



Código: INV_8.1 IE 02c	Página: 1 de 9
Fecha de Emisión: 03/02/2016	Fecha de Revisión: 15/02/16
	Nº de Revisión: 1
Elaboró:	Coordinación de Investigación
Aprobó:	Secretaría de Investigación y Posgrado

SEGUIMIENTO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN (INFORMES)

**CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA**

IMPRESIÓN DE INFORME TECNICO

Revisión de Informe Técnico

Fondo:	I0017- Fondo SEP - CONACYT
Solicitud:	000000000168981- Identificación de factores par
Etapas: 002	ETAPA II
Título:	Identificación de factores par
ID Usuario:	X_mburrola94942
Nombre:	Maria Burrola Barraza
formato:	INT-F017 INFORME TECNICO PARCIAL PARA TODAS LAS CONV. A PARTIR DE 2008 CB Y DEMANDA
Fecha de Envío:	27/02/15



Reporte de Informe Técnico

Sección: FSEC21

Pregunta: *Capture aquí el resumen de este informe*

Respuesta:

La calidad del ovocito impacta en gran medida en la sobrevivencia embrionaria temprana y es adquirida durante la foliculogénesis, donde el ovocito es capaz de regular su propio microambiente a través de la comunicación bidireccional que existe entre éste y las células foliculares. Esta comunicación se da por contacto celular directo y por factores paracrinos secretados por el ovocito (OSFs). Estos últimos regulan funciones importantes en las células de la granulosa y cumulares como: crecimiento, regulación del metabolismo y expansión celular, modulación de la esteroidogénesis, así como prevención de muerte celular. De estos factores de secreción sólo unos cuantos han sido identificados en el bovino, como lo son GDF9 y BMP15; los cuales son capaces de mejorar, de un 40% a un 60%, la capacidad de maduración in vitro del ovocito hasta llegar a blastocisto. Bajo la hipótesis de que además de las proteínas GDF9 y BMP15 el ovocito secreta factores paracrinos que promueven su madurez y competencia in vitro; el objetivo general del trabajo ha sido identificar y caracterizar factores paracrinos secretados por el ovocito, que mejoren la eficiencia del proceso de maduración in vitro (IVM), para lograr una competencia ideal que permita aumentar el porcentaje de blastocitos in vitro. Para cumplir con dicho objetivo se plantearon tres etapas: I. Identificación de genes candidatos que codifiquen para factores paracrinos de ovocitos madurados in vivo; II. Obtención y caracterización de factores paracrinos recombinantes, y III. Evaluación del efecto de los factores paracrinos recombinantes sobre células cumulares y ovocitos madurados in vitro. El presente informe técnico muestra los resultados obtenidos durante el año 2014 que corresponden a los avances de las Etapas I y III. En la Etapa I con el fin de identificar proteínas de secreción del ovocito bovino, se realizó un análisis in silico que consistió de fases: 1) Obtención de las secuencias de aminoácidos de las proteínas provenientes de secuencias ESTs de ovocito bovino reportadas en el base de dato del Genbank del NCBI, para el caso de ESTs que no mostraran una secuencia de aminoácidos, la proteína se predijo a través del servidor EMBOSS Transeq; 2) Predicción de proteínas de secreción usando los programas SignalIP, SecretomeP, TargetP y TMHMM; y 3) Clasificación de las proteínas de secreción por medio de los programas InterProScan, KEGG Brite, KEGG Pathway and BLASTP of NCBI. De



las 2167 secuencias ESTs reportadas en NCBI de ovocito bovino se obtuvieron 1237 secuencias diferentes de proteínas, de las cuales 87 fueron identificadas como proteínas de secreción por la vía clásica de acuerdo al servidor SignalP, las 1150 restantes se analizaron SecretomeP para predecir las proteínas de secreción que siguen la vía no clásica, las cuales resultaron ser 89. Las proteínas de secreción identificadas por ambos servidores (176) fueron analizadas por TargetP para determinar cuáles eran mitocondriales, 3 resultaron serlo, a 52 proteínas no se les logró identificar su localización y 22 más resultaron tener una localización distinta a la mitocondrial; estas 77 proteínas fueron removidas del conjunto de las 176 presuntas proteínas de secreción y las 99 restantes se analizaron por TMHMM para la predicción de proteínas transmembranales, de las cuales 29 poseían uno o más hélices transmembranales. Un total de 70 proteínas fueron identificadas como de secreción por métodos computacionales (SignalP, SecretomeP, TargetP y TMHMM), sin embargo se descartaron las predichas, por lo que finalmente se obtuvieron 18 probables proteínas de secreción, de las cuales el 61.1% fueron proteínas de matrix extracelular, 27.8% fueron proteínas de secreción que al ser reconocidas por un receptor participan activando un proceso de señalización y 11.11% fueron proteínas no identificadas. Teniendo claro que lo que se pretendía es identificar proteínas de secreción que sean potenciales OSF ζ s para ser utilizadas como promotores de competencia en el cultivo de maduración in vitro, el criterio de selección se basó en que dichas proteínas tenía que tener una participación en el proceso de maduración del ovocito, es decir, que participen en cualquier punto desde el momento en que se reanuda la meiosis hasta la metafase II. Para esto, fue necesario realizar una revisión de literatura exhaustiva de cada una de las 18 proteínas de secreción identificadas. Así pues, después del análisis de revisión de literatura, se decidió que las proteínas TIMP-1, TNPAIP6, PTX3 y PTGS2, INHBA son candidatos potenciales a usarse como promotores de maduración. Las proteínas TNPAIP6 y PTX3, son esenciales para se forme la matrix extracelular que rodea al COC, ya que se unen al hyalurano lo que ayuda a mantener la adecuada conformación del COC durante el proceso de maduración. La proteína TIMP-1 inhibe la acción de metaloproteinasas tipo MMP1 que actúan degradando la matrix extracelular, por lo que su presencia es indispensable para que la conformación del COC permanezca estable. PTGS2 está relacionada con reactivación de la meiosis en el ovocito inmaduro, dado que activa la síntesis de PGE2. Por parte la proteína INHBA, su expresión se asocia con la competencia del ovocito e incrementa la secreción de FSH. Sin embargo aún es necesario evaluar su expresión en diversos tejidos como hígado, bazo, riñón, ovario, ovocito, células cumulares y testículo, para constatar que la expresión de estos genes corresponda con lo reportado en la literatura y asegurarnos que se estén expresando en el ovocito. En



la Etapa III, teniendo el antecedente de que en ratas el péptido IMD/ADM2(1-47) actúa como OSF y al ser adicionado al medio de cultivo de maduración in vitro, promueve la organización compacta del COC, junto con un aumento de la concentración del AMPc y una disminución de la apoptosis, se tuvo como objetivo evaluar la acción como OSF del péptido IMD/ADM2(1-47) sobre la maduración del ovocito bovino, suplementando el medio de cultivo de maduración con 1.5, 15 y 51 ng/μl de IMD/ADM2(1-47). Para lo cual, se aspiraron folículos de 2-8 mm de diámetro de ovarios de rastro, para obtener complejos ovocito-cumulus (COCs). Los COCs fueron organizados en grupos de 50 por tratamiento y se sometieron a maduración in vitro durante 24 h. Subsecuentemente, grupos de 25 COCs fueron usados para evaluar el grado de expansión cumular (compacto, semicompacto y expandido) y la capacidad de maduración del ovocito, así como su acción antiapoptótica. Los resultados mostraron que aunque no hubo diferencia estadística entre los tratamientos de IMD/ADM2(1-47) utilizados, el porcentaje de COCs con una estructura compacta se aumentó con el incremento de la concentración de IMD/ADM2 (64% para 1.5ng/μl, 70% para 15 ng/μl y 88% para 51 ng/μl; $P>0.05$), de éstos solamente el tratamiento de 51 ng/μl mostró diferencia significativa con el tratamiento control sin IMD/ADM2(1-47) (88% vs 42%, respectivamente; $P<0.05$). Para COCs con estructura expandida, ninguno de los tratamientos probados mostró diferencia significativa contra el tratamiento control (14% para 1.5 ng/μl, 13% para 15 ng/μl, 8% para 51 ng/μl y 30% para control; $P>0.05$); sin embargo, la tendencia mostró que la expansión celular disminuyó conforme se aumenta la concentración de IMD/ADM2(1-47). Estos resultados concuerda con los obtenidos por Chang et al., (2011) quien mostró en rata, que la suplementación de IMD/ADM2(1-47) en el medio de maduración in vitro promovía la compactación de los COCs. Con estos resultados demostramos que la IMD/ADM(1-47) estimula el desarrollo folicular manteniendo en los COCs una estructura tridimensional donde existe una adecuada comunicación bidireccional entre el ovocito y las células cumulares. Un significativo incremento en el porcentaje de ovocitos en el estado de metafase II (MII) fue observado en COCs suplementados con 15 ng/μl comparado con el tratamiento control (61% vs 35% respectively, $P<0.05$) y contrariamente la adición de 51 ng/μl de IMD/ADM(1-47) disminuyó el porcentaje de ovocitos MII y no presentó diferencia significativa con el tratamiento control (48% vs 35%, $P>0.05$). Por otro lado, tanto la suplementación con 1.5 y 51 ng/μl de IMD/ADM(1-47) no tuvo ninguna influencia en disminuir el porcentaje de apoptosis en los ovocitos comparados con el cultivo control (12% para 1.5 ng/μl, 11% para 51 ng/μl y 30% para control; $P<0.05$), a diferencia de 15 ng/μl de IMD/ADM(1-47) que promovió una disminución de la apoptosis significativamente diferente al



	tratamiento control (2% vs 21%, respectivamente; $P < 0.05$). En conclusión la suplementación al medio de maduración in vitro con el péptido AMD/ADM2(1-47), promueve la maduración nuclear e inhibe la presencia de apoptosis en el ovocito, además promueve una estructura tridimensional compacta en los COC's para que la comunicación entre el ovocito y las células cumulares se de manera adecuada.
Pregunta:.	<i>Evalúe el grado de cumplimiento de la(s) meta(s) y obtención de productos que usted propuso para esta etapa</i>
Respuesta:	La Etapa I se ha cumplido al 90%. Después del análisis de 2167 secuencias de cDNAs reportadas para el ovocito, se logró identificar 5 genes que codifican para proteínas de secreción, las cuales cumplieron el criterio de selección para ser potenciales OSFs a utilizarse mediante su adición como proteínas recombinantes in vitro en el cultivo de maduración de ovocitos (IVM). Para culminar la etapa faltaría analizar su expresión en diversos tejidos para comprobar que realmente se expresen en ovocito. La Etapa II se ha cumplido al 5%. En este momento nos encontramos clonado, en vectores de expresión, los 5 genes que se identificaron en la etapa I, una vez que estén clonados, procederemos a obtenernos de manera recombinante para evaluar dichas proteínas como OSF _¿ s en los protocolos de maduración in vitro, tal y como lo hemos estado realizando en la Etapa III para el péptido IMD/ADM21-47 La etapa III se ha cumplido en un 40%. Los resultados obtenidos indican que la IMD/ADM21-47 promueve la compactación del COC para que la comunicación bidireccional se dé de la mejor manera, además promueve la maduración nuclear del ovocito y tiene un efecto antiapoptótico en esta célula. Por estos resultados, IMD/ADM21-47 es un OSF que puede ser utilizado para mejorar los cultivos de maduración in vitro de ovocitos. Sin embargo aún falta demostrar que tiene una influencia positiva en el desarrollo embrionario al aumentar el porcentaje de blastocisto.
Pregunta:.	<i>En caso de haber realizado modificaciones al Convenio de Asignación de Recursos, respecto de la distribución de recursos financieros, señale dichas modificaciones y las justificaciones correspondientes</i>
Respuesta:	No hubo ninguna modificación en los recursos financieros
Pregunta:.	<i>Reporte los alcances logrados respecto de: a) Productos académicos y/o de divulgación b) Formación de recursos humanos especializados c) Participación en congresos y foros académicos -Se solicita anexar en pdf la evidencia de los productos</i>
Respuesta:	Los resultados preliminares del análisis in silico, lo relacionado al análisis de las primeras 230 secuencias analizadas se presentaron en la



	<p>XLI Reunión de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria A.C. y la VII Reunión Nacional sobre Sistemas Agro y Silvopastoriles, bajo el título: Identificación de probables factores de secreción del ovocito en Bos Taurus mediante análisis bioinformático, cuya presentación estuvo a cargo por la alumna de maestría. Durante este año 2015, del 18 al 22 de junio, los resultados presentados en este informe técnico serán presentados en la 48th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, a través de la participación con dos trabajos: 1) Identification of Probable Oocyte-secreted Factors in Bos taurus through Bioinformatic Analysis, presentado por la alumna Beatriz Elena Castro Valenzuela (Maestría) y 2) IMD/ADM2 Promotes the Cell Interaction in Cumulus-Oocyte Complexes (COCs) and Enhances Oocyte Maturation to Develop competence In Vitro, presentado por el alumno Jesús García Hernández (Doctorado). En relación a la formación de recurso humano, actualmente se encuentra participando en el desarrollo del proyecto, para obtener su tesis, un alumno de doctorado y una de maestría, los cuales pertenecen a los programas de Doctorado in Philosophia y Maestría en Ciencias en reproducción animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología, UACH. El alumno de doctorado es Jesús García Hernández; mientras que la alumna de Maestría es Beatriz Elena Castro Valenzuela.</p>
Observaciones / Justificación:	

Libros

Autor(es)

Título

Título del capítulo

Año

Tipo de libro

Estado actual

Editorial

Tiraje 0

Nº Páginas 0

Objetivo básico

ISBN

País edición

Documento probatorio

Descripción



Publicaciones

Autor(es)

Título

Revista

**Estado de la
publicación**

Volumen 0

Nº Páginas 0

Año

País

**Dirección de internet
(http://)**

Objetivo básico

**Documento
probatorio**

Formación de Recursos Humanos

Directores tesis M.EDUVIGES BURROLA-BARRAZA

Título IDENTIFICACION DE nuevos factores de secreción del ovocito en bovinos mediante análisis in silico

Nombre tesista BEATRIZ ELENA CASTRO VALENZUELA

Nivel académico MAE

País MEX

Año 0

Institución UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHIHUAHUA

Dependencia FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA

Monto del apoyo 9200

**Aportación al
proyecto** 0

Duración apoyo 24

Tesis concluida

Fue becario Conacyt Y

Becario proyecto

Directores tesis M.EDUVIGES BURROLA-BARRAZA



Título	Identificación de Factores paracrinos de ovocitos
Nombre tesista	JESUS GARCIA HERNANDEZ
Nivel académico	DOC
País	MEX
Año	0
Institución	Universidad Autónoma de Chihuahua
Dependencia	Facultad de Zootecnia y Ecología
Monto del apoyo	12600
Aportación al proyecto	0
Duración apoyo	24
Tesis concluida	
Fue becario Conacyt	Y
Becario proyecto	

Congresos

Autor(es)	B. E. CASTRO-VALENZUELA, M. E. BURROLA-BARRAZA* Y J. DOMÍNGUEZ-VIVEROS
Título del trabajo	IDENTIFICACION DE PROBABLES FACTORES DE SECRECION DE OVOCITO EN <i>Bos taurus</i> MEDIANTE ANALISIS BIOINFORMATICOS
Congreso	XLI REUNION DE LA ASOCIACION MEXICANA PARA LA PRODUCCION ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA A.C. (AMPA) Y VII REUNION NACIONAL DE SISTEMAS AGRO Y SILVOPASTORILES.
Año	2014
Tipo de participación	Ponente
País	MEX
Tipo de trabajo	

Ficha de proyecto

Aportación científica y tecnológica	0
Problemática que resuelve	
Reto o logro científico y/o tecnológico	



Oferta de valor del grupo de trabajo / Institución 0

Documentos Anexos

Tipo de Informe T
Tipo de Archivo Informe Técnico
Descripción 1. Informe Técnico 2014
Consecutivo 6
Fecha 27/02/15
Archivos Anexos I0017_000000000168981_002__62_27_2015Informe_Tecnico_2014.pdf

Tipo de Informe T
Tipo de Archivo Informe Técnico
Descripción 2. Anexo 1 (evidencia Congreso AMPA)
Consecutivo 7
Fecha 27/02/15
Archivos Anexos I0017_000000000168981_002__72_27_2015Anexo_1.pdf

Tipo de Informe T
Tipo de Archivo Informe Técnico
Descripción 3. Anexo 2 (evidencia Congreso SSR)
Consecutivo 8
Fecha 27/02/15
Archivos Anexos I0017_000000000168981_002__82_27_2015Anexo_2.pdf

Tipo de Informe T
Tipo de Archivo Informe Técnico
Descripción 4. Anexo 3 (Formación Recurso Humano)
Consecutivo 9
Fecha 27/02/15
Archivos Anexos I0017_000000000168981_002__92_27_2015Anexo_3.pdf