

**Proyecto PRODEP:  
“Impacto del Estrés Oxidativo Sobre el Desarrollo de Partenotas en Bovinos”**

ANTECEDENTES

La producción *in vitro* de embriones (IVP) ha generado a lo largo de décadas grandes aportaciones a la industria ganadera, mientras que ha auxiliado tanto en la conservación de especies animales en peligro, como en la clínica humana en casos de infertilidad. No obstante, un problema central de la IVP está constituido por la menor eficiencia de los sistemas *in vitro* de producción de embriones en comparación con los sistemas *in vivo* en todas las especies estudiadas. Esto es principalmente tangible al momento de la aparición del blastocisto (Gardner y Lane, 1998; Bettegowda et al., 2008; Bols et al., 2012; Boni, 2012). De acuerdo con dos grandes escuelas tratando de explicar este fenómeno, el desempeño de un sistema de producción de embriones depende de: A) calidad intrínseca del ovocito (Blondin et al., 2002; Krisher, 2004; Sirard et al., 2006); B) factores externos al ovocito (Lonergan et al., 2003; Kaneko, 2016; Meldrum et al., 2016) y productos de la respiración mitocondrial. En este último aspecto, el estrés oxidativo genera un marcado impacto negativo sobre la reproducción y el desarrollo temprano (Bain et al., 2013; Betts et al., 2014; Kaneko, 2016; Meldrum et al., 2016; Menezo et al., 2016; Khazaei y Aghaz, 2017; Truong y Gardner, 2017).

De acuerdo con Leininger et al. (2006) el estrés oxidativo es generado por las especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales están constituidas por radicales libres producto del metabolismo del oxígeno, tales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ión hipoclorito ( $OCl^-$ ), radical hidroxilo ( $OH$ ), ión hidroxilo ( $OH^-$ ) o el anión superóxido ( $O_2^-$ ). Por otra parte, los radicales libres ejercen diversos efectos adversos sobre distintos componentes celulares y sus funciones, comprendiendo ADN, lípidos, proteínas, membranas y organelos. Interesantemente, en estos últimos se incluyen las mitocondrias, responsables de la producción de ERO (Aitken et al., 2015). Dados los múltiples efectos perjudiciales de dichos radicales libres en el contexto celular, el embrión temprano resulta fuertemente afectado por altos niveles de ERO. Por lo anterior, y debido a que se desconocen los detalles del impacto de los ERO en el contexto del desarrollo temprano, grandes esfuerzos han sido realizados en años recientes por los especialistas en biotecnologías reproductivas para disminuir los efectos adversos de los radicales libres durante el desarrollo precoz. Esto ha sido ensayado por medio de la adición en cultivo de agentes antioxidantes, tanto del tipo enzimático (Khazaei y Aghaz, 2017), como no enzimático (Luddi et al., 2016; Rocha-Frigoni et al., 2016; Trapphoff et al., 2016; Zullo et al., 2016). Por otra parte, una estrategia alternativa con el mismo fin podría consistir en la estimulación de la actividad o expresión de proteínas involucradas en la respuesta antiestrés intrínsecas del gameto o embrión (Jansen et al., 2009; Arias-Alvarez et al., 2013; Castillo-Martin et al., 2014; Chigusa et al., 2016; Khan et al., 2017).

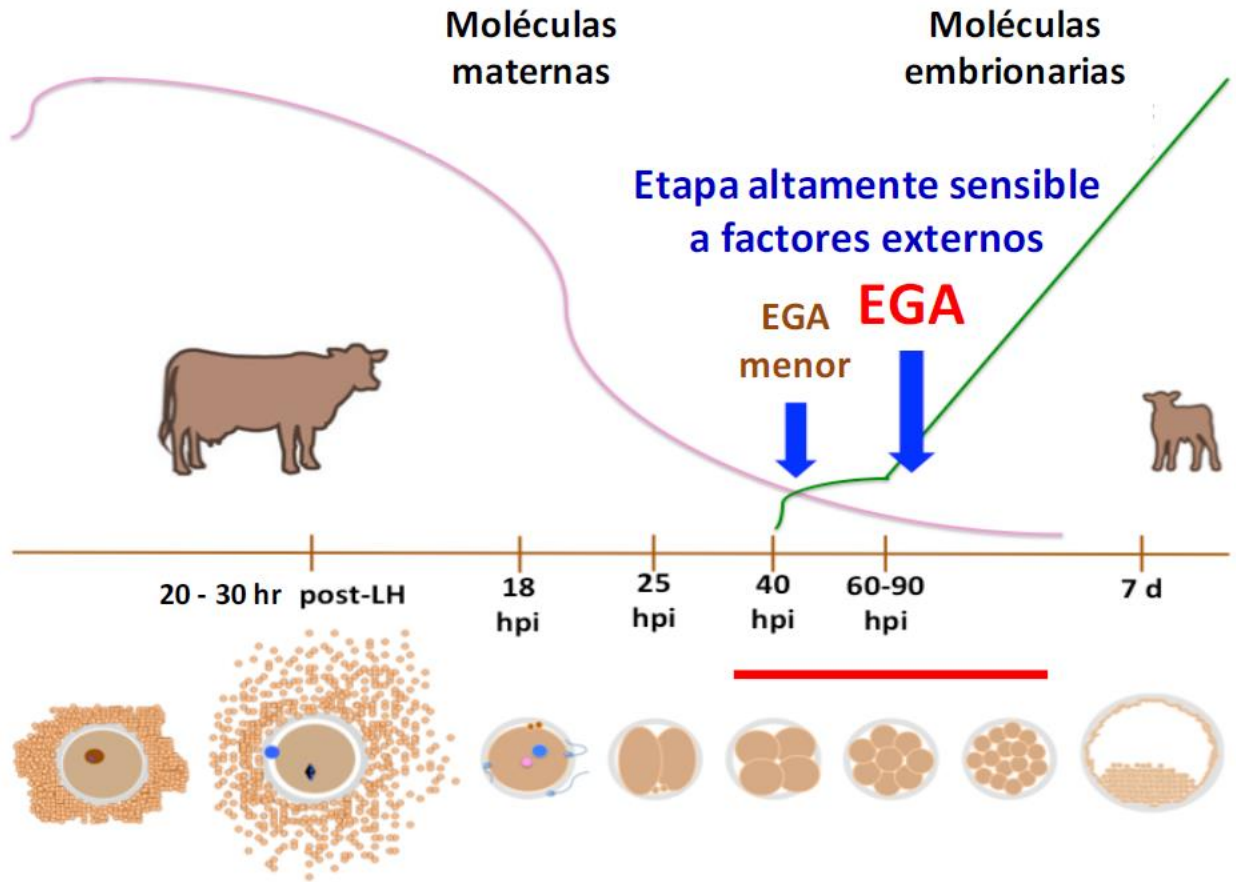
En relación con la defensa antiestrés, la enzima DJ-1 (PARK7) es un regulador central de la citada respuesta en múltiples especies, por lo que su papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis celular ha sido altamente conservado en el transcurso de la evolución (Lucas y Marin, 2007). DJ-1 desempeña múltiples funciones, incluyendo las de chaperona molecular, señalización (modulación de apoptosis sensible a estado redox), control transcripcional, control de otras proteínas involucradas en la eliminación de ERO, actividad esterasa, regulación mitocondrial, actividad deglicasa (Xu y Moller, 2010; Vazquez-Mayorga et al., 2016; Cao et al., 2017; Richarme y Dairou, 2017; Richarme et al., 2017). DJ-1 es ampliamente conocida como un orquestador de la respuesta contra el estrés oxidativo (que incluye también proteínas como

NRF2, PINK1, KEAP1, SOD1, PRDX1, PRDX2 y GPX) en el marco de las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo mal de Parkinson. Se ha observado que en casos de Parkinson familiar (hereditario) mutaciones en el gen DJ-1 humano conllevan a la muerte de neuronas dopaminérgicas debido a estrés oxidativo en esos pacientes (Coppede, 2014; Raninga et al., 2017; Sulzer et al., 2017). Fuera del ámbito neuronal, la función de DJ-1 resulta también fundamental en la defensa antiestrés. En relación con la capacidad reproductiva masculina, la actividad de DJ-1 (o de proteínas con una elevada homología) está involucrada en el proceso de fertilización en ratas y hamsters (Klinefelter et al., 2002). Además, los niveles de la actividad o de la expresión de DJ-1 (u homólogos) en semen han sido correlacionados positivamente con la actividad antioxidante en dicha muestra y el estatus de fertilidad en machos de diversas especies. Estas incluyen equinos (Wrench et al., 2010), bovinos (Boe-Hansen et al., 2015), ovinos (Rocha et al., 2015), porcinos (Choi et al., 2008), murinos (Kaydos et al., 2004; Takemura et al., 2014) y humanos (Wang et al., 2009; An et al., 2011; Camargo et al., 2013; Sun et al., 2014). Por otra parte, en el contexto embrionario, Miyamoto et al. (2011) reportaron que DJ-1 es una proteína necesaria para el desarrollo de embriones clonados de cerdo.

No obstante la información disponible en semen y clones de cerdo, hasta el momento los datos acerca del papel de DJ-1, y las vías moleculares relacionadas con esta enzima, durante el desarrollo precoz siguen siendo escasos (tanto a nivel de transcrito, como de proteína). Por tanto, resulta indispensable profundizar en los mecanismos orquestados por esta proteína central en la respuesta al estrés durante el desarrollo temprano. Para ello, se requiere el establecimiento de un sistema experimental en el cual se genere el mayor impacto (pero sin ser completamente letal) por estrés oxidativo durante el desarrollo temprano. Esto tendría una doble finalidad: 1) investigar los mecanismos moleculares por los que el estrés oxidativo ejerce sus efectos adversos durante el desarrollo temprano; y 2) estudiar la posible disminución del impacto del estrés oxidativo a través de la estimulación o suplementación de proteínas con actividad antioxidante. Un momento crucial durante la embriogénesis temprana está constituido por la ventana de desarrollo de la transición materno-embionaria (MET). En dicha etapa una parte importante de las moléculas maternas (ARNs, proteínas) debe de ser degradada para dar paso a la toma del control del programa de desarrollo por parte de moléculas sintetizadas específicamente por el embrión. Dentro de la MET se incluye una subetapa en la cual ocurre la inducción de la transcripción *de novo* a partir del genoma embrionario, momento mejor conocido como la activación del genoma embrionario (EGA), el cual ocurre en bovinos alrededor del estadio de 8-células (Sirard, 2010). De manera interesante Gad et al. (2012) comprobaron en el modelo bovino que el desarrollo al momento de la EGA es un periodo sumamente sensible al estrés debido a las condiciones de cultivo (Fig. 1). Por este motivo, la aplicación de un estrés exógeno alrededor del momento de la EGA podría constituir un sistema robusto para el estudio del estrés oxidativo durante el desarrollo temprano en diversas especies, así como de posibles tratamientos paliativos del mismo. Esto último podría lograrse por medio de la suplementación de moléculas con capacidad antioxidante.

El presente proyecto buscará dilucidar las interrogantes que giran alrededor de los efectos adversos del estrés oxidativo y la regulación molecular de la respuesta antiestrés en un contexto de desarrollo temprano de una gran especie. Esto se logrará por medio de un modelo partenogenético. Paffoni et al. (2008) y Muñoz et al. (2015) establecen que la generación de partenotas es un modelo válido para el estudio de la fisiología durante el desarrollo temprano en mamíferos. Esto se debe a que tras la partenogénesis activada se recapitulan con fidelidad una parte importante de los eventos durante los primeros pasos de la embriogénesis sin necesidad de fertilizar un óvulo. Por otro lado, diversos reportes han demostrado el valor de la partenogénesis activada para la caracterización de la fisiología del desarrollo temprano en bovinos (Lechniak et al., 1998; Bastos et al., 2008; Golding et al., 2011). Con los hallazgos de

este proyecto se incrementará la comprensión de la fisiología durante el desarrollo temprano, mientras que potencialmente generará un método para disminuir los efectos adversos del estrés en el marco del desarrollo precoz. Todo esto resultará en una mejora de las técnicas de producción de embriones, beneficiando tanto a la futura investigación en la disciplina reproductiva, además de la explotación en la industria ganadera (aportaciones tanto para ciencia básica, como aplicada). Por otro lado, es factible aplicar los hallazgos de esta investigación a otros grupos animales, incluyendo no solo aquellos de otras grandes especies, sino también de medianas y pequeñas especies.



**Figura 1.** Etapa altamente sensible al estrés por factores externos durante el desarrollo temprano: d, días; EGA, activación del genoma embrionario; hr, horas; hpi, horas postinseminación; LH, hormona luteinizante. Esquema adaptado de Orozco-Lucero y Sirard (2014), Kasinathan et al. (2015) y Orozco-Lucero (2016).

## OBJETIVOS Y METAS

### **Objetivo General**

Evaluar el impacto del estrés oxidativo, y el de la suplementación de una proteína antioxidante, sobre la competencia al desarrollo de partenotas de bovino, así como la manera en que afectan la actividad mitocondrial y las vías moleculares relacionadas con la respuesta al estrés.

### **Metas y Objetivos Particulares**

Primera Meta: evaluación de los efectos del estrés oxidativo sobre el desarrollo temprano en partenotas de bovino.

Objetivo particular 1.1: generar un sistema *in vitro* de producción de partenotas de bovino.

Objetivo particular 1.2: establecer un sistema para evaluar el efecto del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y la suplementación de proteína DJ-1 recombinante humana (hDJ-1) sobre la tasa de desarrollo de partenotas de bovino generadas *in vitro*.

Segunda Meta: caracterización de los efectos del estrés oxidativo sobre las vías moleculares de la respuesta al estrés durante el desarrollo precoz en bovinos.

Objetivo particular 2.1: evaluar por microscopía confocal la influencia de la suplementación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y/o hDJ-1 sobre el potencial de membrana mitocondrial en partenotas bovinas.

Objetivo particular 2.2: caracterizar por microscopía de epifluorescencia el impacto de la suplementación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y/o hDJ-1 sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) en partenotas de bovino.

Objetivo particular 2.3: evaluar por PCR tiempo real la manera en que la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y/o hDJ-1 afectan los niveles de expresión de los genes *DJ-1*, *NRF2*, *PINK1*, *KEAP1*, *SOD1*, *PRDX1*, *PRDX2*, *GPX* en partenotas bovinas.

Tercera Meta: interpretación del posible significado biológico.

Objetivo particular 3.1: correlacionar la ocurrencia de estrés oxidativo, suplementación de hDJ-1, las tasas de desarrollo, los niveles del potencial de membrana mitocondrial y de ERO, así como la abundancia de los transcritos relacionados con la respuesta a estrés en y partenotas de bovino.

Cuarta Meta: entrega y publicación de resultados.

Objetivo particular 4.1: entrega de dos tesis de licenciatura y conclusión de la sección experimental de una tercera tesis de licenciatura en UACJ-ICB.

Objetivo particular 4.2: envío de un artículo científico para su publicación a una revista indizada o arbitrada.

## METODOLOGÍA

### ***Producción In Vitro de Partenotas de Bovino y Exposición a Estrés Oxidativo y Molécula Antioxidante***

Para la generación *in vitro* de partenotas se emplearán métodos estándar para la obtención de ovocitos de ovarios de vacas sacrificadas en el Rastro Municipal de Ciudad Juárez, así como para su maduración *in vitro* (IVM; Ashkar et al., 2010). Aquellos ovocitos cursando exitosamente hasta el final de la IVM (M-II) se incubarán durante 5 minutos en 5  $\mu\text{M}$  ionomicina diluida en medio TCM-199 (11150-059, Gibco™) suplementado con 2 mg/mL albúmina de suero bovino (BSA). Enseguida, los ovocitos se lavarán en el mismo medio sin ionomicina y se expondrán por 5 horas a una solución de 2.8 mM 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) en medio SOF (Bastos et al., 2008). El momento en que las partenotas abandonen la solución con 6-DMAP se considerará como el tiempo cero horas post-activación partenogenética (0 hPA). Por otra parte, las partenotas se cultivarán *in vitro* hasta el octavo día (D8) de desarrollo partenogenético según una adaptación del protocolo de Ashkar et al. (2010) hasta la obtención de blastocistos.

La exposición a estrés oxidativo y/o proteína antioxidante (Fig. 2) se logrará mediante la incubación entre las 48 y 96 hPA con medio suplementado con 212.5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  y/o 10 ng/mL hDJ-1. Esta proteína se obtendrá tras su sobreexpresión y purificación en un sistema heterólogo de *E. coli* (Vazquez-Mayorga et al., no publicado). Por lo tanto, los grupos experimentales generados serán: 1) Control,  $\text{H}_2\text{O}_2(-)/\text{hDJ-1}(-)$ ; 2)  $\text{H}_2\text{O}_2(+)/\text{hDJ-1}(-)$ ; 3)  $\text{H}_2\text{O}_2(-)/\text{hDJ-1}(+)$ ; y 4)  $\text{H}_2\text{O}_2(+)/\text{hDJ-1}(+)$ .

### ***Medición de Potencial de Membrana Mitocondrial***

Los blastocistos serán colectados a las 192 hPA. El potencial de membrana mitocondrial será evaluado con el protocolo de Pile et al. (2003), Means y Hays (2007) y Roy et al. (2012) por medio de tinción con 300 nM clorometil-X-rosamina, CMX-Ros (Mitotracker Red, Molecular Probes™) tras incubar durante 45 minutos en medio SOF (Ashkar et al., 2010) a 38.5°C bajo una atmósfera de 90%  $\text{N}_2/5\%$   $\text{CO}_2/5\%$   $\text{O}_2/100\%$  humedad. Como control negativo para sustraer los niveles de fondo a la señal de CMX-Ros se empleará el método de Baldoceda-Baldeon et al. (2014) y Baldoceda et al. (2015) con el tratamiento de carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP), un agente que desacopla el potencial de membrana mitocondrial. Para la caracterización de los niveles de potencial de membrana mitocondrial los blastocistos se analizarán en sus planos Z con el microscopio confocal LSM 710 (Zeiss; Oberkochen, Alemania), donde cada partenota corresponderá a una unidad experimental. Todas las imágenes se tomarán con una potencia de laser del 12% y una ganancia de 7.5. Se empleará el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>) para estimar la intensidad real de señal tras descartar el fondo alrededor de la misma (Fig. 2).

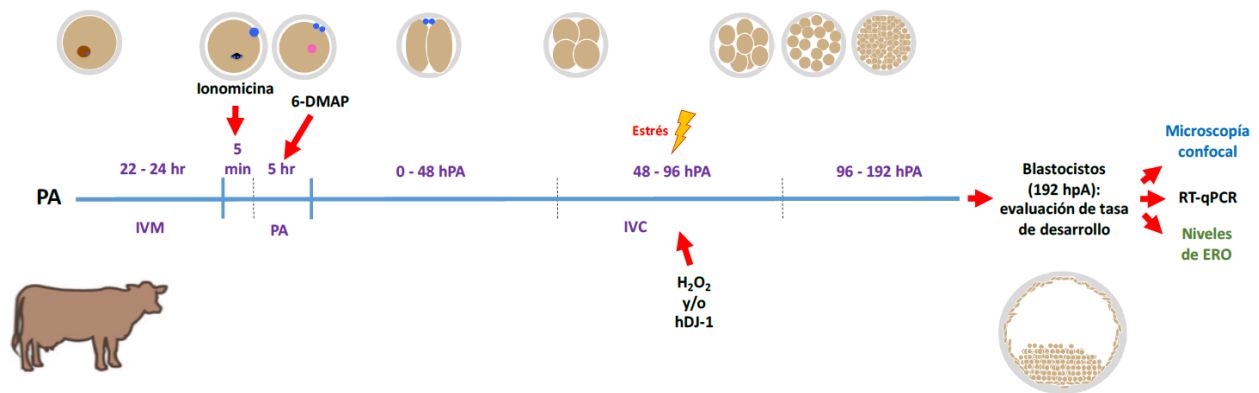
### ***Caracterización de los Niveles de Especies Reactivas de Oxígeno***

Hacia las 192 hPA y 192 hpi se colectarán blastocistos y se teñirán al incubar con medio SOF (Ashkar et al., 2010) suplementado con 5  $\mu\text{M}$  5-(-6)-clorometil-2',7' diclorodihidrofluorescein diacetato acetil ester (DCFDA) por 30 minutos a 38.5°C/90%  $\text{N}_2/5\%$   $\text{CO}_2/5\%$   $\text{O}_2/100\%$  humedad, según una modificación de los métodos de Betts et al. (2014) y Ma et al. (2017). Enseguida, las partenotas se lavarán tres veces con PBS suplementado con 1 mg/mL poivinil pirrolidona y se

montarán en laminillas para ser observados inmediatamente con un microscopio de epifluorescencia DM2000 (Leica; Wetzlar, Alemania). Los niveles de fluorescencia (longitud de onda de excitación, 495 nm; emisión, 520 nm) de ERO serán medidos con ayuda de ImageJ (Fig. 2) al sustraer el promedio de los niveles de autofluorescencia de tres partenotas sin tratar con DFCDA y fijadas con paraformaldehído (Betts et al., 2014).

### Expresión Diferencial de Genes

La expresión génica diferencial se analizará por retrotranscripción y PCR cuantitativa (tiempo real, RT-qPCR). En primer lugar, para la extracción de ARN se generarán pools de 8 partenotas (colectadas a las 192 hPA). Los grupos estarán balanceados en cuanto a su número de blastocistos tempranos, expandidos y eclosionados (Fig. 2). Se utilizarán cinco réplicas biológicas. El ARN total de cada réplica se extraerá con el Arcturus® PicoPure® RNA Isolation Kit (Life Technologies™; Burlington, ON, Canadá), se agregará el control cuantitativo GFP spike-in (Vigneault et al., 2004) y se continuará con una digestión con ADNasa I (Qiagen®; Toronto, Ontario, Canadá). Para la síntesis de ADN copia (ADNc) se empleará oligo-dT y qScript Flex cDNA Synthesis Kit (Quanta Biosciences™; Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.



**Figura 2.** Diseño experimental: 6-DMAP, 6-dimetilaminopurina; ERO, especies reactivas de oxígeno; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrógeno; hDJ-1, proteína recombinante humana DJ-1; hPA, horas post-activación partenogenética; hpi, horas post-inseminación; hr, horas; IVC, cultivo in vitro; IVF, fertilización in vitro; IVM, maduración in vitro; PA, activación partenogenética; RT-qPCR, retrotranscripción y PCR cuantitativa (tiempo real). Esquema adaptado de Orozco-Lucero y Sirard (2014) y Kasinathan et al. (2015).

Para el diseño de primers para PCR cuantitativa (tiempo real, qPCR) de los genes candidatos (*DJ-1*, *NRF2*, *PINK1*, *KEAP1*, *SOD1*, *PRDX1*, *PRDX2* y *GPX*), se empleará la aplicación PrimerQuestSM ([www.idtdna.com/Primerquest](http://www.idtdna.com/Primerquest)) de Integrated DNA Technologies® (IDT; Coralville, IA) tras obtener las secuencias reportadas de dichos genes para *Bos taurus* en el GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)). La qPCR se realizará con el termociclador iQ™5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (BioRad; Hercules, CA) con el programa detallado en la Tabla I. Se empleará el iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad), según el protocolo del fabricante. Cada primer se llevará a una concentración final de 312.5 nM por reacción de 20 µL. Para el análisis cuantitativo primero se generará una recta patrón de seis puntos por triplicado conteniendo cada reacción ya sea 0, 0.02, 0.2, 2, 20, o 200 fg del amplicón en cuestión (Orozco-Lucero et al., 2014) previamente purificado con el Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega; Madison, WI). Para las muestras problema el ADNc se diluirá para incluir el equivalente de 0.075 de blastocisto por reacción de 20 µL y se cuantificará con la ayuda de la recta patrón.

Los datos de qPCR se tratarán con un factor de normalización GeNORM (Vandesompele et al., 2002) tras determinar con el software qBase+ (Biogazelle; Gent, Bélgica) al menos dos de los genes constitutivos más estables entre muestras independientes dentro de una lista incluyendo *ACTB*, *CHUK*, *B2M* (Cagnone et al., 2012), *MYL6*, *PPIA* (Cagnone y Sirard, 2013; Cagnone y Sirard, 2014) y *SDHA* (Orozco-Lucero et al., 2014). Enseguida de la normalización con genes constitutivos se corregirán las variaciones técnicas al normalizar con el *GFP* spike-in (Vigneault et al., 2004), incluido al momento de la extracción de ARN. Finalmente, tras la doble normalización los datos se analizarán estadísticamente por ANOVA.

Tabla I. Programa de PCR Cuantitativa (Tiempo Real)

# Ciclos	Fase	Tiempo/Cambio	T° (°C)
1	Pre calentamiento	5' 00"	95
40	Desnaturalización	0' 30"	95
	Alineamiento	0' 30"	Tm
	Extensión	0' 30"	72
1	Extensión final	2' 00"	72
71	Curva de fusión	0.5°C / 0' 30"	60 – 95
1	Pausa	∞	4

°C, grados Celsius; T°, temperatura; Tm, temperatura de fusión/alineamiento.

### ***Interpretación del Posible Significado Biológico***

Los datos de PCR tiempo real serán cotejados con la literatura disponible, así como con el software de análisis de ontología génica Ingenuity® Pathway Analysis, IPA® (Qiagen®; Toronto, Ontario, Canadá).

## INFRAESTRUCTURA DISPONIBLE

El proyecto se llevará a cabo en los laboratorios de UACJ-ICB, los cuales ya cuentan con la siguiente infraestructura, que junto con los materiales solicitados en esta propuesta, ayudará al buen término de la investigación y obtención de los productos esperados:

*Cultivo in vitro*: incubadora de tres gases (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>); estereomicroscopio; campana de flujo laminar.

*Microscopía*: microscopios regulares para técnica de campo claro; microscopio invertido; microscopio de epifluorescencia; microscopio confocal; cámaras y computadoras acopladas a microscopios.

*Análisis molecular*: cámaras de electroforesis submarina; fuentes de poder; termociclador dual para PCR punto final y PCR tiempo real.

*Uso general*: balanzas analíticas; centrifugas de mesa de baja velocidad no refrigeradas; baños María refrigeradores; congeladores (-20°C); ultracongelador (-80°C); horno de microondas; hornos secos; campana de flujo químico.

## INCIDENCIA DEL PROYECTO EN EL PROGRAMA INTEGRAL DE FORTALECIMIENTO INSTITUCIONAL (PIFI)

En cuanto a la importancia del proyecto en el fortalecimiento institucional de UACJ, debido a que el presente proyecto contribuirá tanto a la investigación básica, como a las aplicaciones en ciencia animal con posibles mejoras en la producción de embriones (parte crucial en la industria ganadera), los resultados potencialmente emplazarán a la UACJ como una institución líder en la investigación a nivel nacional en ciencia reproductiva en ganado mayor (con potencial transferencia del conocimiento a otras especies). Así mismo, el conocimiento adquirido permitirá a nuestra universidad mejorar la vinculación con los productores ganaderos y colocará a la UACJ como una institución de educación superior enfocada a emplear el conocimiento científico generado en ella en beneficio de la sociedad y el sector privado, tanto de la región, como del país. Por otra parte, este trabajo de investigación aportará dos o tres tesis de licenciatura del programa de MVZ (UACJ-ICB). Con ello, en primer lugar se auxiliará a dicho programa educativo a graduar estudiantes de nivel superior. No obstante, una parte medular de los beneficios del presente proyecto consiste en la formación de profesionistas con una alta calidad científica y con la visión de la manera de aplicar los conocimientos adquiridos en beneficio de la industria ganadera y de la sociedad. Lo anterior coadyuvará en la integración de médicos veterinarios graduados de la UACJ comprometidos, ya sea como profesionistas altamente competitivos en su campo, o como futuros estudiantes de posgrado con alto nivel científico. Por otra parte, a pesar de realizarse con un número determinado de estudiantes de nivel licenciatura, este proyecto estimulará el interés de otros estudiantes de los programas de Lic. MVZ y de la Maestría en Ciencia Animal (UACJ-ICB) en las disciplinas de Reproducción Animal y Biología del Desarrollo. Esto garantizaría la realización de futuras tesis de alto nivel en los citados programas de licenciatura y posgrado, aumentando la calidad de los mismos.



Por otra parte, el material y equipos adquiridos para esta investigación no sólo beneficiarán al presente proyecto, sino tanto al fortalecimiento de la infraestructura de la UACJ para futuras investigaciones, como directamente al desempeño de los tres cuerpos académicos involucrados en el trabajo multidisciplinario del proyecto:

A) Cuerpo académico de Producción Animal (LGAC Genética y Reproducción):

- Dr. Ernesto Orozco Lucero (integración al CA en junio de 2018).
- Dr. Eduardo Pérez Eguía.
- Dr. José María Carrera Chávez.
- Dr. Andrés Quezada Casasola.

B) Cuerpo académico de Bioquímica Funcional y Proteómica del Estrés:

- Dr. Alejandro Martínez Martínez.
- Dr. Ángel Gabriel Díaz Sánchez.
- Dra. Marbella Chávez Solano.
- Dr. Naun Lobo Galo.

C) Cuerpo académico de Ecotoxicología y Sistemas Vivos:

- Dr. Luis Fernando Plenge Tellechea.

Así mismo, la investigación y los productos esperados a generarse con la realización de este proyecto contribuirán para obtener un curriculum académico y científico a los miembros de los mencionados cuerpos académicos.

En relación con la vinculación, en primera instancia, ya que los ovarios de vaca que serán empleados en este proyecto provendrán del Rastro Municipal de Ciudad Juárez, esto resultará útil para fortalecer la relación entre nuestra universidad y la mencionada institución. Por otra parte, los conocimientos generados por el proyecto de investigación, con un gran potencial para su aplicación en la industria ganadera, serán sin duda sumamente atractivos para el sector regional de explotación animal. Esto significará un profundo beneficio para el sector privado de la región (por ejemplo, el Grupo Agroindustrial Escobar, S.A. de C.V) y un mejoramiento en la vinculación de la UACJ con empresas con presencia regional e incluso nacional.

En cuanto al impacto de los resultados en la práctica docente la dirección y codirección de tesis de investigación por parte de docentes de UACJ-ICB auxiliará directamente en la mejora de profesores como asesores científicos, mientras que fortalecerá la práctica en la rama de investigación de los programas de licenciatura y posgrado involucrados. Finalmente, gracias a la realización de investigación a través de estudiantes del programa Lic. MVZ (UACJ-ICB), se despertará el interés de otros alumnos del citado programa académico, así como de estudiantes de la Maestría en Ciencia Animal de nuestra institución, tanto en la práctica profesional, como en la investigación en ciencia animal. Esto a su vez motivará una mayor atención de los alumnos por sus diversas clases, además de por sus propios proyectos de investigación debido a la necesidad de vincular el aprendizaje en el aula con el ejercicio profesional y científico.

## CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Diagrama de Gantt												
Para avance de investigación de apoyo a la reincorporación de exbecarios prodep 2018-1.												
No.	Actividades de Investigación	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
1	Obj. Part 1.1: Sistema In Vitro Partenotas	X	X	X								
2	Obj. Part 1.2: Efecto tratamientos en desarrollo		X	X	X	X	X					
3	Obj. Part. 2.1: Confocal			X	X	X	X	X	X			
4	Obj. Part. 2.2: Epifluorescencia			X	X	X	X	X	X			
5	Obj. Part. 2.3: PCR tiempo real			X	X	X	X	X	X			
6	Obj. Part. 3.1: Interpretación									X	X	
7	Obj. Part. 4.1: Entrega de tesis											X
8	Obj. Part 4.2: Envío artículo											X

## REFERENCIAS

- Aitken RJ, Baker MA, Nixon B. 2015. Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? *Asian J Androl* 17:633-9.
- An CN, Jiang H, Wang Q, Yuan RP, Liu JM, Shi WL, Zhang ZY, Pu XP. 2011. Downregulation of DJ-1 protein in the ejaculated spermatozoa from Chinese asthenozoospermia patients. *Fertil Steril* 96:19-23.
- Arias-Alvarez M, Garcia-Garcia RM, Rebollar PG, Gutierrez-Adan A, Lopez-Bejar M, Lorenzo PL. 2013. Ovarian response and embryo gene expression patterns after nonsuperovulatory gonadotropin stimulation in primiparous rabbits does. *Theriogenology* 79:323-30.
- Ashkar FA, Semple E, Schmidt CH, St John E, Bartlewski PM, King WA. 2010. Thyroid hormone supplementation improves bovine embryo development in vitro. *Hum Reprod* 25:334-44.
- Bain NT, Madan P, Betts DH. 2013. Elevated p66Shc is associated with intracellular redox imbalance in developmentally compromised bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 80:22-34.
- Baldoceda L, Gilbert I, Gagne D, Vigneault C, Blondin P, Ferreira CR, Robert C. 2015. Breed-specific factors influence embryonic lipid composition: comparison between Jersey and Holstein. *Reprod Fertil Dev* doi: 10.1071/RD14211.
- Baldoceda-Baldeon LM, Gagne D, Vigneault C, Blondin P, Robert C. 2014. Improvement of bovine in vitro embryo production by vitamin K2 supplementation. *Reproduction* 148:489-97.
- Bastos GM, Goncalves PB, Bordignon V. 2008. Immunolocalization of the highmobility group N2 protein and acetylated histone H3K14 in early developing parthenogenetic bovine embryos derived from oocytes of high and low developmental competence. *Mol Reprod Dev* 75:282-90.
- Bettegowda A, Patel OV, Lee KB, Park KE, Salem M, Yao J, Ireland JJ, Smith GW. 2008. Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. *Biol Reprod* 79:301-9.
- Betts DH, Bain NT, Madan P. 2014. The p66(Shc) adaptor protein controls oxidative stress response in early bovine embryos. *PLoS One* 9:e86978.

- Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA. 2002. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod* 66:38-43.
- Boe-Hansen GB, Rego JP, Crisp JM, Moura AA, Nouwens AS, Li Y, Venus B, Burns BM, McGowan MR. 2015. Seminal plasma proteins and their relationship with percentage of morphologically normal sperm in 2-year-old Brahman (*Bos indicus*) bulls. *Anim Reprod Sci* 162:20-30.
- Bols PEJ, Jorssen EPA, Goovaerts IGF, Langbein A, Leroy JLMR. 2012. High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues. *Anim Reprod* 9:420-5.
- Boni R. 2012. Origins and effects of oocyte quality in cattle. *Anim Reprod* 9:333-40.
- Cagnone GL, Dufort I, Vigneault C, Sirard MA. 2012. Differential gene expression profile in bovine blastocysts resulting from hyperglycemia exposure during early cleavage stages. *Biol Reprod* 86:50.
- Cagnone GL, Sirard MA. 2013. Transcriptomic signature to oxidative stress exposure at the time of embryonic genome activation in bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 80:297-314.
- Cagnone G, Sirard MA. 2014. The impact of exposure to serum lipids during in vitro culture on the transcriptome of bovine blastocysts. *Theriogenology* 81:712-22.
- Camargo M, Intasqui Lopes P, Del Giudice PT, Carvalho VM, Cardozo KH, Andreoni C,
- Fraietta R, Bertolla RP. 2013. Unbiased label-free quantitative proteomic profiling and enriched proteomic pathways in seminal plasma of adult men before and after varicocele. *Hum Reprod* 28:33-46.
- Cao J, Chen X, Ying M, He Q, Yang B. 2017. DJ-1 as a therapeutic target against cancer. *Adv Exp Med Biol* 1037:203-22.
- Castillo-Martin M, Bonet S, Morato R, Yeste M. 2014. Supplementing culture and vitrification-warming media with l-ascorbic acid enhances survival rates and redox status of IVP porcine blastocysts via induction of GPX1 and SOD1 expression. *Cryobiology* 68:451-8.
- Coppede F. 2014. The potential of epigenetic therapies in neurodegenerative diseases. *Front Genet* 5:220.
- Chigusa Y, Kawasaki K, Kondoh E, Mogami H, Ujita M, Fujita K, Tatsumi K, Takeda S, Konishi I. 2016. Simvastatin inhibits oxidative stress via the activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling in trophoblast cells. *J Obstet Gynaecol Res* 42:36-43.
- Choi YJ, Uhm SJ, Song SJ, Song H, Park JK, Kim T, Park C, Kim JH. 2008. Cytochrome c upregulation during capacitation and spontaneous acrosome reaction determines the fate of pig sperm cells: linking proteome analysis. *J Reprod Dev* 54:68-83.
- Gad A, Hoelker M, Besenfelder U, Havlicek V, Cinar U, Rings F, Held E, Dufort I, Sirard MA, Schellander K, Tesfaye D. 2012. Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative in vivo and in vitro culture conditions. *Biol Reprod* 87:100.
- Gardner DK, Lane M. 1998. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum Reprod* 13 Suppl 3:148-59.
- Golding MC, Williamson GL, Stroud TK, Westhusin ME, Long CR. 2011. Examination of DNA methyltransferase expression in cloned embryos reveals an essential role for Dnmt1 in bovine development. *Mol Reprod Dev* 78:306-17.
- Jansen S, Cashman K, Thompson JG, Pantaleon M, Kaye PL. 2009. Glucose deprivation, oxidative stress and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARA) cause peroxisome proliferation in preimplantation mouse embryos. *Reproduction* 138:493-505.
- Kaneko KJ. 2016. Metabolism of Preimplantation Embryo Development: A Bystander or an Active Participant? *Curr Top Dev Biol* 120:259-310.
- Kasinathan P, Wei H, Xiang T, Molina JA, Metzger J, Broek D, Kasinathan S, Faber DC, Allan MF. 2015. Acceleration of genetic gain in cattle by reduction of generation interval. *Sci Rep* 5:8674.
- Kaydos EH, Suarez JD, Roberts NL, Bobseine K, Zucker R, Laskey J, Klinefelter GR. 2004. Haloacid induced alterations in fertility and the sperm biomarker SP22 in the rat are additive: validation of an ELISA. *Toxicol Sci* 81:430-42.
- Khan I, Kim SW, Lee KL, Song SH, Mesalam A, Chowdhury MMR, Uddin Z, Park KH, Kong IK. 2017. Polydatin improves the developmental competence of bovine embryos in vitro via induction of sirtuin 1 (Sirt1). *Reprod Fertil Dev* 29:2011-20.
- Khazaei M, Aghaz F. 2017. Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during in vitro maturation of oocytes. *Int J Fertil Steril* 11:63-70.
- Klinefelter GR, Welch JE, Perreault SD, Moore HD, Zucker RM, Suarez JD, Roberts NL, Bobseine K, Jeffay S. 2002. Localization of the sperm protein SP22 and inhibition of fertility in vivo and in vitro. *J Androl* 23:48-63.

- Krisher RL. 2004. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* 82:14-23.
- Lechniak D, Cieslak D, Sosnowski J. 1998. Cytogenetic analysis of bovine parthenotes after spontaneous activation in vitro. *Theriogenology* 49:779-85.
- Leininger GM, Edwards JL, Lipshaw MJ, Feldman EL. 2006. Mechanisms of disease: mitochondria as new therapeutic targets in diabetic neuropathy. *Nat Clin Pract Neurol* 2:620-8.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. 2003. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim* 38:259-67.
- Lucas JI, Marin I. 2007. A new evolutionary paradigm for the Parkinson disease gene DJ-1. *Mol Biol Evol* 24:551-61.
- Luddi A, Capaldo A, Focarelli R, Gori M, Morgante G, Piomboni P, De Leo V. 2016. Antioxidants reduce oxidative stress in follicular fluid of aged women undergoing IVF. *Reprod Biol Endocrinol* 14:57.
- Ma YY, Chen HW, Tzeng CR. 2017. Low oxygen tension increases mitochondrial membrane potential and enhances expression of antioxidant genes and implantation protein of mouse blastocyst cultured in vitro. *J Ovarian Res* 10:47.
- Means JC, Hays R. 2007. Mitochondrial membrane depolarization in *Drosophila* apoptosis. *Cell Death Differ* 14:383-5.
- Meldrum DR, Casper RF, Diez-Juan A, Simon C, Domar AD, Frydman R. 2016. Aging and the environment affect gamete and embryo potential: can we intervene? *Fertil Steril* 105:548-59.
- Menezo YJ, Silvestris E, Dale B, Elder K. 2016. Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. *Reprod Biomed Online* 33:668-83.
- Miyamoto K, Nagai K, Kitamura N, Nishikawa T, Ikegami H, Binh NT, Tsukamoto S, Matsumoto M, Tsukiyama T, Minami N, Yamada M, Ariga H, Miyake M, Kawarasaki T, Matsumoto K, Imai H. 2011. Identification and characterization of an oocyte factor required for development of porcine nuclear transfer embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:7040-5.
- Muñoz M, Penarossa G, Caamaño JN, Díez C, Brevini TA, Gómez E. 2015. Research with parthenogenetic stem cells will help decide whether a safer clinical use is possible. *J Tissue Eng Regen Med* 9:325-31.
- Orozco-Lucero E. 2016. Role and Modulation of Maternal Transcripts During the First Cleavage Divisions in Bovine Embryos. Tesis doctoral. Université Laval. Quebec (QC), Canadá.
- Orozco-Lucero E, Dufort I, Robert C, Sirard MA. 2014. Rapidly cleaving bovine two-cell embryos have better developmental potential and a distinctive mRNA pattern. *Mol Reprod Dev* 81:31-41.
- Orozco-Lucero E, Sirard MA. 2014. Molecular markers of fertility in cattle oocytes and embryos: progress and challenges. *Anim Reprod* 11:183-94.
- Paffoni A, Brevini TA, Gandolfi F, Ragni G. 2008. Parthenogenetic activation: biology and applications in the ART laboratory. *Placenta* 29 Suppl B:121-5.
- Page-Larivière F, Sirard MA. 2014. Spatiotemporal expression of DNA demethylation enzymes and histone demethylases in bovine embryos. *Cell Reprogram* 16:40-53.
- Pile LA, Spellman PT, Katzenberger RJ, Wassarman DA. 2003. The SIN3 deacetylase complex represses genes encoding mitochondrial proteins: implications for the regulation of energy metabolism. *J Biol Chem* 278:37840-8.
- Raininga PV, Di Trapani G, Tonissen KF. 2017. The multifaceted roles of DJ-1 as an antioxidant. *Adv Exp Med Biol* 1037:67-87.
- Richarme G, Dairou J. 2017. Parkinsonism-associated protein DJ-1 is a bona fide deglycase. *Biochem Biophys Res Commun* 483:387-91.
- Richarme G, Liu C, Mihoub M, Abdallah J, Leger T, Joly N, Liebart JC, Jurkunas UV,
- Nadal M, Bouloc P, Dairou J, Lamouri A. 2017. Guanine glycation repair by DJ-1/Park7 and its bacterial homologs. *Science* 357:208-11.
- Rocha DR, Martins JA, van Tilburg MF, Oliveira RV, Moreno FB, Monteiro-Moreira AC, Moreira RA, Araujo AA, Moura AA. 2015. Effect of increased testicular temperature on seminal plasma proteome of the ram. *Theriogenology* 84:1291-305.
- Rocha-Frigoni NA, Leao BC, Dall'Acqua PC, Mingoti GZ. 2016. Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured in vitro with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development. *Theriogenology* 86:1897-905.
- Roy S, Short MK, Stanley ER, Jubinsky PT. 2012. Essential role of *Drosophila* blackpearl is mediated by its effects on mitochondrial respiration. *FASEB J* 26:3822-33.
- Sirard MA. 2010. Activation of the embryonic genome. *Soc Reprod Fertil Suppl* 67:145-58.

- Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65:126-36.
- Sulzer D, Alcalay RN, Garretti F, Cote L, Kanter E, Agin-Lieb J, Liang C, McMurtrey C, Hildebrand WH, Mao X, Dawson VL, Dawson TM, Oseroff C, Pham J, Sidney J, Dillon MB, Carpenter C, Weiskopf D, Phillips E, Mallal S, Peters B, Frazier A, Lindestam Arlehamn CS, Sette A. 2017. T cells from patients with Parkinson's disease recognize  $\alpha$ -synuclein peptides. *Nature* 546:656-61.
- Sun Y, Zhang WJ, Zhao X, Yuan RP, Jiang H, Pu XP. 2014. PARK7 protein translocating into spermatozoa mitochondria in Chinese asthenozoospermia. *Reproduction* 148:249-57.
- Takemura S, Ichikawa H, Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T, Minamiyama Y. 2014. S-allyl cysteine ameliorates the quality of sperm and provides protection from age-related sperm dysfunction and oxidative stress in rats. *J Clin Biochem Nutr* 55:155-61.
- Trapphoff T, Heiligentag M, Simon J, Staubach N, Seidel T, Otte K, Frohlich T, Arnold GJ, Eichenlaub-Ritter U. 2016. Improved cryotolerance and developmental potential of in vitro and in vivo matured mouse oocytes by supplementing with a glutathione donor prior to vitrification. *Mol Hum Reprod* 22:867-81.
- Truong T, Gardner DK. 2017. Antioxidants improve IVF outcome and subsequent embryo development in the mouse. *Hum Reprod* doi: 10.1093/humrep/dex330.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.
- Vazquez-Mayorga E, Diaz-Sanchez AG, Dagda RK, Dominguez-Solis CA, Dagda RY, Coronado-Ramirez CK, Martinez-Martinez A. 2016. Novel redox-dependent esterase activity (EC 3.1.1.2) for DJ-1: Implications for Parkinson's disease. *Int J Mol Sci* 17 pii:E1346.
- Vazquez-Mayorga E, Torres-Carreón MA, Coronado-Ramirez CK, Aguirre-Reyes LG, Martinez-Martinez A, Diaz-Sanchez AG. Biochemical characterization of the human recombinant DJ-1 enzyme under oxidative conditions. No publicado.
- Vigneault C, McGraw S, Massicotte L, Sirard MA. 2004. Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. *Biol Reprod* 70:1701-9.
- Wang J, Wang J, Zhang HR, Shi HJ, Ma D, Zhao HX, Lin B, Li RS. 2009. Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality. *Asian J Androl* 11:484-91.
- Wrench N, Pinto CR, Klinefelter GR, Dix DJ, Flowers WL, Farin CE. 2010. Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen. *Anim Reprod Sci* 119:219-27.
- Xu XM, Moller SG. 2010. ROS removal by DJ-1: Arabidopsis as a new model to understand Parkinson's Disease. *Plant Signal Behav* 5:1034-6.
- Zullo G, De Canditiis C, Pero ME, Albergo G, Salzano A, Neglia G, Campanile G, Gasparri B. 2016. Crocetin improves the quality of in vitro-produced bovine embryos: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and apoptosis. *Theriogenology* 86:1879-85.