos de vacas altamente productoras que por diversos problemas de salud, patogenicidad o al llegar a final de su vida productiva se debe realizar el descarte de la misma y como consecuencia se pierde un alto porcentaje genético en el hato al no obtener descendientes con el mismo valor genético.

Aunque estas tecnologías sean tentadoras para el productor se considera que no presentan un alto porcentaje de eficacia y más aún si nos enfocamos en la fertilización in vitro (FIV) ya que desciende los porcentajes de obtención de embriones comparado con la fecundación in vivo. Es por ello que los ovocitos que sean aptos para la recolección y que lleguen a ser fertilizados a nivel de laboratorio no se encuentran en un ambiente idóneo en su totalidad, pudiendo presentar cuadros de muerte por intoxicación celular al no poder eliminar de manera eficiente desechos de metabolismo como las especies reactivas de oxígeno (ROS) aunque hay células que presentan una protección genética a los ROS como es el caso del gen Metionina Súlfoxido Reductasa A (MSRA).

Es por ello que la investigación está enfocada en demostrar la presencia de este gen para que se pueda posteriormente aumentar las probabilidades en la obtención de embriones asegurando un mayor porcentaje de éxito reproductivo y beneficiando así a los productores nacionales, es por ello que se ha planteado analizar la expresión del gen (MSRA) en células foliculares bovinas en diferentes estadios.

I. REVISIÓN DE LITERATURA.

A. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA BOVINO.

El tracto reproductivo de la vaca se encuentra debajo del recto, el último segmento del intestino grueso. El aparato reproductor de la vaca comprende los ovarios, oviductos, útero, cérvix, vagina, vulva (Landin, V. 2015).

1. Ovarios.

Son los órganos esenciales para la reproducción de la hembra, pueden situarse en la cavidad pélvica o en la abdominal dependiendo de la edad, el número de partos, mide aproximadamente de 2 a 4 cm. de largo por 1 a 2 cm. de ancho (Landin, V. 2015).

En el ovario activo se distingue dos capas. Una capa cortical (córteX ovárica) donde tendrá lugar el desarrollo de los folículos y de los ovocitos y en la que se encuentran también células secretoras de hormonas. Y una segunda zona o capa medular con tejido conectivo, vascular y nervioso. En el testículo masculino, por el contrario, la producción de espermatozoides y hormonas se llevan a cabo en el interior del mismo (Landin, V. 2015).

La capa cortical del ovario en todas las hembras de animales domésticos, excepto en la yegua, está ocupada por los folículos ováricos en distintas fases de 5 evolución. Esta capa queda envuelta por la túnica albugínea (membrana fibrosa que envuelve al ovario). dicha túnica se va infiltrando en profundidad hasta definir el estroma ovárico que mantiene los folículos en evolución (Landin, V. 2015).

2. Funciones:

- Gametogénesis (función exocrina).
- Formación de ovocitos.
- Síntesis de hormonas (función endócrina).

- Estrógenos (Folículos).
- Progesterona (Cuerpo Lúteo).
- Inhibina.
- Oxitocina.
- Relaxina.

B. CICLO ESTRAL.

Las vacas son hembras poliestricas típicas, es decir, presentan su ciclo estral durante todo el año .El ciclo estral de las vacas se repite cada 21 días, el celo dura de 6 a 30 horas y la parte más fértil del celo es la segunda mitad del celo y las fases del ciclo estral son: (Gélvez, L. 2016).

1. Proestro.

Es la fase que precede al celo. Se caracteriza por un incremento marcado de la actividad del sistema reproductivo. Hay incremento folicular y regresión del cuerpo lúteo del ciclo previo. El útero aumenta de tamaño, el endometrio está congestionado, edematoso y sus glándulas presentan abundante actividad secretora. La mucosa vaginal esta hiperémica, el número de capas celulares que forman su epitelio se incrementa, estando cornificadas las más superiores. Su duración es de 3 a 4 días (Lopez, J. 2014).

2. Estro o celo.

Es el periodo de receptividad sexual o de aceptación al macho. El comienzo y final del estro son momentos perfectamente detectables en el ciclo estral, por lo tanto son utilizables como punto de referencia para determinar la duración del mismo. La hembra generalmente busca al macho y permanece quieta en su presencia para que la cubra. Hay nerviosismo y excitación, bramidos frecuentes, disminución del apetito y producción de leche, pupilas dilatadas. Las glándulas del útero, cerviz y vagina secretan abundante cantidad de moco, filante como clara de huevo. La vulva y vagina están congestionadas (Lopez, J. 2014).

La cérvix se encuentra dilatada. A nivel de los ovarios, durante el proestro y el estro hay crecimiento folicular con ausencia del cuerpo lúteo funcional, siendo los estrógenos las hormonas responsables del cambio de conducta de la vaca. El proestro y estro son conocidos conjuntamente como fase folicular del ciclo estral. Las vacas en celo o en período alrededor del mismo tienden a congregarse en grupos que montan o intentan montarse entre ellas: grupos sexualmente activos (GSA). La vaca en celo es la que permanece quieta cuando la montan. Éste período es muy corto, de aproximadamente 8 a 18 horas de duración (Lopez, J. 2014).

3. Metaestro.

Es la fase inmediatamente posterior al estro. La ovulación en la vaca es un fenómeno espontáneo que tiene lugar unas 12 horas después de finalizado el estro. Las células granulosas del folículo que ha ovulado se transforman en células luteales, a partir de las cuales se forma el cuerpo lúteo. En esta fase se reducen las secreciones de las glándulas uterinas, cervicales y vaginales. Los síntomas de celo comienzan a desaparecer; en algunos animales se puede ver un mucus sanguinolento que sale por la vulva y a veces se pega a los pelos de la cola, lo que es normal. La duración de esta etapa es de 2 a 4 días (Lopez, J. 2014).

4. Diestro.

Período en que el cuerpo lúteo es funcional, formándose grandes cantidades de progesterona. Desaparece la hiperplasia hipertrofia de las glándulas uterinas y el cuello uterino se contrae. Las secreciones del aparato genital son escasas y pegajosas. La mucosa vaginal se vuelve pálida. El período del ciclo estral en que el cuerpo lúteo es funcional se denomina fase luteal del ciclo. Teniendo en cuenta que el estro es la única fase identificable externamente del ciclo estral, en las especies poliéstricas, se divide el ciclo en estro e ínter estro, incluyendo éste último las fases de pro estro, meta estro y diestro. El diestro la etapa más larga del ciclo (unos 14 días) y es la única cuya duración se puede manipular la duración de celos, que en realidad consisten en tratamientos tendientes a acortar o prolongar ésta etapa, para que una vez suspendido el mismo los animales entren en celo más o menos al mismo tiempo como se puede ver en el gráfico 1 (Lopez, J. 2014).

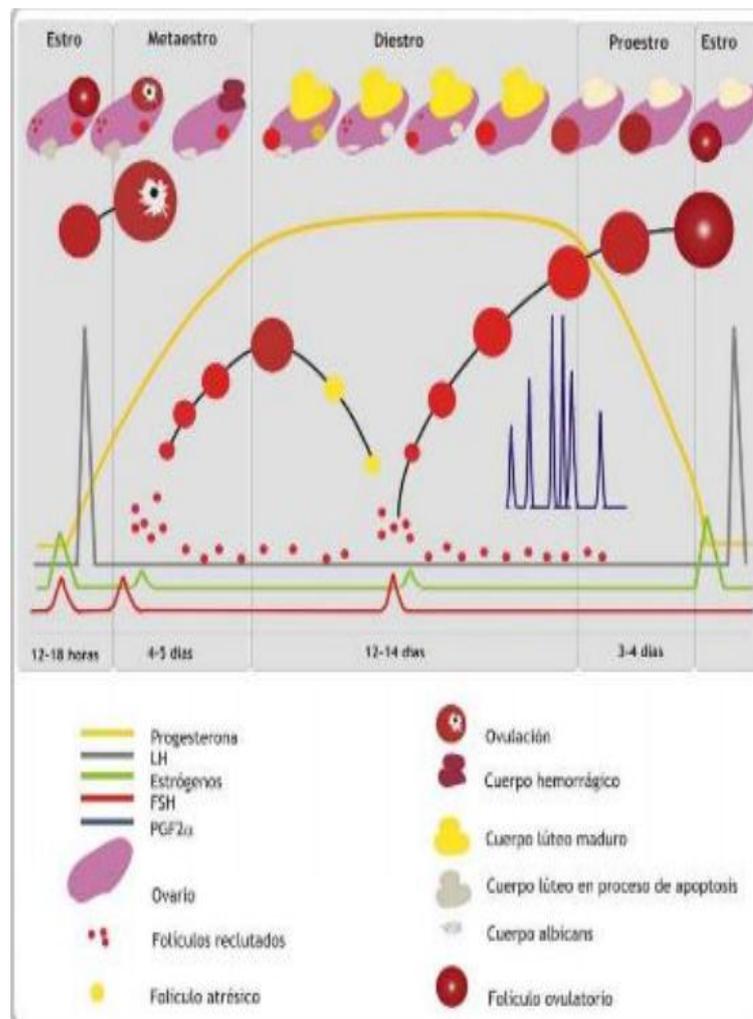


Gráfico 1. Cambios Ováricos y hormonales de la vaca.

Fuente: Lopez, J. (2014)

C. OVOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS EN BOVINOS.

1. Ovogénesis.

La ovogénesis y la foliculogénesis son procesos biológicos complejos y concomitantes que ocurren dentro del ovario. La ovogénesis precisa de una serie de eventos que inducen la diferenciación celular, el desarrollo y la maduración del ovocito, mientras que la foliculogénesis promueve cambios morfológicos y funcionales dentro del folículo (Burrola, M. y González, E. 2015).

La ovogénesis comienza en el embrión femenino con la diferenciación de las células germinales primordiales en ovogonias, que son células madre específica del ovario. Una ovogonia se multiplica por mitosis y comienza la meiosis, pero el proceso se detiene en la profase I (Landin, V. 2015).

Las células en este estadio, se denominan ovocitos primarios, permanecen en estado de latencia dentro de los folículos pequeños (cavidades cubiertas por células protectoras) hasta la pubertad, la hormona folículo estimulante FSH estimula a un folículo periódicamente para que crezca e induzca a su ovocito primario a completar la meiosis I y comenzar la meiosis II (Landin, V. 2015).

Luego la meiosis se vuelve a detener en estadio de metafase II, ovocito secundario, estadio en el cual ovula y permanece así, hasta que se contacte con el espermatozoide en el momento de la fecundación y se transforme en óvulo (Landin, V. 2015).

Se debe tener en cuenta que al momento del nacimiento todas las hembras mamíferas nacen con una gran reserva de ovocitos los cuales declinan rápidamente a medida que se llega a la pubertad. No se conoce si este mecanismo representa una eliminación de ovocitos defectuosos que afectarían la eficiencia reproductiva (Landin, V. 2015).

2. Foliculogénesis.

Los folículos primordiales inician su crecimiento y diferenciación en un proceso aparentemente continuo pero irreversible que es conocido como foliculogénesis. Cuando un folículo primordial entra al grupo de crecimiento, este será conducido a uno de dos hechos: la degeneración por atresia (sufrida por el 99 % o más) o la ovulación alcanzada por muy pocos (Tubino, F. 2012).

El intervalo requerido para la activación de un folículo primordial durmiente hasta su ovulación ha sido estimado en 180 días. Cuando la capa de células de la granulosa se transforma de aplanadas a cuboidales y la teca interna comienza su diferenciación, al folículo en desarrollo se le denomina folículo primario. Su

crecimiento al siguiente estadio, que es el de folículo secundario, se completa por la proliferación de las células de la granulosa (Tubino, F. 2012).

Los folículos en estos dos estadios se describen colectivamente como preantrales. La formación de la cavidad del folículo que forma el antro líquido es el siguiente estadio en su desarrollo (Tubino, F. 2012).

Los folículos antrales existen en el ovario bovino con diámetros comprendidos en el rango de 0.1 a 20 mm. Generalmente se acepta que la formación del antro es un evento influenciado por las gonadotrofinas y que la FSH es la principal hormona responsable. La ultrasonografía proporcionó la evidencia definitiva de que esta última fase del desarrollo folicular se producen en forma de ondas a lo largo de todo el ciclo estral (Tubino, F. 2012).

En los mamíferos, foliculogénesis se inicia en la vida fetal. Células germinales primordiales del saco vitelino migran a las gónadas en formación. Estas células germinales se multiplican por mitosis y grupos de ovogonias se forman, conectadas entre sí por interacciones citoplásmicas (Marcondes, S. et al. 2009).

En esta etapa, ovogonias están rodeados de células somáticas en el mesonefro, formando los cordones corticales que son precursores de folículos primordiales (Marcondes, S. et al. 2009).

El ovogonias se va diferenciar en ovocitos, que formarán folículos primordiales cuando se asocia con las células de la granulosa. Los ovocitos luego inician las divisiones de la meiosis, pero hay una interrupción a la profase de meiosis I, en la etapa diplóteno. Esta interrupción dura hasta que el folículo sea activado, durante lo período de actividad reproductiva empezando en la pubertad (Marcondes, S. et al. 2009).

El proceso de foliculogénesis bovina se presenta durante los períodos prepuberal, puberal, anestro postparto, ciclo estral y primeros meses de gestación. La foliculogénesis es un proceso dinámico caracterizado por una proliferación

acelerada y una diferenciación de las células somáticas que componen el folículo (Henaó, G. y Trujillo, A. 2000).

La foliculogénesis permite obtener un folículo preovulatorio o de De Graff a partir de folículos primordiales. Este proceso comienza en la vida fetal, en la cual se constituye la reserva de folículos primordiales; y en la vaca se necesitan meses para que un folículo primordial se transforme en un folículo de De Graff (Palma, G. 2001).

3. Crecimiento folicular.

Al nacimiento, los ovocitos de las especies mamíferas están bloqueados en la fase G2 de la profase de la primera división meiótica y tienen que reiniciar y completar la meiosis y la maduración para que la fecundación pueda llevarse a cabo (Castañeda, L. 2009).

La competencia meiótica, es decir, la capacidad de los ovocitos para reiniciar y completar la meiosis, se adquiere progresivamente durante el crecimiento folicular y ovocitario y está asociada a una serie de cambios nucleares y citoplasmáticos. El crecimiento y maduración folicular representan una sucesión de transformaciones subcelulares y moleculares de diversos componentes del folículo (cuadro 1) (Castañeda, L. 2009).

El ovocito, granulosa y teca, regidas por varios factores intraovarios e intrafoliculares y señales hormonales que conducen a la secreción de andrógenos y estrógenos (principalmente estradiol) (Castañeda, L. 2009).

En el crecimiento folicular intervienen la proliferación y diferenciación inducidas por hormonas de células de la teca y de la granulosa, lo que finalmente causa incremento en la capacidad de los folículos de producir estradiol y de reaccionar a las gonadotropinas (Castañeda, L. 2009).

La producción de estradiol determina cuál folículo adquirirá los receptores de LH necesarios para la ovulación y la luteinización. Las perturbaciones en la respuesta

de la granulosa y teca a las señales gonadotrópicas interrumpen el crecimiento folicular e inician la atresia (Castañeda, L. 2009).

Cuadro 1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE FOLÍCULOS OVÁRICOS.

| Componentes | Características morfológicas/fisiológicas |
|---|---|
| Células de la teca | Producen andrógenos en respuesta al incremento de los niveles basales de LH. Después de la ovulación se transforman en células luteínicas de la teca. |
| Pared folicular | Formada por granulosa/teca separadas por lamina basal; experimenta cambios en el desarrollo relacionados con la organogénesis de la glándula endocrina/exocrina. |
| Células de la granulosa | En folículos preovulatorios, hay conexión entre proyecciones de células de la granulosa a través de la lámina basal rota. Después de la ovulación, la capa granulosa es enviada por vasos/ material conectivo. |
| Corona radiada | Antes de la ovulación, el ovulo se encuentra en un extremo del folículo ovárico. |
| Folículo primordial | Folículos con oocitos localizados en el centro/una sola capa de células de la granulosa. |
| Folículo secundario | Aumenta el número de las células de la granulosa por mitosis, dichas células se hacen cuboidales. |
| Folículo vesicular | Folículos en los que se acumula líquido folicular en el antro dentro de las células epiteliales. |
| Líquido folicular (en el antro) | Algunos componentes tienen actividad fisiológica inhibidor de la maduración de oocitos, inhibidor de la unión de LH, inhibina y diversas enzimas y ácido sulfúrico de condroitina. |
| Líquido folicular (entre las células de la granulosa) | El líquido se acumula a medida que se acerca la ovulación. Muchos oocitos viejos permanecen en la superficie folicular después de la ovulación hasta que son retirados por las fimbrias. |

Fuente: Castañeda, L. (2009).

4. Folículos primarios.

La mayoría de los folículos primordiales se encuentran en un estado quiescente, sin embargo durante el comienzo del crecimiento folicular, algunos de ellos dejan de ser parte de la reserva ovárica y experimentan la transición a folículos primarios, que después se desarrollan a secundarios o terciarios en un proceso conocido como activación de folículos primordiales (Skinner, M. 2005)

El cual es gradual e irreversible. Algunos de los eventos que ocurren al inicio de esta activación son: la modificación morfológica de las células de la granulosa de aplanadas a cuboidales, la expresión de marcadores de proliferación celular y la iniciación del crecimiento del ovocito (Van den Hurk, R. et al. 1997).

Por esta razón, los folículos primarios se caracterizan por poseer un ovocito agrandado con una capa de aproximadamente 11 a 40 células cuboidales de la granulosa (Braw-Tal, R. y Yossefi, S. 1997).

En los ovarios de las especies bovinas, el 83 % de los folículos que son menos maduros que el estadio primario presentan una variación morfológica. Son de forma elipsoide y cuentan con células cuboidales localizadas en los polos del folículo, siendo interpretados como folículos primordiales con una forma elipsoide impuesta sobre ellos por los haces de los alrededores de las fibrillas de colágeno como se observa en el gráfico 2 (Rodgers, R. e Irving-Rodgers, H. 2010).

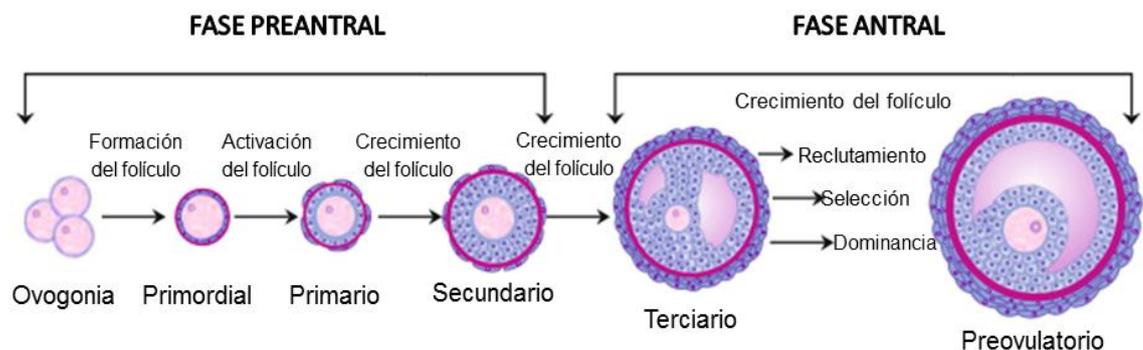


Gráfico 2. Representación esquemática del desarrollo folicular completo.

Fuente: Araújo et al. (2014).

5. Folículos secundarios.

Mientras que los folículos primarios aparecen en el ovario fetal bovino alrededor del día 140, el estadio folicular secundario se presenta cerca del día 210 y comienza con la formación de gránulos corticales en el citoplasma del ovocito, la deposición inicial de material de la zona pelúcida (ZP), el desarrollo de una segunda capa de células de la granulosa que progresa hasta la adición de 6 o 7 capas, y la síntesis de ARNm en el ovocito (Fair, T. et al. 1997).

Esta etapa concluye con el desarrollo gradual de una cavidad antral a un diámetro folicular de cerca de 250 μm y este punto, las células estromales son reclutadas para formar la capa tecal (Fortune, J. et al. 2003).

El folículo secundario adquiere entonces una estructura compleja constituida por tres tipos celulares: el ovocito que ha aumentado considerablemente de tamaño y se encuentra rodeado por la ZP, las células de la granulosa organizadas en múltiples capas y las células de la teca (Bao, R. et al. 2010).

Tanto el crecimiento del ovocito como de las células foliculares circundantes es un evento coordinado y el ovocito progresa a través de estadios morfológicos bien definidos conocidos como preantrales (Gordon, I. 2003).

En el caso de bovinos, éstos han sido clasificados en base a sus características histológicas (Cuadro 2) (Braw-Tal, R. y Yossefi, S. 1997).

Cuadro 2. CLASIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FOLÍCULOS BOVINOS PEQUEÑOS.

| Folículo | Capas de células de la granulosa | Número de células de la granulosa | Diámetro folicular (rango, μm) | Diámetro del ovocito (Media \pm D.E.) | Presencia de ZP | Teca interna definida |
|----------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--|---|-----------------|-----------------------|
| Primordia I (tipo 1) | 1 | <10 (aplanadas) | <40 | 29.7 \pm 0.3 | - | - |
| Primario (tipo 2) | 1–1.5 | 10–40 (cuboidales) | 40–80 | 31.1 \pm 0.4 | - | - |
| Preantral pequeño (tipo 3) | 2–3 | 41–100 | 81–130 | 49.5 \pm 2.4 | - | - |
| Preantral grande (tipo 4) | 4–6 | 101–250 | 131–250 | 68.6 \pm 2.8 | + | +/- |
| Antral pequeño (tipo 5) | >6 | >250 | 250–500 | 92.9 \pm 4.5 | ++ | ++ |

Fuente: Braw-Tal, R. y Yossefi, S. (1997)

Sin embargo, esta clasificación es exclusiva y resulta poco conveniente al comparar a los vacunos con otras especies. Por esa razón, también han sido agrupados de acuerdo a su diámetro como pequeños preantrales (30-90 μm), preantrales de mediano tamaño (90-150 μm) y preantrales grandes (150-220 μm) (Fortune, J. 2003).

6. Folículos terciarios.

La formación de antro en el estadio terciario empieza cuando los folículos poseen más de 250 células de la granulosa y exceden los 220 μm de diámetro. En ese

momento, varios parches llenos de líquido que se encuentran presentes en las células de la granulosa se unen para dar lugar a una cavidad, razón por la cual este tipo de folículos se denominan también antrales (Smitz, J. y Cortvrindt, R. 2002).

Esto divide a las células de la granulosa en dos grupos: las células de la granulosa cumulares (CC), que se asocian y tienen un contacto metabólico íntimo con el ovocito para originar el complejo cumulus-ovocito (COC) y las células de la granulosa murales (CGM), que se alinean a la pared folicular, y en la vaca, a un epitelio estratificado con la lámina basal (Matzuk, M. et al.2002).

El folículo consiste entonces de: i) un ovocito con un gran núcleo y prominente nucleolo rodeado por la ZP; ii) un componente somático complejo incluyendo capas internas de células columnares, que forman uniones intercelulares especializadas con el oolema, varias capas de células de la granulosa y la capa tecal externa en comunicación con los vasos sanguíneos; y iii) una gran cavidad llena de fluido folicular (Gordon, 2003).

Si su dimensión no excede los 5 mm de diámetro, es nombrado antral pequeño, si oscila entre los 5-8 mm es un folículo subordinado y si su diámetro supera los 8 mm se denomina folículo de gran tamaño (Bossart, P. et al. 2010).

Los folículos antrales han sido observados durante la vida fetal en bovinos en los días 210 al 250 de gestación y al día 270, cerca de la fecha de nacimiento, el ovario del becerro puede presentar un gran número de folículos antrales (Carambula, S. et al. 1999).

De este modo, puede decirse que el desarrollo folicular antral involucra dos fases. La primera de ellas, con folículos de 3 a 4 mm en la vaca, implica una tasa de crecimiento folicular lenta que está estrechamente relacionada con la tasa de proliferación de las células de la granulosa. Ésta, no es estrictamente dependiente del suministro de gonadotropinas (Aerts, J. y Bols, P. 2010).

La segunda fase corresponde al desarrollo terminal de los folículos antrales hasta la etapa preovulatoria. Durante esta fase, el crecimiento folicular es rápido debido a la expansión del antro (Aerts, J. y Bols, P. 2010).

Adicionalmente, el desarrollo folicular terminal se caracteriza por un incremento importante en la capacidad esteroidogénica y capacidad de respuesta de las células de la granulosa a FSH y LH, por lo que esta fase es estrictamente dependiente del suministro de gonadotropinas (Monniaux, D. et al. 1997).

Por su parte, los ovocitos se vuelven competentes para reanudar el meiótico y antes de la ovulación, un pico de LH conduce a su maduración nuclear, promoviendo la terminación de la primera división meiótica y la extrusión del primer cuerpo polar, después de lo cual ocurre un arresto en la metafase II de la meiosis II (McLaughlin, E. y McIver, S. 2009).

En el caso de los bovinos, un aumento progresivo en la habilidad de maduración y desarrollo de competencia en el ovocito, se asocia con el incremento del tamaño folicular (Blondin, P. y Sirard, M. 1995).

Ovocitos aislados de menos de folículos de menos de 3 mm tienen una pobre tasa de maduración y desarrollo de competencia comparados con ovocitos obtenidos de folículos de más de 6 mm pudiendo observarse en el gráfico 3 (Blondin, P. y Sirard, M. 1995).

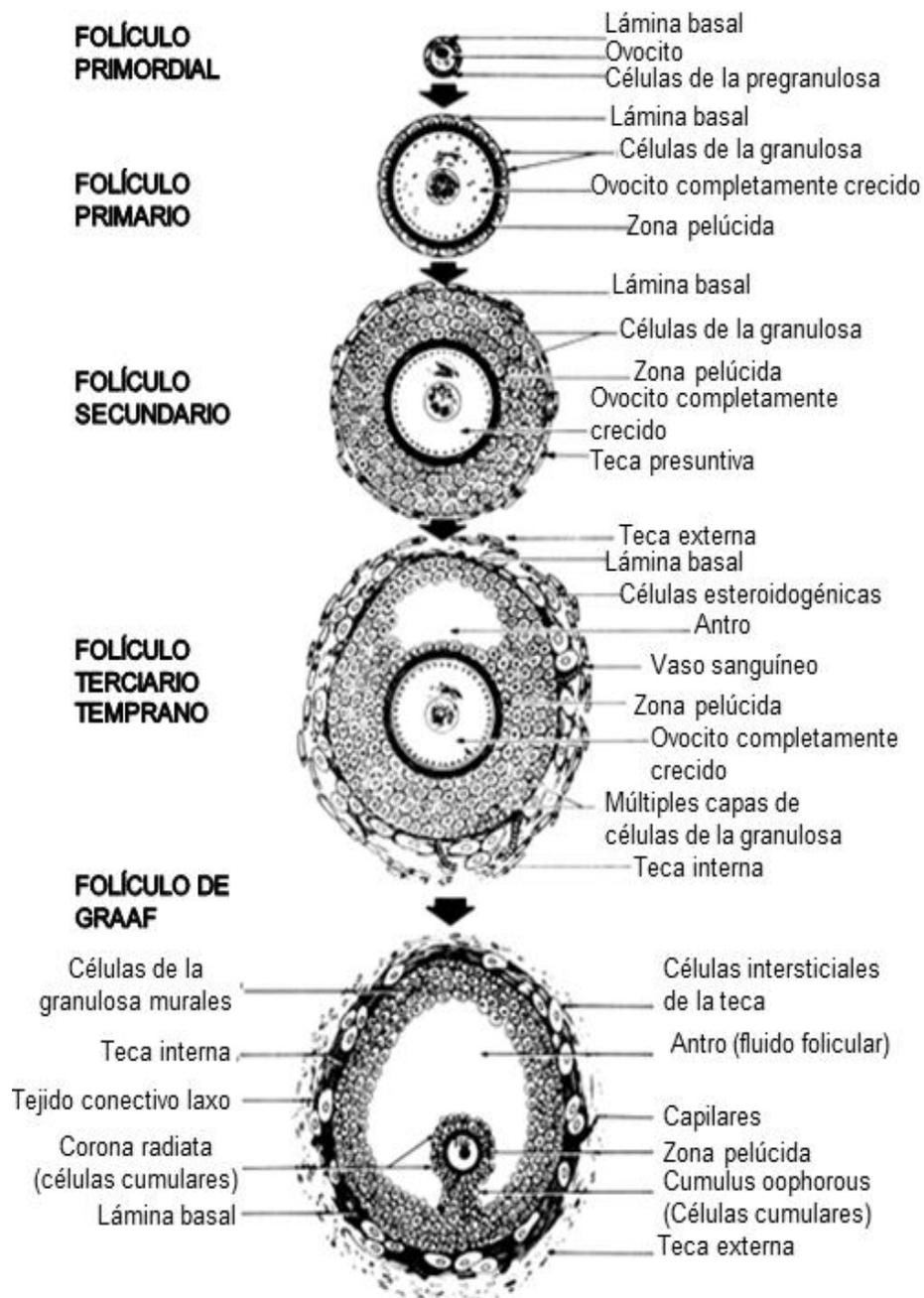


Gráfico 3. Arquitectura histológica de los folículos ováricos.

Fuente: Blondin, P. y Sirard, M. (1995).

D. RADICALES LIBRES.

Dentro de las especies radicalarias de mayor interés desde el punto de vista biológico están:

- Anión radical superóxido (O_2^-).

- Radical hidroxilo (OH).
- Óxido nítrico (NO).
- Radical dióxido de nitrógeno (NO₂).
- Radical hidroperoxilo (HO₂).
- Radical peroxilo (RO₂).
- Radical alcoxilo (RO) (Martinez, G. 2005).

De entre las principales especies reactivas de oxígeno se pueden decir que son:

1. **Radical anión superóxido (O₂⁻).**

Se forma a partir de una molécula de oxígeno en presencia de una cantidad de energía suficiente que le permita adquirir un electrón suplementario. Esta especie es producida por un gran número de enzimas, por reacciones de autooxidación y por transferencia no enzimática de e⁻ provenientes de la reducción molecular univalente del oxígeno (Martinez, G. 2005).

2. **Radical hidroxilo (OH).**

Es el radical más reactivo encontrado en los sistemas biológicos. Tiene la capacidad de reaccionar con casi todas las moléculas biológicas con constantes de velocidad (Martinez, G. 2005).

De manera habitual, el oxígeno se encuentra en su forma más estable (O₂), con los electrones que forman el enlace (p), antienlazante con el mismo espín, es decir, en lo que se conoce como estado triplete, así el oxígeno es poco reactivo con una velocidad de reacción a temperatura fisiológica baja; sin embargo por reacciones puramente químicas, por acciones enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas o sustancias prooxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos) que son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo, que llegan a producir daño celular (Gutiérrez, C. y Venereo, J. 2002).

Por lo anteriormente expuesto se comprende que si bien el oxígeno es imprescindible para el metabolismo y las funciones del organismo, no se deben olvidar los muchos efectos tóxicos que posee (Gutiérrez, C. y Venereo, J. 2002).

Por otro lado, a través de diferentes estudios se ha encontrado que el oxígeno puede llegar a ser tóxico, cuando los seres vivos se exponen a altas concentraciones por encima de los niveles atmosféricos, lo que puede conllevar a daños tanto reversibles como irreversibles, llegando hasta la muerte celular dicho efecto nocivo involucra el proceso de reducción parcial del oxígeno, mediante el que se obtienen las especies reactivas de oxígeno (EROS) (Corrales, L. & Muñoz, M. 2012).

Esta moléculas pueden convertirse en peligrosos productos del metabolismo celular, debido a que cuando se rompe el equilibrio entre sustancias prooxidantes (EROS) y sustancias antioxidantes se genera estrés oxidativo y por ende diversos procesos patológicos (Corrales, L. & Muñoz, M. 2012).

E. ESTRÉS OXIDATIVO.

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores pro oxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno (Gutiérrez, C. & Venereo, J. 2002).

Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés médico-social, involucrado en la génesis y en las consecuencias de dichos eventos (Gutiérrez, C. & Venereo, J. 2002).

El oxígeno es un elemento que presenta un perfil con doble efecto fisiológico; es esencial para el desarrollo de la vida aerobia y posee efectos tóxicos inherentes a su estructura. Del oxígeno se derivan moléculas inestables denominadas radicales libres que pueden causar daño a nivel celular, cuando se pierde el equilibrio entre dichas moléculas y el sistema de defensa antioxidante que poseen los seres vivos, generando así lo que se denomina estrés oxidativo (Corrales, L. & Muñoz, M. 2012).

Dicho mecanismo posee una estrecha relación con el desarrollo y evolución de una gran variedad de procesos degenerativos, enfermedades y síndromes. Su estudio se ha centrado principalmente en el conocimiento de los mecanismos de su génesis y las formas de; atenuar, disminuir o contrarrestarlas, por medio de los sistemas de defensa antioxidante que posee la célula y la forma de controlar los radicales libres que se generan de forma normal y continua en el organismo resultado de algunos procesos celulares como el relacionado con el metabolismo oxidativo de la mitocondria, proceso necesario para la obtención de ATP (Corrales, L. & Muñoz, M. 2012).

F. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO).

Especies reactivas del oxígeno (ERO) es el término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales (Avello, M. & Suwalsky, M. 2006).

En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático, que es el normal funcionamiento de los mecanismos de regulación que conservan el estado normal fisiológico de los organismos (Avello, M. & Suwalsky, M. 2006).

En mamíferos son muchos los procesos fisiopatológicos causados por estas especies tales como los mecanismos patogénicos asociados a virus, bacterias, parásitos y células anormales, constituyendo un mecanismo de defensa del organismo frente a estos agresores. Cuando el aumento del contenido intracelular

de ERO sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Avello, M. & Suwalsky, M. 2006).

El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer (Avello, M. & Suwalsky, M. 2006).

El oxígeno es una molécula básicamente oxidante, hasta el punto que en las células que lo utilizan para su metabolismo es el principal responsable de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO). Sin embargo, no todas las especies oxidantes tienen un origen endógeno; la existencia de factores exógenos, como la radiación solar, toxinas fúngicas, pesticidas o xenobióticos, pueden incrementar su nivel (Avello, M. & Suwalsky, M. 2006).

En condiciones normales, las células metabolizan la mayor parte del oxígeno (O_2) con la formación de agua sin formación de intermediarios tóxicos, mientras que un pequeño porcentaje (en torno al 5%) forman tres intermediarios altamente tóxicos, dos de los cuales son literalmente radicales libres (el anión superóxido y el hidroxilo). En situaciones en las que exista una mayor actividad metabólica (etapas del crecimiento, desarrollos activos o procesos inflamatorios) ocurre una mayor demanda tisular de O_2 y parte de él se metaboliza, generándose un alto número de sustancias oxidantes (Avello, M. & Suwalsky, M. 2006).

La segunda gran fuente de ERO también es endógena y está constituida por el metabolismo de las células defensivas tales como los polimorfonucleares, los monocitos sensibilizados, los macrófagos y los eosinófilos. Para que éstas puedan cumplir su misión, están dotadas de diversas proteínas así como de vías metabólicas que generan varias especies químicamente agresivas como peróxido de hidrógeno, radicales superóxido e hidroxilo, cuyo fin último es lesionar y destruir elementos extraños (Avello, M. & Suwalsky, M. 2006).

En condiciones normales estas especies reactivas son producidas y utilizadas en compartimentos celulares como los lisosomas que, aunque en el interior de los fagocitos, no tienen por qué dañar a las células siempre y cuando los mecanismos antioxidantes de éstas funcionen adecuadamente (Avello, M. & Suwalsky, M. 2006).

Los oxidantes pueden también proceder del exterior, bien sea directamente o como consecuencia del metabolismo de ciertas sustancias. Algunos ejemplos lo constituyen la contaminación ambiental, la luz solar, las radiaciones ionizantes, una concentración de oxígeno demasiado elevado, los pesticidas, metales pesados, la acción de ciertos xenobióticos (cloroformo, paracetamol, etanol, tetracloruro de carbono, violeta de genciana) o el humo de tabaco (Avello, M. & Suwalsky, M. 2006).

Sin embargo el papel de los radicales libres no ha de ser abordado sólo desde una perspectiva negativa o patológica. Estos compuestos cumplen también una función fisiológica al participar, en condiciones normales, en la defensa frente a las infecciones, en el metabolismo normal, en la fagocitosis e inflamación como se puede ver en el gráfico 4 (Avello, M. & Suwalsky, M. 2006).

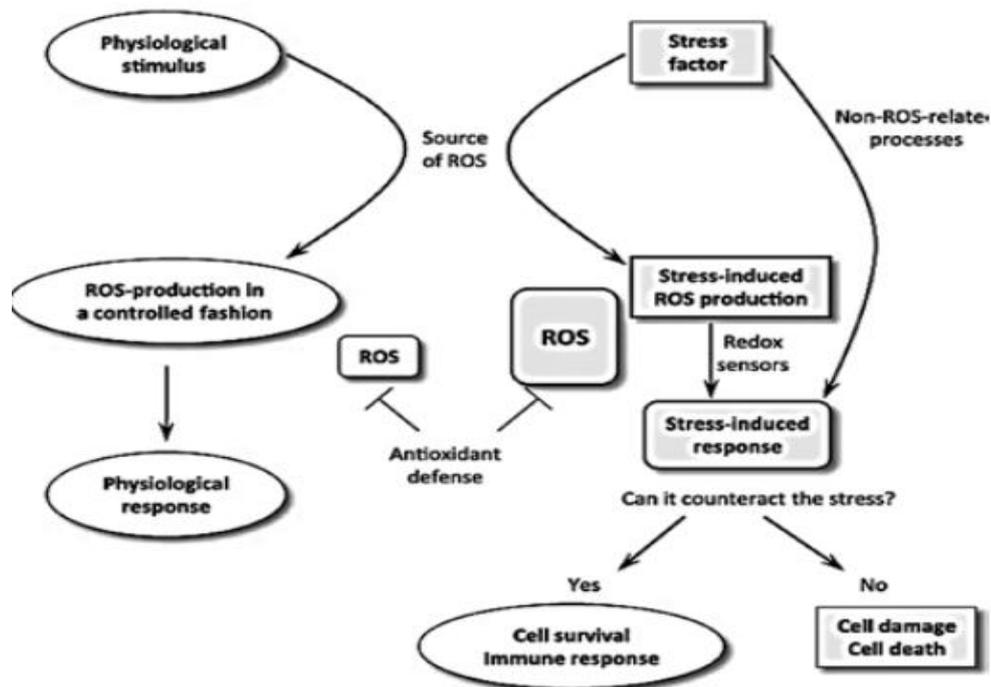


Gráfico 4. Respuesta celular frente a la formación de EROS a través de estímulos fisiológicos.

Fuente: Corrales, L. & Muñoz, M. (2012).

G. Metionina Sulfóxido Reductasa A (MSRA).

La oxidación de las proteínas por especies de oxígeno reactivo está asociada con el envejecimiento, el estrés oxidativo y muchas enfermedades. Aunque los residuos de metionina libres y unidos a proteínas son particularmente sensibles a la oxidación a derivados de sulfóxido de metionina, estas oxidaciones se reparan fácilmente mediante la acción de la metionina sulfóxido reductasa (MsrA) (Moskovitz, J. et al. 2001).

1. Oxidación de la metionina por ROS y acción de las metionina sulfóxido reductasas (Msrs).

Muchos aminoácidos libres o aquellos que conforman proteínas son expuestos a modificaciones oxidativas por ROS. Junto con la cisteína (Cys) y el triptófano (Trp), la metionina (Met) es un aminoácido altamente susceptible a la oxidación. Cuando esto ocurre, se genera como producto la metionina sulfóxido (MetSO) como una

mezcla de dos epímeros, metionina-R-sulfóxido (Met-R-SO) y metionina-S-sulfóxido (Met-S-SO), lo que resulta en la conversión de un residuo hidrofóbico a uno hidrofílico (Weissbach, H. et al., 2005).

Esta modificación puede afectar la función y estructura secundaria de las proteínas alterando su actividad biológica, señalamiento celular o determinantes de virulencia (Lee, B. 2010).

El proceso es irreversible y es llevado a cabo por las Msrs que catalizan la reducción de la MetSO a Met en proteínas (Friguet, B. 2006). Esta reacción parece ser crítica en la reversión del daño oxidativo a las estructuras peptídicas (Luo, S & Levine, R. 2009).

Hasta el momento, han sido descritas dos clases estructuralmente no relacionadas de Msrs: MsrAs, que reducen estereoespecíficamente el isómero S y MsrBs, que reducen el isómero R en el átomo de azufre del MetSO (Neiers, F. et al. 2004).

Ambas Msrs se caracterizan por presentar un mecanismo catalítico de 3 pasos. En el primer paso, denominado reductasa, se produce ácido sulfónico en la Cys catalítica de la enzima con la liberación conjunta de metionina. En el segundo paso, se forma un enlace intradisulfuro vía el ataque de una segunda Cys (la Cys de reciclaje) en el intermediario ácido sulfónico y se libera una molécula de agua. Finalmente, en el último paso el enlace disulfuro de Msr oxidada es reducido por tiorredoxina (Trx) pudiendo observarse en el gráfico 5 (Boschi-Muller, S. et al. 2008).

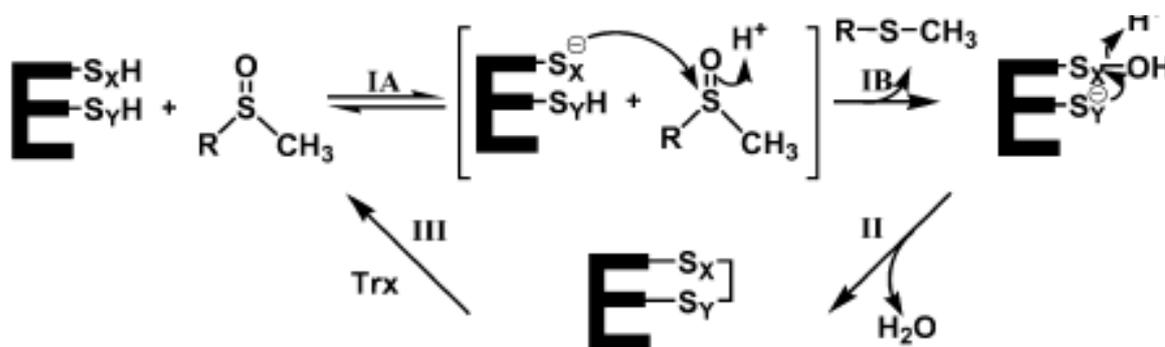


Gráfico 5. Mecanismo catalítico de tres pasos de MsrS.

Fuente: Boschi-Muller, S. et al. (2008).

En el paso I, se forma un complejo Michaelis entre Msr y MetSO (paso IA), el cual precede el ataque nucleofílico de Cys-X en el átomo de azufre del radical sulfóxido del MetSO, conduciendo a la formación de un ácido sulfónico intermediario en Cys-X con una liberación concomitante de Met (paso IB) (Boschi-Muller, S. et al. 2008).

En el paso II, el ataque nucleofílico de Cys-Y en el átomo de azufre del ácido sulfónico conduce a la formación de un enlace disulfuro Cys-X/Cys-Y y a la liberación de una molécula de agua. En el paso III, el sitio activo regresa a un estado totalmente reducido vía reducción del enlace disulfuro de la Msr por tioredoxina. RSOCH₃ y RSCH₃ representan MetSO y Met, respectivamente (Boschi-Muller, S. et al. 2008).

2. Determinación de la protección de MSRA contra el daño oxidativo.

MSRA es capaz de proteger a células procariotes y eucariotes del estrés oxidativo. Se ha demostrado que cepas de *E. coli* carentes de *MsrA* son susceptibles a muerte por ROS como el H₂O₂ y a intermediarios reactivos de nitrógeno como el nitrito y S-nitrosoglutatión (GNSO) (John, G. et al. 2008).

Por su parte, mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* que sobreexpresaron la proteína, al ser expuestas a H₂O₂, o al tratamiento con dihidrocloruro de 2,2-azobis-(2-amidinopropano) crecieron mejor que la cepa control y presentaron menor

cantidad de MetSO libre y unida a proteínas, así como una mejor tasa de supervivencia; mientras que linfocitos T humanos (Molt-4) que fueron transfectados con la *MsrA* de bovinos, tuvieron una resistencia incrementada al tratamiento con H_2O_2 y su tasa de supervivencia mayor que la cepa parental (Moskovitz et al., 1998).

Finalmente, células neuronales PC12 con capacidad de sobreexpresión de MSRA sometidas a estrés oxidativo por hipoxia y reoxigenación, lograron disminuir los niveles de ROS, logrando mayor la supervivencia celular (Yermolaieva, O. et al. 2004).

H. INVESTIGACIÓN MOLECULAR Y EXPRESIÓN GÉNICA.

1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR convencional, creada por Kary Mullis (1984), es un método in vitro que usando dos cebadores delimita y amplifica una secuencia específica de DNA a través de varios ciclos (Moreno, M. 2017).

Los resultados son cualitativos y sólo puede ser observado el producto final en un gel de agarosa por el proceso de electroforesis. La técnica de PCR consta de una denaturación inicial, seguida de una secuencia de ciclos y termina con una extensión final. Cada ciclo de amplificación se da en tres fases: denaturación, alineamiento y extensión (Corvalán, A. 2002).

En la denaturación la temperatura de incubación se eleva entre 90-96 °C para separar las hebras, cada hebra servirá como molde para la creación de las siguientes cadenas complementarias. El alineamiento (40-60 °C) es la fase en donde los cebadores se unen a cada una de las hebras separadas en el paso previo, a partir de ésta unión, la DNA polimerasa sintetiza una hebra complementaria a la inicial, ésta fase se denomina extensión (70-72 °C) (Corvalán, A. 2002).

2. Transcripción inversa (RT-PCR).

Es un proceso catalizado por una enzima llamada transcriptasa inversa, en donde, una molécula de RNA es usada como molde para formar una molécula de DNA complementaria al molde, éste proceso se llama transcripción inversa o retrotranscripción (Roca, Oliver, & Rodriguez, 2003).

.Toma el nombre de retrotranscripción debido a que ciertos virus usan éste recurso como método de supervivencia ya que no poseen DNA sino RNA para la transmisión genética a su progenie, estos virus se llaman retrovirus y la enzima encargada de éste proceso es la retrotranscriptasa (Roca, Oliver, & Rodriguez, 2003).

3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

La PCR de tiempo real, a diferencia de la convencional, detecta la presencia de ácidos nucleicos, lo amplifica y determina cuantitativamente lo amplificado en el momento que se da la reacción (Pierce, B. 2009).

La qPCR funciona solamente a partir de DNA, en el caso de tener RNA como punto de partida se realiza previamente una retro transcripción o transcripción inversa para obtener una cadena de DNA complementaria (cDNA) al RNA inicial, de éste modo se puede detectar la expresión génica a partir de DNA y RNA (Pierce, B. 2009).

La reacción de la PCR en tiempo real se da en 4 fases: la inicial linear donde la fluorescencia expresa la línea de base, la fase exponencial temprana donde la fluorescencia llega a la línea del umbral, la fase logarítmica cuando la fluorescencia cruza el umbral, en ésta fase los datos son recolectados y la fase plateu donde los productos de la PCR escasean (Wong, M. & Medrano, J. 2005).

Existen diferentes tipos de kits empleados en qPCR, entre ellos tenemos a TaqMan® y SYBR® Green empleados en sistemas de un solo paso. SYBR® Green utiliza como fluoróforo SYBR® Green I que se une al DNA de cadena doble para

emitir fluorescencia, cuando se da la denaturación la fluorescencia desciende ya que el fluorocromo se libera, al formarse el producto de PCR el fluorocromo se une al amplicon de doble cadena generando una fluorescencia que es detectada por el equipo. TaqMan a diferencia de SYBR Green, utiliza una sonda marcada fluorogénicamente; en el extremo 5' y 3' está marcada por un fluoróforo diferente denominados reportero y quencher respectivamente. Al unirse la sonda marcada a la hebra molde, el reportero se libera emitiendo fluorescencia. La acumulación de fluorescencia es lo que permite la visualización de cada fase en el momento en que ocurre, estos datos se recopilan en un sistema computarizado (Applied Biosystems AB. 2010).

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO.

La presente investigación se realizó en el país de México, en el estado de Chihuahua en la Universidad Autónoma de Chihuahua y en la Facultad de Zootecnia y Ecología respectivamente.

El trabajo experimental de campo tuvo una duración de 60 días aproximadamente, las condiciones meteorológicas se detallan a continuación.

Cuadro 3. CONDICIONES METEOROLÓGICAS DEL ESTADO DE CHIHUAHUA

| PARÁMETRO | PROMEDIO |
|---------------------|----------|
| Altitud, msnm | 1444 |
| Temperatura, °C | 25 |
| Humedad relativa, % | 40 |
| Viento, Km/h | 8 |
| Precipitación, mm | 0.0 |

Fuente: Estación CHIHUAHUA UNIVERSIT. (2014).

B. UNIDADES EXPERIMENTALES.

Las unidades experimentales para la siguiente investigación fueron muestras de ARN de células foliculares bovinas, teniendo cuatro muestras con dos repeticiones.

- Células cumulares inmaduras 1
- Células cumulares inmaduras 2.
- Células cumulares maduras 1.
- Células cumulares maduras 2
- Coc inmaduro 1
- Coc inmaduro 2.
- Coc maduro 1.

- Coc maduro 2.

Por lo que para cada tipo de muestra a la cual se analizó, se realizaron tres réplicas técnicas para validar el proceso experimental en el análisis de la presencia del gen MSRA.

C. MATERIALES EQUIPOS E INSTALACIONES.

1. Materiales:

- Bata.
- Calculadora.
- Cuaderno.
- Esfero gráfico.
- Marcador permanente.
- Hojas para notas.
- Balanza analítica.
- Micro-Pipetas.
- Puntillas de micropipetas.
- Tubos cónicos de 5mm
- Guantes de Látex.
- Cubre-boca.
- Libreta de apuntes
- Matraces.
- Canastillas.
- Probetas.

2. Equipos:

- NanoDrop.
- Termociclador.
- Cámara de electroforesis.
- Fotodocumentador.

- PCR Tiempo Real (qPCR).
- Computadora.
- Impresora.
- Escáner.

3. **Reactivos:**

- Master mix.
- Sonda de Histona.
- Sonda de Msra.
- Sonda RNA 18s.
- Kit high Capacity RNA to cDNA.
- Kit DNase.
- Marcador de peso molecular de 200 pare de bases (pb).
- Marcador de peso molecular de 1000 pares de bases (pb).

4. **Instalaciones:**

- Laboratorio de Transgénesis y fertilización in vitro.

D. TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL.

Por tratarse de una investigación de tipo cualitativa y al no haber utilizado tratamientos con las unidades experimentales, no se aplicó un diseño experimental.

E. MEDICIONES EXPERIMENTALES.

Presencia de la expresión del gen MSRA en las siguientes células foliculares:

- COC maduro 1.
- COC maduro 2.
- COC imaduro 1.
- COC imaduro 2.

- Células cumulares maduro 1.
- Células cumulares maduro 2.
- Células cumulares inmaduro 1.
- Células cumulares inmaduro 2.

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA.

Los resultados experimentales fueron sometidos a los siguientes análisis estadísticos:

- Estadística Descriptiva (Medias, Desviación Estándar).
- Prueba T-student.

G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

Para el desarrollo de la presente investigación se utilizó ARN obtenido a partir de coqs maduros e inmaduros, así como de células cumulares provenientes de coqs maduros e inmaduros y de cada muestra se realizó 3 repeticiones.

Cabe mencionar que este ARN es producto de trabajo de tesis de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

1. Corroboración de ARN puro.

Para corroborar el ARN puro se cuantificó las muestras mediante el equipo de NanoDrop donde determinó la cantidad de nanogramos de ácidos nucleicos por microlitro de muestra (ng/ul) después las muestras fueron sometidas a pruebas de PCR convencional y fue observado el gel de agarosa en el fotodocumentador donde determino la presencia de ARN.

Es de gran importancia que no contenga ADN de ningún tipo en las muestras, sin embargo se detectó presencia de ADN genómico en las muestras de coc maduro 1

y coc maduro 2 por lo que se procedió a lisar el mismo mediante un lisador de tipo comercial “DNAse”.

Después de lisar el ADN se realizó una electroforesis pero esta vez con las muestras que presentaron mayor cantidad de nanogramos de ácidos nucleicos por microlitro de muestra (ng/ul) donde se demostró que las muestras experimentales estaban completamente integras de ARN y sin contaminantes.

2. Síntesis de ADN complementario.

Se verificó la cantidad e integridad del ARN, y después de esto se procedió a sintetizar ADN complementario con el kit “High Capacity RNA to cDNA” de la casa comercial TermoFisher Scientific.

Mediante una qPCR se analizó la presencia de ADN complementario con una sonda RNA 18S.

3. Análisis de la expresión del gen MSRA.

Una vez que se verificó la presencia de ADN complementario en las muestras respectivamente se procedió a analizar por triplicado las muestras incluidas las muestras de ADN complementario negativas.

Todas las muestras estuvieron bajo el control de la sonda de MSRA al igual que para una comparación de expresión se la comparo con una sonda de gen endógeno HISTONA.

H. METODOLOGÍA DE LA EVALUACIÓN.

1. Integridad de ARN.

La integridad de ARN se obtuvo al someter a las muestras a una PCR convencional y después realizada una electroforesis se pudo identificar en un fotodocumentador

os patrones de bandeo según el tipo de marcador de peso molecular que se haya utilizado para el ensayo.

2. Síntesis de ADN complementario.

Se determinó la presencia de ADN complementario mediante los Cycle Treshold (Umbrales de ciclo) de cada muestra analizada en el equipo de PCR en tiempo real.

3. Expresión del gen MSRA.

Se evaluó la expresión del gen MSRA mediante los Cycle Treshold (Umbrales de ciclo) de cada muestra que se analizó en el equipo de PCR en tiempo real con la sonda de MSRA, sin embargo se comparó las muestras frente a una sonda endógena de HISTONA.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

A. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN MSRA EN CÉLULAS FOLICULARES BOVINAS.

1. Integridad de ARN.

Según, Rodríguez-Tarduchy, G. (2014), la integridad de las muestras de ARN es fundamental en el contexto de los análisis de expresión génica mediante la tecnología de microarrays o de PCR en tiempo real. Basándonos en ello podemos decir que las muestras de células cumulares inmaduras 1, células cumulares inmaduras 2, células cumulares maduras 1, células cumulares maduras 2, coc inmaduro1 y coc inmaduro 2 tienen ARN con una integridad absoluta.

Las muestras de coc maduro 1 y coc maduro 2 presentan bandas en el gel de agarosa visto en el fotodocumentador demostrando que tiene ADN contaminante (Gráfico 6) posteriormente se aplicó un lisador de tipo comercial "DNase" para degradar el ADN.

Una vez aplicado el lisador de ADN fueron cuantificadas en el equipo de NanoDrop donde obtuvimos una pureza alta como se puede ver en el cuadro 4.

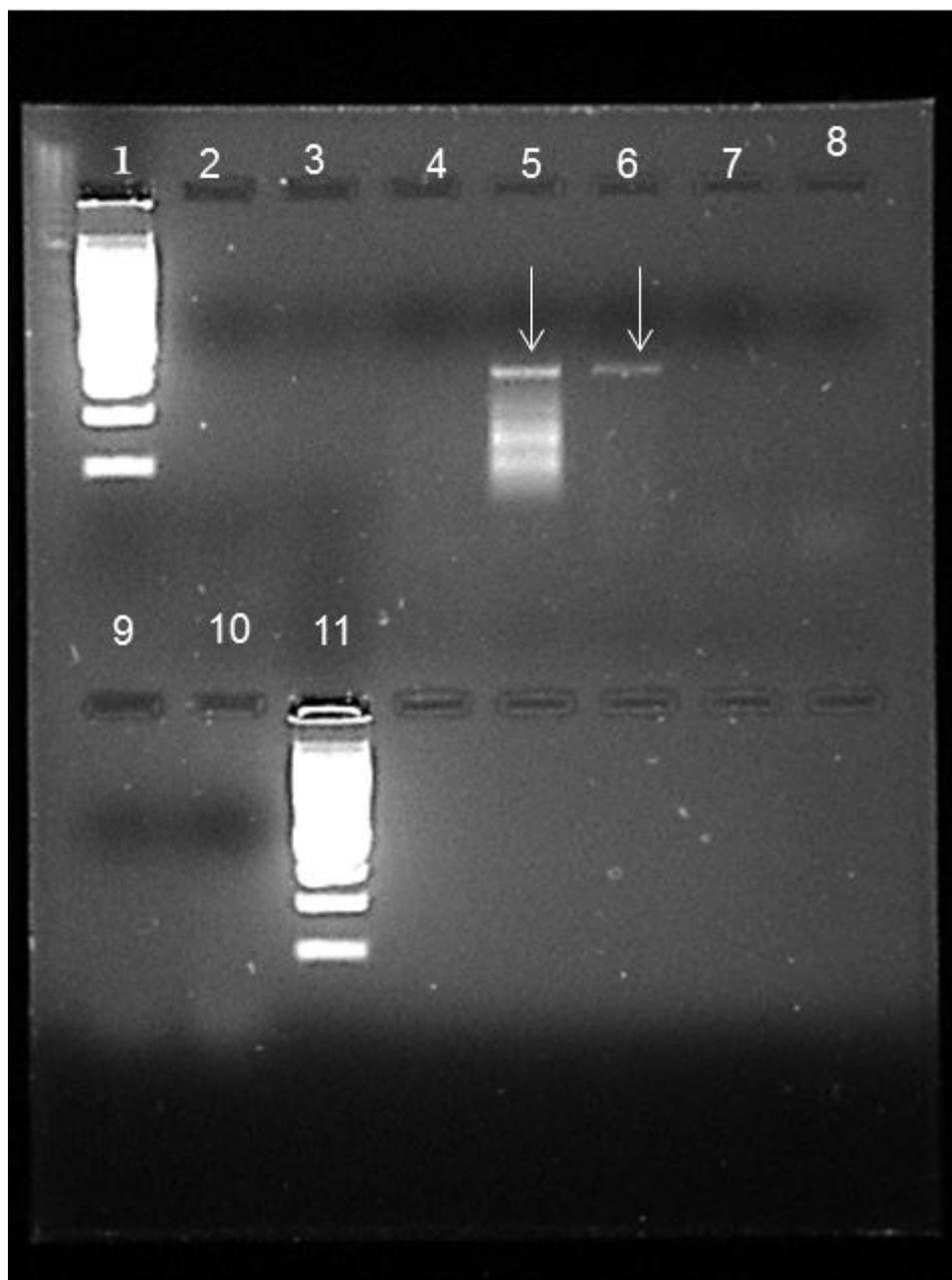


Gráfico 6. Bando de las muestras de ARN.

(Gráf.6 Gel de agarosa con las muestras cargadas en los pozos 1) Marcador de peso molecular de 200pb; 2) Control positivo de Ovario; 3) Coc inmaduro 1; 4) Coc inmaduro 2; 5) Coc maduro 1; 6) Coc maduro2; 7) Células cumulares inmaduras 1; 8) Células cumulares inmaduras 2; 9) Células cumulares maduras 1; 10) Células cumulares maduras 2; 11) Marcador de peso molecular de 200 pb).

Cuadro 4. CANTIDAD DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

| Muestras | Concentración | Pureza | |
|-------------------------------------|---------------|-----------|-----------|
| | ng /ul | (260/280) | (260/230) |
| Coc inmaduro 1 | 111,8 | 1,61 | 0,40 |
| Coc inmaduro 2 | 277 | 2,23 | 0,32 |
| Coc maduro 1 | 159,7 | 2,10 | 0,18 |
| Coc maduro 2 | 114,8 | 1,57 | 0,34 |
| Células cumulares inmaduras 1 | 224,2 | 1,69 | 0,33 |
| Células cumulares inmaduras 2 | 218,6 | 1,76 | 0,57 |
| Células cumulares maduras 1 | 113,8 | 1,64 | 0,39 |
| Células cumulares maduras 2 | 196,3 | 1,67 | 0,40 |

Fuente: Lema, M. (2017)

MORENO, M. (2017), Indica que la pureza tiene una razón 260/280 valores cercanos 1.8 indican alta pureza. Razón 260/230 valores cercanos a 2 indican alta pureza.

Posteriormente se corroboró mediante una prueba de PCR convencional con las muestras que mayor cantidad de ácidos nucleicos posean, dándonos como resultado final la presencia de ARN puro en todas las muestras ya que se puede observar bandas en el rango de entre 750-1000 (Gráfico 7).

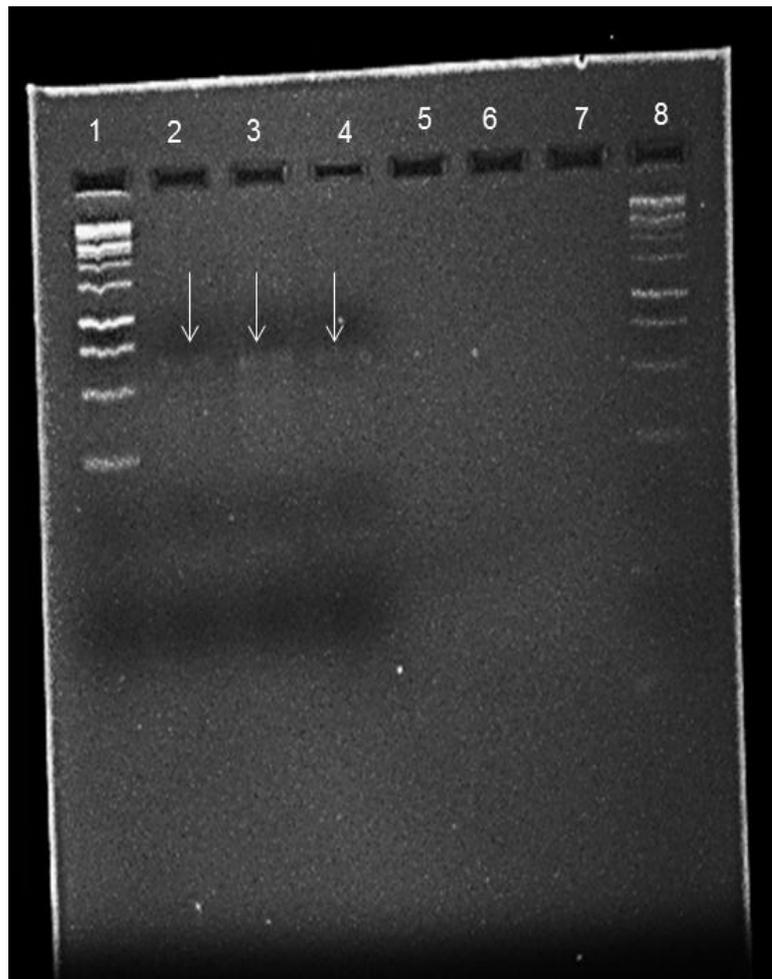


Gráfico 7. Bando de ARN después de aplicar el lisador de ADN.

(Gráf.7 Gel de agarosa con las muestras cargadas en los pozos 1) Marcador de Peso Molecular de 1000pb; 2) Celulas cumulares inmaduras 1; 3) Celulas cumulares inmaduras 2; 4) Coc inmaduro 1; 8) Marcador de peso moleculares de 1000pb).

2. Síntesis de ADN complementario.

FIBAO. (2017), señala que el ADN complementario ADNc o (cDNA) es una molécula de ADN complementaria a una molécula de ARNm.

Roca, P. et al. (2003), indica que la transcripción inversa (RT-PCR) es un proceso catalizado por una enzima llamada transcriptasa inversa, en donde, una molécula

de RNA es usada como molde para formar una molécula de DNA complementaria al molde, éste proceso se llama transcripción inversa o retrotranscripción. Toma el nombre de retrotranscripción debido a que ciertos virus usan éste recurso como método de supervivencia ya que no poseen DNA sino RNA para la transmisión genética a su progenie, estos virus se llaman retrovirus y la enzima encargada de éste proceso es la retrotranscriptasa.

Pierce, B. (2009), menciona que la PCR de tiempo real, a diferencia de la convencional, detecta la presencia de ácidos nucleicos, lo amplifica y determina cuantitativamente lo amplificado en el momento que se da la reacción. La qPCR funciona solamente a partir de DNA, en el caso de tener RNA como punto de partida se realiza previamente una retro transcripción o transcripción inversa para obtener una cadena de DNA complementaria (cDNA) al RNA inicial, de éste modo se puede detectar la expresión génica a partir de DNA y RNA.

Porterfield, A. (2017), considera que los valores de Cycle Treshold (Ct) son inversos a la cantidad de ácido nucleico que se encuentra en la muestra, y se correlacionan con el número de copias en la muestras. Bajos valores de Ct indican altas cantidades de ácido nucleico, mientras que Ct con valores bajos demuestran cantidades medianas (incluso demasiado poco) de ácido nucleico. Típicamente, Ct por debajo de 29 ciclos muestran ácidos nucleicos abundantes, y Ct por encima de 38 ciclos indican cantidades mínimas, y, posiblemente, una infección o contaminación ambiental.

Siendo así se obtuvo un ensayo positivo obteniendo promedios de Cycle Treshold (Ct) inferiores a 35 Ct (Anexo 1 y Gráfico 8) para el gen de ARN 18s, un gen endógeno que con ello podemos comprobar que hay ADN complementario sintetizado.

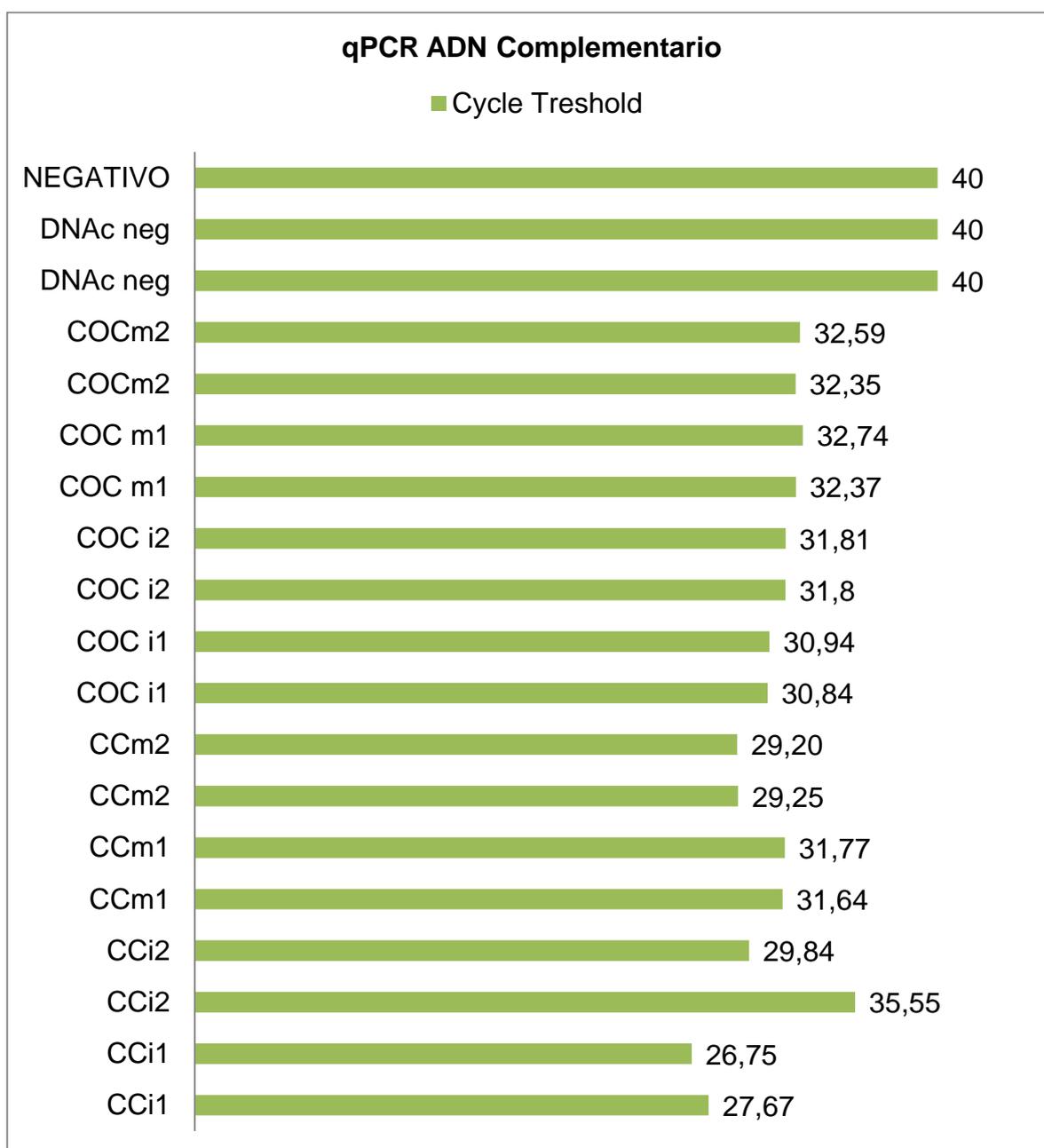


Gráfico 8. Cycles tresholds de la qPCR para ADN complementario.

3. Expresión del gen MSRA.

Para la variable de expresión génica se puede decir que los grupos COCs (Cumulus-ovocito) maduro 1 y 2 al igual que el coc inmaduro 2 desencadenan en la expresión del gen MSRA, obteniendo valores inferiores a 35 Cycle Treshold en la qPCR (Anexo1) sin embargo la muestra de coc inmaduro 1 no amplificó.

La expresión del gen MSRA en la muestra de Coc inmaduro 2 tuvo como promedio $30,26 \pm 0.28$ Ct y los Ct detallados se aprecian en el gráfico 9 sin embargo no se obtuvo diferencias significativas siendo positivo para este tipo de ensayos (Anexo2)

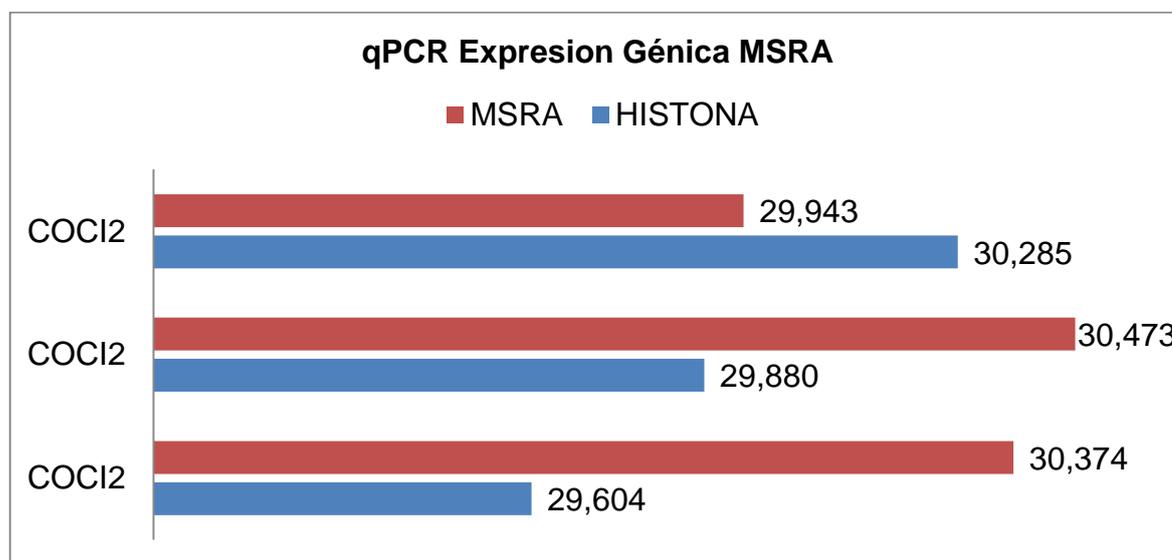


Gráfico 9. Expresión génica del COCI2.

La expresión del gen MSRA en la muestra de Coc maduro 1 tuvo como promedio $31,03 \pm 0.76$ Ct y los Ct detallados se aprecian en el gráfico 10 sin encontrarse diferencias significativas (Anexo3)

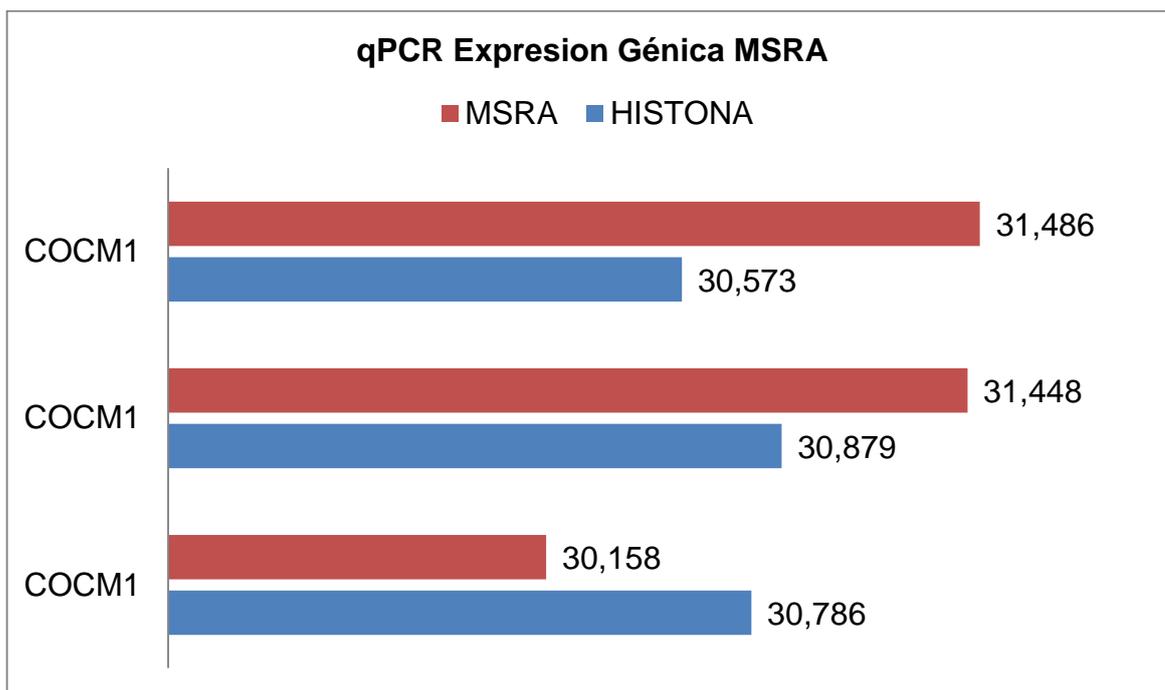


Gráfico 10. Expresión Génica del COCM1.

La expresión del gen MSRA en la muestra de Coc maduro 2 tuvo como promedio $30,40 \pm 0,23$ Ct y los Ct detallados se aprecian en el gráfico 11 sin encontrarse diferencias significativas (Anexo4).

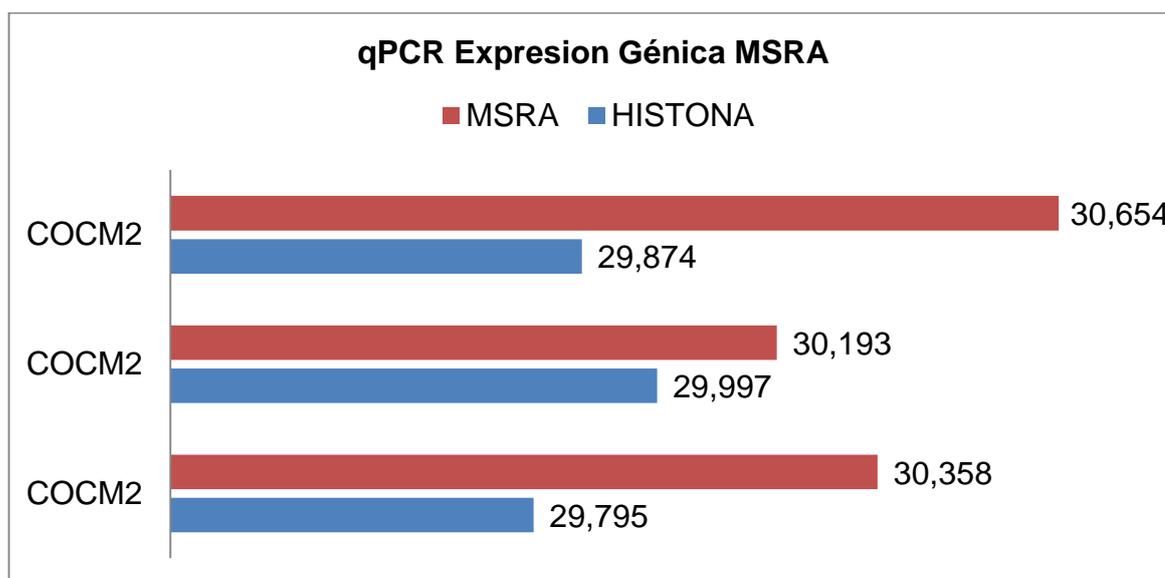


Gráfico 11. Expresión génica del COCM2.

Según, Gonzales, C. (2016), el análisis de la expresión de MSRA en distintos tipos celulares de folículos antrales grandes, reveló la presencia del ARNm únicamente en células de la granulosa, mostrando que ni ovocitos inmaduros ni ovocitos maduros expresan la enzima antioxidante.

IV. CONCLUSIONES

- La integridad de ARN es un factor clave en el análisis de expresión génica y al ser contaminado por ADN de cualquier tipo que sea debe ser sometido a una purificación de la misma aplicándole lisador de tipo comercial, siendo “DNase” de Thermo Fisher Scientific el más recomendable.
- La síntesis de ADN complementario puede tener falencias si no se tiene el cuidado necesario al momento de pipetear las muestras, ya que la presencia del gen MSRA se detectó en las muestras (Cocs), sin embargo en la muestra de Coc inmaduro 1 no amplificó en la qPCR pudiendo deberse a una falla en el pipeteo.
- La identificación del gen MSRA en las células foliculares bovinas podría tener un impacto de relevancia dando la importancia en el proceso de maduración de ovocitos, ya que las células con presencia del mismo, podrían ser más eficientes al desechar residuos de procesos metabólicos y elevar el porcentaje de blastocitos en el método in vitro.

VI. RECOMENDACIONES

- Seleccionar Cocs que expresen el gen Metionina Sulfóxido Reductasa A (MSRA) en procesos de fertilización in vitro, ya que tiene un papel importante de eliminación de ROS en el proceso de foliculogénesis bovina.
- Realizar una investigación, para determinar en qué porcentaje se podría elevar la obtención de blastocitos mediante la selección de ovocitos que expresen el gen MSRA frente a ovocitos que no expresan el gen.
- Determinar el beneficio-costo en la vida real productiva al aplicar la técnica de expresión génica para MSRA, en los procesos de reproducción y mejoramiento bovino.

VII. LITERATURA CITADA.

1. Aerts, J., & Bols, J. (2010). *Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species*. Part ii: antral development, exogenous influence and future prospects reprod. Dom. Anim. pp. 180–187. España
2. Applied biosystems ab. (2010). *Power sybr® green rna-to-ct™ 1-step kit*. Life technologies. pp. 45-68. México.
3. Araújo, F., Gastal, J., Figueiredo, R., & Gastal, L. (2014). *In vitro culture of bovine preantral follicles: a review*. *Reproductive biology and endocrinology*. pp. 78-91. México
4. Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). *Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección*. Atenea (concepc.) pp.161-172. U.S.A.
5. Bao, M., Yamasaka, E., Moniruzzaman, M., Hamawaki, A., Yoshikawa, M., & Miyano. T. (2010). *Development of vitrified bovine secondary and primordial follicles in xenografts*. *Theriogenology*. pp. 817– 827. U.S.A.
6. Blondin, P., Sirard, M. (1995). *Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competency in bovine oocytes*. *Mol. Reprod. Dev*. pp. 54-62. México.
7. Boschi-muller, S., Gand, A., Branlant, G. (2008). *The methionine sulfoxide reductases: catalysis and substrate specificities*. *Biochemistry and biophysics*. pp. 266-273. México.
8. Bossaert, P., De cock, H., Leroy, J., De campeneere, S., Bols, P. Filliers, M., Opsomer, G. (2010). *Immunohistochemiscal visualization of insulin receptors in formalin-fixed bovine ovaries post mortem and in granulosa cells collected in vivo*. pp. 1210-1217. México.
9. Braw-tal, R., & Yossefi, S. (1997). *Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary*. *J. Reprod. Fertil*. pp. 165-171. México.
10. Burrola, M., & González, E. (2015). *Efectos de los rnam maternos sobre la maduracion del ovocito y el desrrollo embrionario temprano en mamiferos*. *Rev. Mex. Ciencias. Pecuarias* tomo 6. pp. 39-68.

11. Carambula, S., Goncalves, S., Costa, I., Figueiredo, J., Wheeler, M., Neves, J., & Mondadori, R. (1999). *Effect of fetal age and method of recovery on isolation of preantral follicles from bovine ovaries. Theriogenology*. 52: pp. 563–571. U.S.A
12. Castañeda Martínez, I. (2009). *Investigaciones, repositorio institucional unisalle – rius*. Recuperado el 27 de 10 de 2016, de <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/5640/t14.09%20c275f.pdf?sequence=1>
13. Corvalán, A. (2002). *Biología molecular en infectología parte i: desarrollo y metodologías*. Revista chilena de infectología, pp. 0716 - 1018. Chile.
14. Corrales, I., & Muñoz Ariza, M. (2012). *Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias. Nova - publicación científica en ciencias biomédicas - issn: 1794-2470 - vol. 10 no. 18, pp. 135-250*. U.S.A.
15. Cui, X., & Kim, N. (2007). *Maternally derived transcripts: identification and characterization during oocyte maturation and early cleavage. Reprod. Fertil. Dev.* 19: pp.25-34. U.S.A
16. Fair, T., Hulshof, S., Hyttel, P., Greve, T., & Boland, M. (1997). *Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. Anat. Embryol.* 195: pp. 327-336. Canadá.
17. Fair, T., Hulshof, S., Hyttel, P., Greve, T., & Boland, M. (1997). *Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. Molecular reproductional development* 46: 208-215. Canadá.
18. Fair, T. (2003). *Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. Anim. Reprod. Sci.* 78: pp. 203-216. Canadá.
19. Fibao. (31 de 05 de 2017). *Portal medicina molecular*. Recuperado el 10 de marzo del 2017, de http://medmol.es/imprimir_pdf.cfm
20. Fortune, J., Cushman, R., Wahl, C., & Kito, S. (2000). *The primordial to primary follicle transition. Molecular and cellular endocrinology* 163: pp. 53-60. Bélgica.
21. Fortune, J. (2003). *The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. Animal reproduction science* 78: pp. 135-163. Bélgica.

22. Friguet, B. (2006). *Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress*. *Febs lett.* 580: pp. 2910-2916. Canadá.
23. Gélvez, I. (2016). *Mundo pecuario*. Recuperado el 13 de 10 de 2016, de http://mundo-pecuario.com/tema252/reproduccion_bovinos/ciclo_estral_bovinos-1497.html
24. Gonzales, C. (2016). *Localización y análisis de la expresión de la proteína metionina sulfóxido reductasa a (msra) durante la foliculogénesis en bovinos*. pp. 36-45. Chihuahua.
25. Gordon, I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos. 2a ed. Cabi publishing*. pp. 12-34. Reino Unido.
26. Gutiérrez, C. (18 de 10 de 2002). *Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes*. *Rev cubana med milit* 2002. pp. 126-33, 127-133.
27. Henao, D., Carrillo, L., & Olivera, M. (2004). *Comportamiento durante el calor y dinámica folicular interestral en vacas bon (blanco orejinegro): rev col cienc pec vol.17 pp. 39*. Colombia.
28. Herradón, P., Quintela, I., Becerra, J., Ruibal, S., & Fernández, M. (2007). *Fecundación in vitro: alternativa para la mejora genética en bovinos*. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 15 (suppl. 1) pp. 34-41.
29. John, G., Brot, N., Ruan, J., Erdjument-bromage, H., Tempst, P., Weissbarch, H., & Nathan, C. (2001). *Peptide methionine sulfoxide reductase from escherichia coli and mycobacterium tuberculosis protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: pp. 9901-9906. U. S. A.
30. Landin, V. (04 de 2015). *Investigaciones institucionales. Repositorio institucional universidad técnica de cotopaxi*. Recuperado el 11 de 15 de 2016, de <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2886/1/t-utc-00410.pdf>
31. Lee, B. (2010). *Methionine-r-sulfoxide reductases and biological importance of free methionine sulfoxide reduction*. Ph. D. Dissertation. University of nebraska. E. U. A.
32. Lenin Tamay de Dios, C. (mayo-agosto de 2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (pcr) y de la pcr en tiempo real*. México df, México

33. Lopez, J. (2014). *Investigaciones pecuarias, revista Veterinaria*. Recuperado el 03 de 11 de 2016, de <http://www.reproduccionveterinaria.com/fisiologia-y-anatomia-obstetrica/fisiologia-obstetrica2/ciclo-estral/ciclo-estral-en-la-vaca/>
34. Luo, S., & Levine, R. (2009). *Methionine in proteins defends against oxidative stress*. *Faseb j.* 23: pp. 464-472. Países bajos.
35. Marcondes Seneda, M., Fernandes Da Silva, K., Constantino Max, M., Garbelini Gomes, R., Aires Lisboa, I., & Fortes Pontes, H. (24 de 09 de 2009). *Folículoogénesis en bovinos*. México.
36. Martinez Sanchez, G. (2005). *Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte i: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno*. *Rev cubana farm v.39 n.3 Ciudad de la Habana - Cuba*.
37. Matzuk, M., Burns, K., Viveiros, M., & Eppig, J. (2002). *Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation*. *Science* 296: pp. 2178-2179. España.
38. Mclaughlin, E., & Mciver, S. (2009). *Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development*. *Reproduction* 137, pp. 1-11. España.
39. Monniaux, D., Monget, P., Besnard, N., Huet, C., & Pisselet, C. (1997). *Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants*. *Theriogenology* 47, pp..3–12. Países bajos.
40. Moreno, M. (2017). *Estandarización de ensayos de expresión génica del biomarcador*. Recuperado el 18 de marzo del 2017 de: http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/11414/mishell%20moreno_disertaci%c3%b3n%20de%20grado.pdf?sequence=1
41. Moskovitz, J., Bar-noy, S., Wesley, m., Requena, J., Berlett, B., & Stadtman, E. (2001). *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*. Recuperado el 11 de 27 de 2016, de pnas: <http://www.pnas.org/content/98/23/12920.full>
42. Neiers, F., Kriznik, A., Boschi-muller, A., & Branlant, G. (2004). *Evidence for a new sub-class of methionine sulfoxide reductases b with an alternative thioredoxin recognition signature*. *The journal of biological chemistry* 279 (11), pp. 42462 - 41468. México.
43. Palma, G. (2001). *Bioteología de la reproducción*. pp. 62, 37 países bajos.

44. Pierce, B. (2009). *Genetics: a conceptual approach*. New York: W.H. Freeman and Company. pp. 23-38 U.S.A
45. Porterfield, A. (2017). *Manual for bioscientists*. Recuperado el 15 de marzo del 2017 de: <http://bitesizebio.com/24581/what-is-a-ct-value/>
46. Roca, P., Oliver, J., & Rodriguez, A. (2003). *Bioquímica técnicas y métodos*. pp. 39-45. España.
47. Rodgers, R., & Irving-Rodgers, E. (2010). *Morphological classification of bovine ovarian follicles*. *Society for reproduction and fertility*. Doi: 10.1530/rep-09-0177. México.
48. Rodriguez-Tarduchy, G. (2014). *Instituto de investigaciones biomedicas "Alberto Sols"*. México.
49. Segura-Correa, J., & Montes-Pérez, R. (2001). *Razones y estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales*. *Rev. Biomed.* 12 pp.196-206. Países Bajos.
50. Smitz, J., & Cortvrindt, R. (2002). *The earliest stages of folliculogenesis in vitro*. *Reproduction* 123, pp.185-202. España.
51. Skinner, M. (2005). *Regulation of primordial follicle assembly and development*. *Human reproduction update* 11, pp. 461-471. U.S.A.
52. Tubino Fernandez, A. (2012). *Sitio argentino de producción animal*. Recuperado el 16 de marzo del 2017 de: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/23-ondas_foliculares.pdf. Argentina.
53. Van Den Hurk, R., Bevers, M., & Beckers, J. (1997). *In-vivo and in-vitro development of preantral follicles*. *Theriogenology* 47: pp. 73-82. Países Bajos.
54. Weissbach, H., Resnick, I., & Brot, N. (2005). *Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage*. *Biochimica et biophysica acta* 1703 (2), pp. 203-212. U.S.A.
55. Wong, M., & Medrano, J. (2005). *Real-time PCR for mRNA quantitation*. *Biotechniques*. pp. 75-85. México.

56. Yermolaieva, O., Xu, R., Schinstock, C., Brot, N., Weissbach, H., Heinemann, H., & Hoshi, T. (2004). *Methionine sulfoxide reductase a (msra) protects neuronal cells against brief hypoxia-reoxygenation*. Proc. Natl. Acad. Sci. pp. 1159-1164. U. S. A.

ANEXOS

Anexo 1. RESULTADOS ABALIZADOS POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

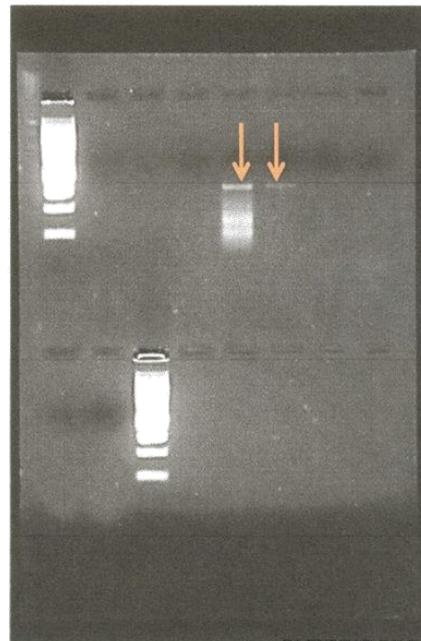
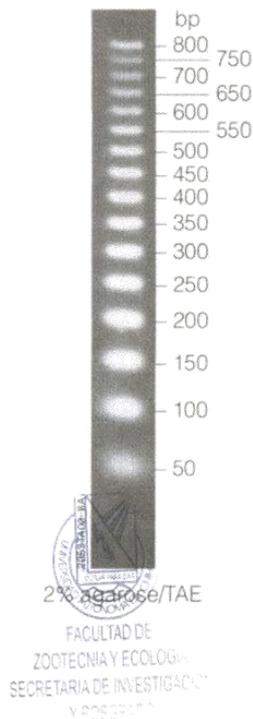
ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA DE INGENIERIA ZOOTECNICA

TEMA: "ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN METIONINA SULFÓXIDO
REDUCTASA A (MSRA) EN CÉLULAS FOLICULARES BOVINAS EN
DIFERENTES ESTADIOS"

AUTOR: Marcelo Israel Lema Veloz
CODIGO: 3483
DIRECTOR: Ing Ms.C. Paula Toalombo
ASESOR: Dr. Alex Villafuerte

DATOS DE TESIS

VERIFICACIÓN DE MUESTRAS DE ARN



FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA
Periférico Francisco R. Almada km 1
C.P. 31453 Chihuahua, Chih.
Tel. 52 (614) 434-0363, 434-0304, 434-0458 fax 434-0345
www.fz.uach.mx

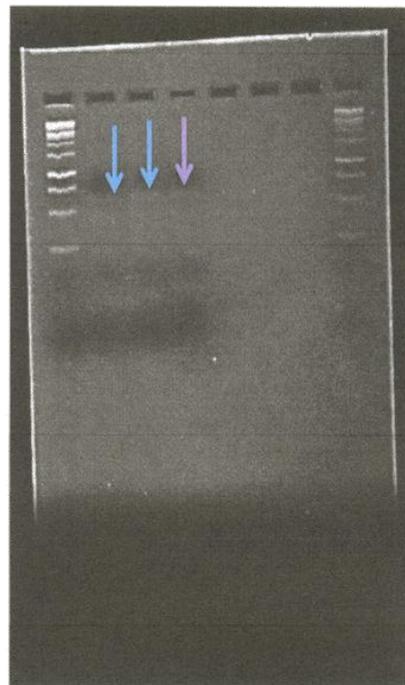
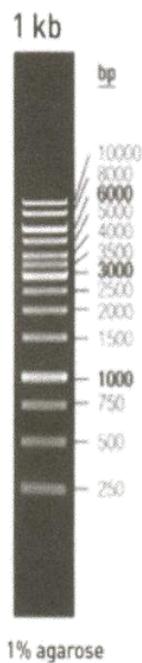


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

FUENTE: (PROMEGA, 2017)

Fig.1 Gel de agarosa con las muestras cargadas en los pozos 1) Marcador de Peso Molecular de 200pb; 2) Control Positivo de ovario; 3) Coc inmaduro 1; 4) Coc inmaduro 2; 5)Coc maduro 1; 6) Coc maduro2; 7) Células cumulares inmaduras 1; 8) Células cumulares inmaduras 2; 9) Células Cumulares maduras 1; 10) Células cumulares maduras 2; 11) Marcador de peso molecular de 200pb

VERIFICACIÓN DE ARN PURO DESPUES DE APLICAR LISADOR (DNASA) DE TIPO COMERCIAL.



FUENTE: (Scientific, 2017)

Fig.2 Gel de agarosa con las muestras cargadas en los pozos 1) Marcador de Peso Molecular de 1000pb; 2) Células cumulares inmaduras 1; 3) Células cumulares inmaduras 2; 4) Coc inmaduro 1; 8) Marcador de peso molecular de 1000pb



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

**VERIFICACIÓN DE ADN COMPLEMENTARIO MEDIANTE AMPLIFICACIÓN
DEL GEN CONSTITUTIVO RNA18S POR LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO
REAL**

| ADNc | | | |
|----------|-------|----------------|------------|
| MUESTRA | CT | CT PROMEDIO | CT SD |
| CCi1 | 27,67 | 27,21 | 0,65053824 |
| CCi1 | 26,75 | 27,21 | |
| CCi2 | 35,55 | 32,695 | 4,03757972 |
| CCi2 | 29,84 | 32,695 | |
| CCm1 | 31,64 | 31,705 | 0,09192388 |
| CCm1 | 31,77 | 31,705 | |
| CCm2 | 29,25 | 29,225 | 0,03535534 |
| CCm2 | 29,20 | 29,225 | |
| COC i1 | 30,84 | 30,89 | 0,07071068 |
| COC i1 | 30,94 | 30,89 | |
| COC i2 | 31,8 | 31,805 | 0,00707107 |
| COC i2 | 31,81 | 31,805 | |
| COC m1 | 32,37 | 32,555 | 0,26162951 |
| COC m1 | 32,74 | 32,555 | |
| COCm2 | 32,35 | 32,47 | 0,16970563 |
| COCm2 | 32,59 | 32,47 | |
| DNAc neg | 40 | | |
| DNAc neg | 40 | | |
| NEGATIVO | 40 | | |



FACULTAD DE
ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN
Y POSGRADO

FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA
Periférico Francisco R. Almada km 1
C.P. 31453 Chihuahua, Chih.
Tel. 52 (614) 434-0363, 434-0304, 434-0458 fax 434-0345
www.fz.uach.mx



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN METIONINA SULFÓXIDO
REDUCTASA A MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL**

| MUESTRA | SONDA | CT | CT PROMEDIO | CT SD |
|---------|---------|--------------|----------------|-------|
| CC11 | HISTONA | 25,838 | 25,809 | 0,078 |
| CC11 | HISTONA | 25,868 | 25,809 | 0,078 |
| CC11 | HISTONA | 25,721 | 25,809 | 0,078 |
| CC11 | MSRA | no amplifica | | |
| CC11 | MSRA | no amplifica | | |
| CC11 | MSRA | no amplifica | | |
| CC12 | HISTONA | 28,105 | 28,03 | 0,1 |
| CC12 | HISTONA | 28,069 | 28,03 | 0,1 |
| CC12 | HISTONA | 27,916 | 28,03 | 0,1 |
| CC12 | MSRA | no amplifica | | |
| CC12 | MSRA | no amplifica | | |
| CC12 | MSRA | no amplifica | | |
| CCM1 | HISTONA | 30,911 | 30,592 | 0,277 |
| CCM1 | HISTONA | 30,429 | 30,592 | 0,277 |
| CCM1 | HISTONA | 30,436 | 30,592 | 0,277 |
| CCM1 | MSRA | no amplifica | | |
| CCM1 | MSRA | no amplifica | | |
| CCM1 | MSRA | no amplifica | | |
| CCM2 | HISTONA | 27,862 | 28,012 | 0,408 |
| CCM2 | HISTONA | 28,473 | 28,012 | 0,408 |
| CCM2 | HISTONA | 27,700 | 28,012 | 0,408 |
| CCM2 | MSRA | no amplifica | | |
| CCM2 | MSRA | no amplifica | | |
| CCM2 | MSRA | no amplifica | | |
| COC11 | HISTONA | 29,562 | 29,512 | 0,11 |
| COC11 | HISTONA | 29,589 | 29,512 | 0,11 |
| COC11 | HISTONA | 29,386 | 29,512 | 0,11 |
| COC11 | MSRA | no amplifica | | |
| COC11 | MSRA | no amplifica | | |
| COC11 | MSRA | no amplifica | | |
| COC12 | HISTONA | 29,604 | 29,923 | 0,342 |
| COC12 | HISTONA | 29,880 | 29,923 | 0,342 |
| COC12 | HISTONA | 30,285 | 29,923 | 0,342 |
| COC12 | MSRA | 30,374 | 30,263 | 0,282 |
| COC12 | MSRA | 30,473 | 30,263 | 0,282 |
| COC12 | MSRA | 29,943 | 30,263 | 0,282 |



FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA

Periférico Francisco R. Almada km 1

C.P. 31453 Chihuahua, Chih.

Tel. 52 (614) 434-0363, 434-0304, 434-0458 fax 434-0345

www.fz.uach.mx



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN METIONINA SULFÓXIDO
REDUCTASA A MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL**

| MUESTRA | SONDA | CT | CT PROMEDIO | CT SD |
|---------|---------|--------------|----------------|-------|
| CC11 | HISTONA | 25,838 | 25,809 | 0,078 |
| CC11 | HISTONA | 25,868 | 25,809 | 0,078 |
| CC11 | HISTONA | 25,721 | 25,809 | 0,078 |
| CC11 | MSRA | no amplifica | | |
| CC11 | MSRA | no amplifica | | |
| CC11 | MSRA | no amplifica | | |
| CC12 | HISTONA | 28,105 | 28,03 | 0,1 |
| CC12 | HISTONA | 28,069 | 28,03 | 0,1 |
| CC12 | HISTONA | 27,916 | 28,03 | 0,1 |
| CC12 | MSRA | no amplifica | | |
| CC12 | MSRA | no amplifica | | |
| CC12 | MSRA | no amplifica | | |
| CCM1 | HISTONA | 30,911 | 30,592 | 0,277 |
| CCM1 | HISTONA | 30,429 | 30,592 | 0,277 |
| CCM1 | HISTONA | 30,436 | 30,592 | 0,277 |
| CCM1 | MSRA | no amplifica | | |
| CCM1 | MSRA | no amplifica | | |
| CCM1 | MSRA | no amplifica | | |
| CCM2 | HISTONA | 27,862 | 28,012 | 0,408 |
| CCM2 | HISTONA | 28,473 | 28,012 | 0,408 |
| CCM2 | HISTONA | 27,700 | 28,012 | 0,408 |
| CCM2 | MSRA | no amplifica | | |
| CCM2 | MSRA | no amplifica | | |
| CCM2 | MSRA | no amplifica | | |
| COC11 | HISTONA | 29,562 | 29,512 | 0,11 |
| COC11 | HISTONA | 29,589 | 29,512 | 0,11 |
| COC11 | HISTONA | 29,386 | 29,512 | 0,11 |
| COC11 | MSRA | no amplifica | | |
| COC11 | MSRA | no amplifica | | |
| COC11 | MSRA | no amplifica | | |
| COC12 | HISTONA | 29,604 | 29,923 | 0,342 |
| COC12 | HISTONA | 29,880 | 29,923 | 0,342 |
| COC12 | HISTONA | 30,285 | 29,923 | 0,342 |
| COC12 | MSRA | 30,374 | 30,263 | 0,282 |
| COC12 | MSRA | 30,473 | 30,263 | 0,282 |
| COC12 | MSRA | 29,943 | 30,263 | 0,282 |



FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA

Periférico Francisco R. Almada km 1

C.P. 31453 Chihuahua, Chih.

Tel. 52 (614) 434-0363, 434-0304, 434-0458 fax 434-0345

www.fz.uach.mx

Anexo 2. T-STUDENT COCI2 (HISTONA-MSRA).

| | COCI2 H | COCI2 M |
|------------------------------|--------------|-------------|
| Mean | 29,923 | 30,26333333 |
| Variance | 0,117327 | 0,079410333 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pearson Correlation | -0,830250481 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 2 | |
| t Stat | -0,986554478 | |
| P(T<=t) one-tail | 0,213929905 | |
| t Critical one-tail | 2,91998558 | |
| P(T<=t) two-tail | 0,42785981 | |
| t Critical two-tail | 4,30265273 | |

Anexo 3. T-STUDENT COCM1 (HISTONA-MSRA).

| | COCM1 H | COCM2 H |
|------------------------------|--------------|-------------|
| Mean | 30,746 | 31,03066667 |
| Variance | 0,024609 | 0,571521333 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pearson Correlation | -0,245265083 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 2 | |
| t Stat | -0,609547206 | |
| P(T<=t) one-tail | 0,302092885 | |
| t Critical one-tail | 2,91998558 | |
| P(T<=t) two-tail | 0,60418577 | |
| t Critical two-tail | 4,30265273 | |

Anexo 4. T-STUDENT COCM2 (HISTONA-MSRA).

| | COCM2 H | COCM2 M |
|------------------------------|--------------|-------------|
| Mean | 29,88866667 | 30,40166667 |
| Variance | 0,010362333 | 0,054560333 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pearson Correlation | -0,467170166 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 2 | |
| t Stat | -3,010036117 | |
| P(T<=t) one-tail | 0,047459018 | |
| t Critical one-tail | 2,91998558 | |
| P(T<=t) two-tail | 0,094918035 | |
| t Critical two-tail | 4,30265273 | |

Anexo 5. MUESTRAS DE COC MADURO E INMADURO AL IGUAL QUE DE CÉLULAS CUMULARES MADURAS E INMADURAS



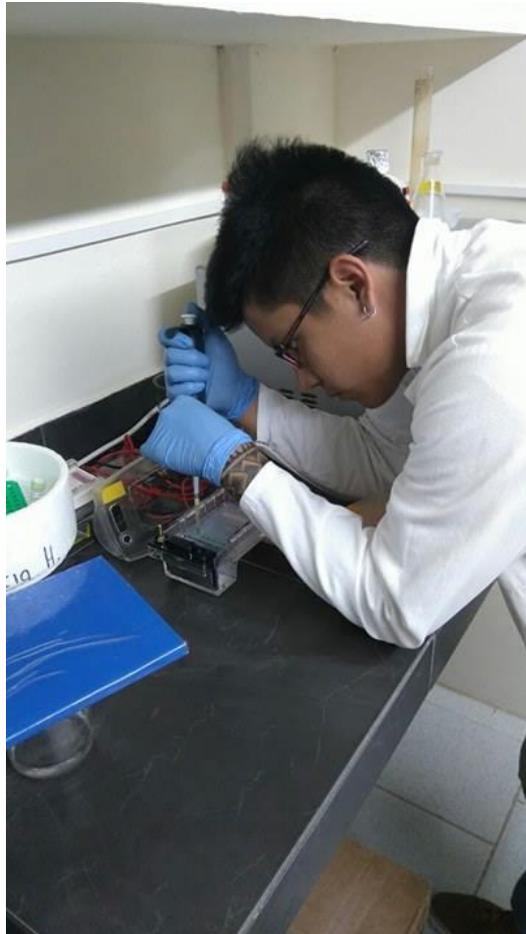
Anexo 6. CAMPANA DE RAYOS UV UTILIZADA PARA DESINFECCIÓN DE MATERIALES Y REACTIVOS.



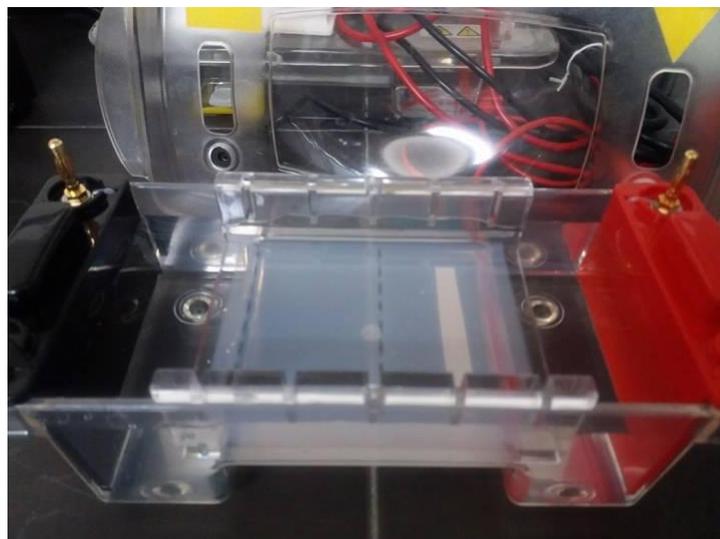
Anexo 7. EQUIPO DE TERMOCICLADOR.



Anexo 8. INSERCIÓN DE MUESTRAS TERMOCICLADAS AL GEL DE AGAROSA.



Anexo 9. CÁMARA DE ELECTROFORESIS.



Anexo 10. FOTODOCUMENTADOR UTILIZADO PARA OBSERVAR GELES DE AGAROSA UNA DESPUÉS QUE HAYA PASADO POR ELECTROFORESIS.



Anexo 11. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS EN EL EQUIPO DE NANODROP PARA OBTENER LA CANTIDAD DE ÁCIDOS NUCLEICOS PRESENTES Y SU PUREZA.



Anexo 12. INSERCIÓN DE LAS MUESTRAS MÁS EL MIX DE MSRA E HISTONA PARA SER ANÁLIZADAS EN EL EQUIPO DE PCR EN TIEMPO REAL.



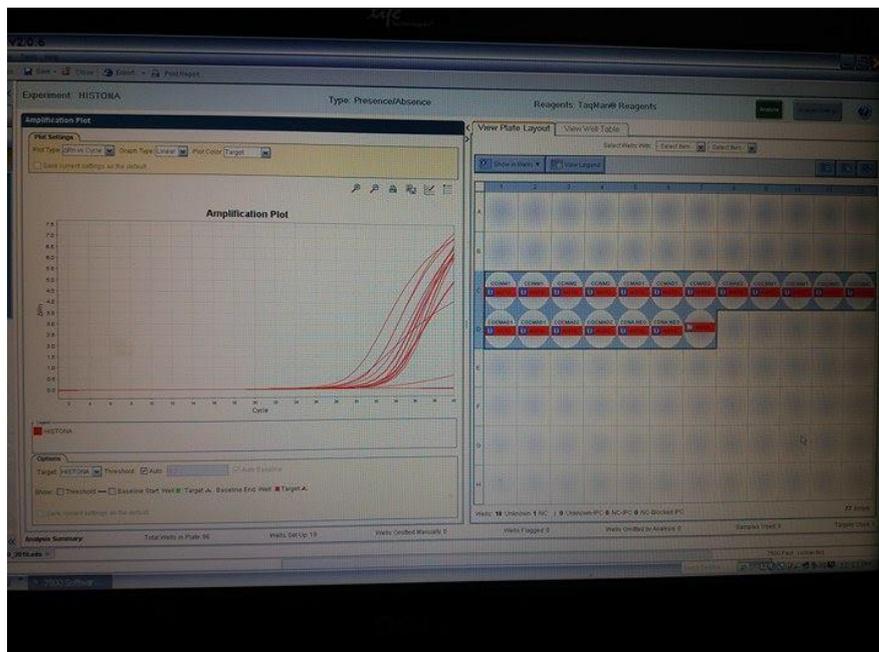
Anexo 13. EQUIPO DE PCR EN TIEMPO REAL (qPCR)



Anexo 14. SONDAS DE HISTONA Y METIONINA SULFÓXIDO REDUCTASA A (MSRA).



Anexo 15. RESULTADOS OBTENIDOS AL SER ANALIZADOS LA PRESENCIA DE ADN COMPLEMENTARIO EN EL EQUIPO DE PCR EN TIEMPO REAL.



Anexo 16. RESULTADOS OBTENIDOS POR EL PROGRAMA DEL PCR EN TIEMPO REAL AL ANALIZAR LA EXPRESIÓN GÉNICA PARA MSRA.

