



UBA
Universidad de Buenos Aires



Facultad de Ciencias
VETERINARIAS
Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Veterinarias

Cátedra de Química Biológica

INITRA

Tesis de Doctorado

*“Maduración y fecundación de ovocitos bovinos in vitro:
Participación de las especies reactivas del oxígeno”*

Autor: Vet. Sergio Adrián Morado

Director: Dr. Gabriel Carlos Dalvit

Disciplina: Bioquímica de la Reproducción

*“Es de importancia para quien desee alcanzar
una certeza en su investigación,
el saber dudar a tiempo”*, **Aristóteles.**

*“and let thy feet, millenniums hence,
be set in midst of knowledge”*, **Lord Tennyson.**

A mi mamá.

Porque ni esta tesis ni quien soy existirían sin ella.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas y las instituciones sin las cuales esta tesis y el enorme crecimiento académico, profesional y personal que la acompañaron no hubieran sido posibles.

Al Prof. Dr. Gabriel Dalvit, por haber dirigido esta tesis y la beca estímulo que la precedió, por su paciencia y comprensión tanto en aspectos laborales como personales, por sus enseñanzas en el laboratorio, por brindarme siempre un punto de vista diferente y enriquecedor y, principalmente, por haberme brindado la libertad para desarrollarme como investigador.

Al Prof. Dr Pablo Cetica, por haberme guiado en mis primeros años como docente y como investigador, por su calidez y su incansable dedicación a la cátedra y a la facultad.

A la Prof. Dra. Martha Beconi, por su invaluable aporte al plan de tesis doctoral, por su condición humana, por ser un ejemplo de pasión y alegría por el trabajo y por ser la guía e inspiradora de nuestra querida cátedra durante tantos años.

Al Dr. Gabriel Álvarez y la Dra. Cynthia Gutnisky, por su amistad, por su acompañamiento en el día a día y por haberme ayudado y enseñado con tanta buena predisposición y generosidad en mis comienzos en el trabajo con ovocitos.

Al Dr. Pablo Rodriguez, por su amistad, por su camaradería en la cátedra y fuera de ella y por haberme enseñado las técnicas básicas de espermatozoología que luego utilicé en la FIV que desarrollé para esta tesis.

Al Vet. Matías Tellado, por haberme acompañado en mis primeros pasos en la cátedra, por tantas clases, congresos y risas compartidas y por ser como un hermano para mí en todo momento.

A las Mg. Mercedes Satorre y Silvina Fernández y a las Dras. Sol Pérez Aguirreburualde, Mariana Córdoba y Elizabeth Breininger, por su compañía y tolerancia diaria, por soportar y acompañar mis bromas y por celebrar mis mates y mis cafés del mediodía.

A todos los ayudantes que me han acompañado durante estos años en las cursadas y salidas, por haberme brindado su amistad y por renovar cada año la energía y la pasión característica de nuestra cátedra.

A toda la familia de Química Biológica (profesores, jefes de trabajos prácticos, ayudantes y no docentes), por permitirme ser parte de ella, por valorarme siempre y por hacer que cada día sea un motivo de alegría ir a trabajar.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, a sus autoridades, docentes y estudiantes, por brindarme las condiciones y los recursos materiales necesarios para realizar esta tesis, por hacer que todo este trabajo valga la pena y por darme la posibilidad de vivir de un trabajo que me apasiona.

A los frigoríficos Deltacar y Rioplatense, por aportar los ovarios sin los cuales no hubieran podido llevarse a cabo las experiencias de esta tesis.

Al Sr. Hugo Chavez, por recolectar los ovarios durante gran parte de este trabajo.

A mis amigos, por acompañarme incondicionalmente, aún más de lo que hubiera esperado, en todas las circunstancias personales que me sucedieron en estos años y que tanto me hicieron crecer como persona.

A mis padres Marta y Jaime, a mi hermano del alma, Max, a mis abuelas Valentina y Esther y a mis abuelos Fernando y José, por inculcarme los valores que me guían como persona y profesional, por su dedicación, su comprensión, su cariño y por enseñarme que el título más importante al que puede aspirar un hombre es el de "Señor".

A Gisela, por su apoyo constante e inquebrantable, por escucharme y bancarme siempre, por ser mi compañera, por abrirme las puertas de su casa, su familia (que también es la mía) y su vida, por hacerme querer ser mejor persona, por su amor inmenso y por hacerme tan feliz cada día.

Índice de contenidos	Página
Abreviaturas	I
Resumen	IV
Abstract	VIII
Introducción general	
1) Importancia de la producción bovina en Argentina	2
2) Biotecnología de la reproducción aplicada a la especie bovina	2
3) Características reproductivas de la especie bovina	3
4) Ovogénesis, foliculogénesis y desarrollo folicular	3
5) Maduración del ovocito bovino	7
6) Activación del ovocito bovino	11
7) Especies reactivas del oxígeno y estado redox	13
8) Especies reactivas del oxígeno y estado redox en sistemas reproductivos	16
Hipótesis	19
Objetivos	21
Materiales y métodos generales	
Recolección de los complejos ovocito-cúmulus inmaduros bovinos	24
Maduración de ovocitos bovinos <i>in vitro</i>	25
Evaluación de la maduración	25
Determinación de la producción de ROS	27
Análisis estadístico	28
Capítulo 1	
<i>Producción de ROS durante la MIV de ovocitos bovinos</i>	
Introducción	30
Materiales y métodos	

Determinación de la producción de ROS	33
Resultados	
Determinación de la producción de ROS durante la maduración <i>in vitro</i>	34
Discusión	35
Capítulo 2	
<i>Producción de ROS y estado redox en la activación de ovocitos bovinos in vitro</i>	
Introducción	39
Materiales y métodos	
Activación de ovocitos maduros mediada por espermatozoides	40
Activación partenogenética de ovocitos maduros	40
Determinación del estado redox y el estadio nuclear	41
Determinación de especificidad de las técnicas de tinción	41
Resultados	
Activación mediada por espermatozoides	42
Activación partenogenética	42
Determinación del estado redox en las activaciones mediada por espermatozoides y partenogenética	43
Determinación de la producción de ROS en las activaciones mediada por espermatozoides y partenogenética	44
Discusión	48
Capítulo 3	
<i>Participación del GSH en la producción de ROS, MIV y FIV</i>	
Introducción	52
Materiales y métodos	
Maduración de ovocitos bovinos <i>in vitro</i> en presencia o ausencia de moduladores de GSH	54
Determinación de la producción de ROS	55
Fecundación de ovocitos bovinos madurados <i>in vitro</i> en presencia o ausencia de cisteína	55
Resultados	55

Discusión	57
Capítulo 4	
<i>Participación del ON en la producción de ROS, MIV y FIV</i>	
Introducción	60
Materiales y métodos	
Maduración de ovocitos bovinos <i>in vitro</i>	
en presencia o ausencia de moduladores de la producción de ON	64
Determinación de la producción de ROS	64
Fecundación de ovocitos bovinos madurados <i>in vitro</i>	
en presencia o ausencia de L-NAME	64
Resultados	65
Discusión	67
Capítulo 5	
<i>Participación de la NADPH oxidasa en la producción de ROS, MIV y FIV</i>	
Introducción	70
Materiales y métodos	
Maduración de ovocitos bovinos <i>in vitro</i>	
en presencia o ausencia de un inhibidor de la NADPH oxidasa	72
Determinación de la producción de ROS	72
Fecundación de ovocitos bovinos madurados <i>in vitro</i>	
en presencia o ausencia de IDP	72
Resultados	73
Discusión	74
Capítulo 6	
<i>Participación de sistemas de generación y remoción H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$ en la MIV</i>	
Introducción	77
Materiales y métodos	
Maduración de ovocitos bovinos <i>in vitro</i> en presencia o ausencia	

de sistemas generadores o scavengers de H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$	80
Determinación de la producción de ROS	80
Resultados	
Efecto de sistemas de generación y remoción de H_2O_2	80
Efecto de sistemas de generación y remoción de $O_2^{\bullet-}$	82
Discusión	83
Capítulo 7	
<i>Participación de la cadena respiratoria en la producción de ROS durante la MIV</i>	
Introducción	86
Materiales y métodos	89
Resultados	
Efecto de moduladores de cadena respiratoria	89
Discusión	90
Conclusiones generales	92
Consideraciones finales	96
Bibliografía	100
Anexo	132

ADN: ácido desoxirribonucleico
AMPc: adenosín monofosfato cíclico
ANOVA: análisis de varianzas (del inglés *Analysis of variance*)
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
ATP: adenosín trifosfato
BSA: albúmina sérica bovina
Ca²⁺: calcio
CCCP: carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona
CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno
COCs: complejos ovocito-cúmulus
DCHFDA: 2',7'-diclorodihidrodiacetato de fluoresceína
6-DMAP: 6-dimetil amino purina
DN: detanonoato
eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial
FAD: flavina adenina dinucleótido
FDA: diacetato de fluoresceína
FIV: fecundación *in vitro*
FSH: hormona folículo estimulante
FPM: factor promotor de la maduración
GMPc: guanosín monofosfato cíclico
GSH: glutatión reducido
GSSG: glutatión oxidado
H⁺: protón
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides
IDP: difeniliodonio
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
KCN: cianuro de potasio
LH: hormona luteinizante
L-NAME: L-nitro arginina metil éster
LOONO: alquil peroxinitritos
MAPK: protein quinasas activadas por mitógenos
MIV: maduración *in vitro*

MI: metafase I

MII: metafase II

mSOF: fluido oviductal sintético modificado

NAD: nicotinamida adenina dinucleótido

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducida

NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida

NOS: óxido nítrico sintasa

O₂: oxígeno

O₂^{•-}: anión superóxido

ON: óxido nítrico

ONOO⁻: peroxinitrito

OH[•]: hidroxilo

PBS: buffer fosfato salino

ROS: especies reactivas del oxígeno (del inglés reactive oxygen species)

RVG: ruptura de la vesícula germinal

SFB: suero fetal bovino

SNP: nitroprusiato de sodio

SOD: superóxido dismutasa

TALP: medio tyrodes-albúmina-lactato-piruvato

VG: vesícula germinal

XOD: xantina oxidasa

El papel de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en los procesos relacionados con la manipulación y el cultivo de gametas y embriones *in vitro* es controversial. Se ha propuesto que un adecuado nivel de (anión superóxido) $O_2^{\cdot -}$ sería beneficioso durante la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos bovinos para aumentar su competencia de desarrollo. En concordancia, se observó un aumento gradual en los niveles de ROS desde el estadio de dos células al de mórula tardía, que podría depender de los cambios en el metabolismo del embrión bovino durante su desarrollo. Por otro lado, diversos estudios han demostrado la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes a lo largo del cultivo *in vitro* de ovocitos y complejos ovocito-cumulus y sostienen que para que el embrión adquiriera la competencia de desarrollo sería importante también que los antioxidantes sean almacenados en el ovocito (como ARNm o proteínas) durante el crecimiento y la maduración.

Los reportes aparentemente contradictorios encontrados en la bibliografía y los resultados previos de nuestro grupo justifican la necesidad de profundizar la investigación para determinar si las ROS desempeñan un rol importante en el progreso meiótico y/o en la maduración citoplasmática del ovocito. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo fue determinar la posible fluctuación en la producción de ROS durante la maduración y activación *in vitro* de ovocitos bovinos en presencia de diferentes moduladores y su relación con los principales eventos de ambos procesos.

En este trabajo la producción de ROS demostró ser fluctuante durante las 22 hs de la maduración. Se observó una significativa disminución en la generación de ROS entre las 2 y las 18 hs, que podría corresponder a un período que demanda una alta producción de energía por parte de la cadena respiratoria para la síntesis de proteínas requeridas durante las fases preparatorias para los eventos principales de la MIV.

En cuanto al proceso de activación, observamos que existen patrones metabólicos diferentes entre ovocitos no activados, activados por espermatozoides y activados partenogénicamente. El comportamiento contrastante observado en las fluctuaciones de los niveles ROS y de actividad oxidativa entre la activación mediada por espermatozoides y la partenogénica podría estar relacionado con la diferencia que presentan ambos tipos de activación con respecto a los picos de liberación de Ca^{+2} . El pico único de liberación de Ca^{+2} desencadenado por la activación partenogénica no sería eficiente para estimular a la mitocondria en forma consistente, siendo así responsable de la menor competencia de desarrollo observada en este tipo de activación.

Mediante la modulación de los niveles de glutatión reducido (GSH) pudimos observar que si bien el rol antioxidante del GSH podría ser suplido por otros componentes del sistema antioxidante del ovocito, su participación en el mantenimiento de la morfología del huso meiótico sería esencial para que se lleve a cabo la maduración.

Al analizar el efecto de la modulación de los niveles de óxido nítrico (ON) exógeno y endógeno sobre la producción de ROS durante la MIV, la adición de un donante de ON demostró ser perjudicial para la maduración independientemente de las variaciones en los niveles de ROS. Por lo tanto, podemos concluir que un aumento en la concentración de ON en el ovocito impediría el progreso meiótico tanto por la formación de ONOO^- como por la inhibición de la enzima Map quinasa y del factor promotor de la maduración, que intervienen en sistemas de señalización intracelular claves para la maduración.

Mediante la adición de un inhibidor de la NADPH oxidasa al medio de MIV determinamos que la inhibición de la enzima no generaría cambios en los niveles de ROS del ovocito, pero la disminución del $\text{O}_2^{\bullet-}$ generado por esta enzima afectaría la tasa de clivaje embrionario, posiblemente por la participación de este compuesto en mecanismos de señalización intracelular necesarios para la activación.

Al estudiar el efecto de la adición de sistemas enzimáticos moduladores de los niveles de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ observamos que si bien la adición de sistemas generadores de estos compuestos serían perjudiciales para la calidad del ovocito, el uso de scavengers alteraría el proceso de maduración por intervenir con diferentes mecanismos de señalización intracelular. Estos resultados estarían demostrando que determinados niveles de ROS son necesarios para que el ovocito bovino lleve a cabo la maduración posiblemente por participar en sistemas de señalización que intervienen en el proceso.

Mediante la adición de moduladores de la actividad de la cadena respiratoria determinamos que el aporte de ATP de la respiración celular sería especialmente importante a las 12 hs, momento en el cual hay una elevada demanda de actividad metabólica con una activa síntesis proteica y que coincide con la transición entre las metafases I y II.

En conclusión, se determinó una significativa fluctuación de los niveles de ROS a lo largo de la maduración y la activación de ovocitos bovinos *in vitro*. Las variaciones observadas tienen relación con eventos clave de ambos procesos y son relevantes para aumentar el conocimiento respecto de la competencia de desarrollo de los ovocitos y los embriones tempranos. Estos resultados justifican la importancia de realizar futuras experiencias para dilucidar si las fluctuaciones responden solamente a las variaciones en la actividad metabólica o si determinadas ROS intervienen además en sistemas regulatorios o de señalización celular. A su vez, estudios posteriores sobre el control metabólico de la activación partenogenética podrían contribuir a mejorar la performance de los embriones obtenidos mediante esta activación en diferentes aplicaciones biotecnológicas como transferencia nuclear, clonación y transgénesis.

The role of reactive oxygen species (ROS) in the processes related with gametes and embryo *in vitro* culture and manipulation is still controversial. It has been proposed that an adequate level of $O_2^{\cdot-}$ (superoxide anion) would be necessary during bovine oocyte *in vitro* maturation (IVM) in order to increase their developmental competence. In coincidence, a gradual increase in ROS levels has been observed in embryos developing from 2-cells until morula stage, which could depend on the metabolic changes that occur in the bovine embryo. On the other hand, certain studies have demonstrated the expression of genes which codify for antioxidant enzymes throughout the *in vitro* culture of cumulus-oocyte complexes. These studies propose that the storage of antioxidants in the oocyte during its growth and maturation (in the forms of mRNA or proteins) would be important for the future embryo to achieve developmental competence.

The apparent contradiction in some of the existing reports, together with the results obtained in previous studies in our laboratory, suggest the need to develop further research to determine if ROS play an important role in the meiotic progress and cytoplasmic maturation of the oocyte. Therefore, the main aim of this work was to determine the possible fluctuation in ROS production during *in vitro* maturation and activation of bovine oocytes and its relation with key events of both processes.

In this study, ROS production proved to be fluctuating during the whole process of IVM. A significant difference was observed in ROS generation between 2 and 18h, which could correspond to a period of time which demands a high energy production in the respiratory chain for protein synthesis during the preparatory stages of IVM key events.

With respect to oocyte activation, we observed distinct metabolic patterns between non-activated, sperm mediated and parthenogenetically activated oocytes. The different behaviour as regards ROS levels and oxidative activity in sperm mediated and parthenogenetic activation could be related to the difference in the Ca^{+2} waves which has

been documented between both types of activation. The unique Ca^{+2} wave triggered by parthenogenetic activation would not be efficient to stimulate mitochondria consistently, being therefore responsible for the lower developmental competence reported in this type of activation.

Modulating reduced glutathione (GSH) levels we observed that although GSH role as antioxidant could be compensated by other components of the oocyte's antioxidant system, its participation in the maintenance of the meiotic spindle morphology would be essential for maturation.

When we analysed the effect of the modulation of nitric oxide (NO) endogenous and exogenous levels on ROS production during IVM, the addition of NO donors proved to be deleterious for maturation regardless of the variations in ROS levels. Therefore, we could conclude that an increase in NO levels in the oocyte could impair meiotic progression both due to the formation of peroxynitrite or due to the inhibition of the mitogen activated protein kinase and the maturation promoting factor, which are involved in intracellular signal transduction systems that play a role in maturation.

The inhibition of the NADPH oxidase by the addition of an enzymatic inhibitor to IVM medium showed that the inhibition of the enzyme would not generate changes in ROS levels, but the consequent decrease in the generation of $\text{O}_2^{\cdot-}$ would affect embryo cleavage rate, probably due to the participation of this ROS in signalling systems involved in the process of activation.

The addition of enzymatic systems to modulate hydrogen peroxide (H_2O_2) and $\text{O}_2^{\cdot-}$ levels showed that although the addition of H_2O_2 and $\text{O}_2^{\cdot-}$ generating systems could be deleterious for oocyte quality, the use of scavengers would alter maturation by interfering with intracellular signaling systems. These results would demonstrate that certain ROS

levels are necessary for bovine oocyte maturation, probably due to their participation in signalling systems of the process.

Using modulators of the mitochondrial respiratory chain activity we determined that the ATP produced in the mitochondria would be especially important at 12 h, a period of time in which there is a high metabolic activity due to an intense protein synthesis coinciding with the metaphase I – metaphase II transition.

In conclusion, we determined significant fluctuations in ROS levels during the *in vitro* maturation and activation of bovine oocytes. The observed variations are related to key events of both processes and are relevant to increase the knowledge regarding the developmental competence of oocytes and early embryos. These results suggest that it would be important to lead future experiments in order to elucidate if the fluctuations observed only respond to variations in metabolic activity or if certain ROS also play a role in intracellular regulatory or signalling systems. Moreover, further studies on the metabolic control of parthenogenetic activation could contribute to improve the performance of parthenogenetic embryos in different biotechnological applications such as nuclear transfer, cloning and trans genesis.

1) Importancia de la producción bovina en Argentina

De acuerdo al informe de stock 2013 de ganadería bovina, en la Argentina hay 52,13 millones de cabezas de ganado bovino (Informe de stock 2013 de ganadería bovina, mapa de existencia e indicadores ganaderos, INTA, SENASA, RIAN, 2013). De esta manera, la actividad participa en un 6% del PBI nacional. A su vez, según informes del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (MAGYP), en el año 2013 se faenaron 12,93 millones de cabezas, que representan unos 2,84 millones de toneladas de carne bovina, lo cual posiciona a la Argentina en el sexto lugar a nivel mundial, participando en un 2,34% de la producción mundial de res con hueso (57,52 millones de toneladas totales; informes de la MAGYP y del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos).

En este contexto, las contribuciones de la biotecnología reproductiva incluyendo inseminación artificial, fecundación *in vitro* (FIV), transferencia embrionaria e ingeniería genética, constituyen un aspecto fundamental para la constante mejora de la producción bovina.

2) Biotecnología de la reproducción aplicada a la especie bovina

La biotecnología de la reproducción comprende las técnicas que permiten aumentar la eficiencia reproductiva de los animales. El desarrollo biotecnológico de la producción de embriones *in vitro* en animales de interés zootécnico es primordial en países de marcada economía agrícola-ganadera, en particular en la Argentina, que se destaca históricamente por su aptitud productiva en la especie bovina.

Sin embargo, la producción de embriones bovinos *in vitro* dista de ser óptima. Una de las principales causas radica en la deficiente maduración *in vitro* del ovocito (MIV) (Krisher *et al.*, 2004; Sirard y Coenen, 2006), lo cual se debe a que la información acerca de los requerimientos de los complejos ovocito-cumulus (COCs) para lograr una adecuada maduración son aún insuficientes (Gardner, 1998; Thompson, 2006).

Actualmente las biotecnologías utilizadas en el ganado bovino comprenden: inseminación artificial, congelamiento de semen, sincronización e inducción de la ovulación, superovulación, transferencia y congelamiento de embriones, determinación y

selección del sexo de embriones y espermatozoides, producción *in vitro* de embriones, clonado de animales por medio de la transferencia nuclear y micromanipulación de embriones para producir mellizos homocigotas y quimeras (Palma y Brem, 2001). Estas biotecnologías tienen importancia *per se* porque permitieron enormes avances en las áreas de la salud y producción animal ya que posibilitaron la eliminación y/o disminución de enfermedades de transmisión sexual aumentando al mismo tiempo el progreso genético, pero además sirvieron de soporte para el avance en otras áreas como la ingeniería genética, donde ya se desarrollan animales transgénicos con fines farmacéuticos.

A pesar de todas las proyecciones potenciales de estas biotecnologías la principal limitante sigue siendo el costo, por lo cual ninguna de éstas, solas o en combinación, pudo utilizarse en forma masiva. Hasta ahora, su uso se encuentra restringido a animales de alto valor genético, ya sea de especies domésticas, de interés zootécnico o en peligro de extinción.

3) Características reproductivas de la especie bovina

El ganado bovino pertenece a la familia Bovidae, subfamilia Bovinae, género *Bos*, especie *taurus*. Existen dos subespecies: *Bos taurus indicus* (cebú) y *Bos taurus primigenius* (uro). La especie bovina es poliéstrica anual, presentando ciclos reproductivos regulares a lo largo de todo el año con una duración de 21 ± 3 días, y monotoca, es decir, de gestación simple, asociada a ovulación simple y la gestación dura entre 270 y 290 días, con un puerperio de 45 días aproximadamente en vacas saludables (Bane y Rajakoski, 1961).

4) Ovogénesis, folículogenesis y crecimiento folicular

En esta especie las células germinales se diferencian a ovogonias a partir de los 45 días y éstas continúan dividiéndose hasta que su actividad replicativa se detiene cerca de los 5 meses (Baker y Hunter, 1978; Holy, 1983). Algunas ovogonias comienzan a diferenciarse en ovocitos primarios para ingresar a la primera profase meiótica a los 75-80 días (Erickson, 1966a; Gordon, 1994). El núcleo del ovocito primario se arresta o queda

detenido en el estadio de diplotene de la profase I, denominado en la hembra como dictiotene. Cerca del nacimiento ocurre la atresia prediploténica en la que todas las ovogonias y los ovocitos que no llegaron a este estadio desaparecen (Baker, 1986). Una hembra bovina al momento de nacer tiene aproximadamente 150.000 ovocitos primarios rodeados de una capa de células epiteliales planas constituyendo folículos primordiales. El núcleo del ovocito primario permanece en dictiotene en forma de vesícula germinal durante el crecimiento del ovocito y el desarrollo folicular, no reanudando la meiosis hasta que el folículo llega a su madurez en el animal adulto. En las hembras mamíferas se produce un reclutamiento precoz de folículos primordiales en la etapa fetal y juvenil que son conducidos a la atresia. Por esta causa en la ternera de 3 meses el número de ovocitos decrece a la mitad (Erikson, 1966b; Holy, 1983; Gordon, 1994). No se conocen aún con certeza los motivos del reclutamiento que dan comienzo al desarrollo folicular y al crecimiento del ovocito primario. A partir de la pubertad se produce un aumento en la concentración de gonadotrofinas y sólo 1 ó 2 de los folículos reclutados desarrollan un folículo maduro o de De Graaf. En los mamíferos, menos del 10% del total de los folículos llegan a este estadio final y el resto de los folículos se atresian. Así, en la hembra bovina de 1,5 - 3 años el número de ovocitos decrece a 21.000 y a los 12 - 14 años es sólo de 2.500 (Holy, 1983).

En la corteza del ovario tiene lugar el desarrollo del folículo, que consiste en un aumento de tamaño, diferenciación de las envolturas foliculares, multiplicación de las células epiteliales, formación de la cavidad folicular y cambio de ubicación del ovocito en la periferia de la misma. Los folículos ováricos se clasifican según las etapas consecutivas de desarrollo (Gordon, 1994; Greenwald y Shyamal, 1994) (figura 1). El folículo primordial incluye un ovocito primario recubierto por una sola capa de células epiteliales aplanadas. En el folículo primario las células epiteliales de la capa externa se transforman en cuboideas y entre éstas y el ovocito, aparecen pequeños y delgados filamentos que constituirán la zona pellucida, producida por secreción de ambos tipos de células. En el folículo secundario el ovocito está en la fase final de crecimiento, la zona pellucida está desarrollada, varias capas de células epiteliales rodean al ovocito constituyendo las células de la granulosa y las células intersticiales se convierten en la teca interna. El folículo terciario, que tiene un diámetro que oscila entre 0,1 y 10 mm en el bovino (Lussier *et al.*, 1987), incluye al ovocito que completa su fase de crecimiento.

Durante la fase de crecimiento, el ovocito bovino aumenta de tamaño pasando de 30 - 50 μm a 130 - 145 μm de diámetro (140 - 160 μm incluyendo a la zona pellucida),

continuando la multiplicación epitelial de las células de la granulosa al mismo tiempo que se forman cavidades con líquido folicular que luego se fusionan originando una sola cavidad o antro folicular (Motlik y Fulka, 1986) y rodeando a la teca interna se organiza la teca externa. Debido a la presión del líquido folicular, las células de la granulosa se ubican en la periferia tapizando la cavidad del folículo y el ovocito se desplaza a una posición excéntrica manteniendo a su alrededor células de la granulosa llamadas cumulus oophorus. A partir del aparato de Golgi se originan los gránulos corticales que se distribuyen en la periferia del ovocito y cuya función es participar en el bloqueo de la polispermia en la fertilización. La membrana plasmática del ovocito u oolema sufre cambios en sus dominios y aparecen microvellosidades, ambos eventos asociados a la adquisición de la capacidad de fusión con el espermatozoide. La zona pellucida se desarrolla entre el ovocito y las células epiteliales que lo rodean, pero no se pierde el contacto entre ambas debido a la persistencia de prolongaciones de las células epiteliales que se contactan con el oolema por uniones comunicantes o “gap junctions”, permitiendo el pasaje de moléculas entre las células epiteliales y el ovocito. El oolema es impermeable a varios metabolitos de bajo peso molecular (colina, uridina, inositol, etc.) que no podrían ingresar al ovocito sin la presencia de estas prolongaciones celulares y las uniones comunicantes. Tanto las células de la granulosa como las del cumulus se encuentran asociadas entre sí por el mismo tipo de uniones, permitiendo el pasaje de pequeñas moléculas entre ellas (Fleming y Saacke, 1972; Kruij *et al.*, 1983; Gordon, 1994; Wassarman y Albertini, 1994a; Hyttel *et al.*, 1997). La masa celular cumulus-granulosa y el ovocito puede ser entonces considerada como un sincitio funcional y estructural (Thibault *et al.*, 1987; Suss *et al.*, 1988). De esta manera las células del cumulus y de la granulosa pueden actuar como soporte nutricional del ovocito para su normal crecimiento (Buccione *et al.*, 1990).

El folículo maduro o de De Graaf, presenta las características morfológicas de un folículo terciario pero con un gran desarrollo del antro folicular y el consecuente aplanamiento del estrato granuloso, alcanzando en el bovino un diámetro de 15 a 20 mm. Como en la mayoría de los mamíferos, el ovocito bovino completa la primera división meiótica pocas horas antes de la ovulación convirtiéndose en un ovocito secundario.

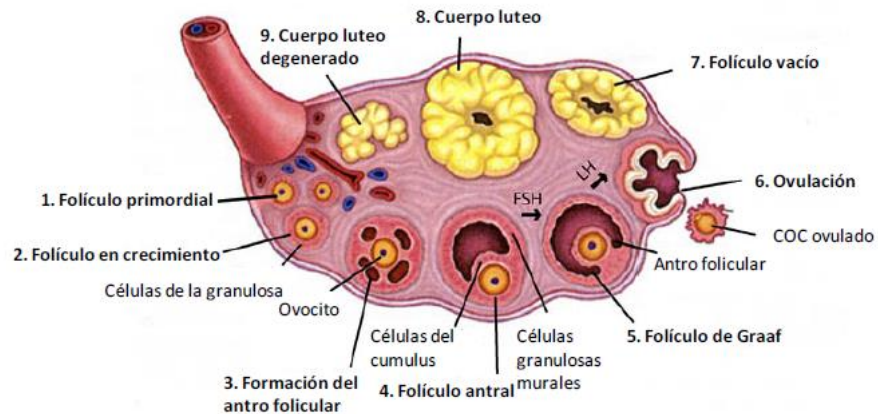


Figura 1: Corte sagital de un ovario mostrando folículos en distinto grado de desarrollo. Adaptado de <http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/groups/mschuh/thebasics.html#devoocyte>.

Durante el crecimiento del ovocito, a su vez, ocurren cambios dinámicos en la arquitectura y la función de la cromatina, los cuales proporcionan un importante mecanismo epigenético para el control de la expresión génica (De La Fuente, 2006). Se han descrito 4 estadios de vesícula germinal (VG). VG0 se caracteriza por un patrón filamentoso difuso de la cromatina en toda el área nuclear. VG1 es similar a VG0 excepto por unos pocos focos de condensación. En VG2 la cromatina se condensa aún más en focos que se distribuyen por todo el nucleoplasma, mientras que en VG3 la cromatina se condensa en un sólo aglutinado. Estas modificaciones han sido relacionadas con el final del crecimiento del ovocito, la disminución de la actividad transcripcional y la adquisición secuencial de la competencia meiótica y de desarrollo (Lodde *et al.*, 2007).

En ovocitos de ratón ha sido demostrado que las células de la granulosa están involucradas en la modulación de la progresiva represión de la actividad transcripcional en ovocitos que completaron el crecimiento, indicando también su potencial rol en la remodelación de la cromatina durante el crecimiento del ovocito (Carabatsos *et al.*, 2000; De La Fuente y Eppig, 2001).

5) Maduración del ovocito bovino

La maduración de ovocitos en los mamíferos es el proceso final por el cual los ovocitos adquieren habilidad para generar la activación e iniciar el posterior desarrollo embrionario. Este proceso involucra dos eventos distintivos pero relacionados entre sí, la maduración nuclear y la citoplasmática (Loutradis *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2009).

Los ovocitos inmaduros arrestados en estadio de dictiotene de la profase I se encuentran rodeados de células del cumulus. Durante etapas tempranas del desarrollo folicular, las uniones gap entre el ovocito y las células del cumulus o granulosa permiten el pasaje de nutrientes y/o sustratos energéticos favoreciendo el crecimiento del ovocito hasta completar su desarrollo (Downs *et al.*, 1986; Downs y Eppig, 1984).

Luego del pico de LH, el ovocito reanuda la meiosis, completando la ruptura de la vesícula germinal (RVG) y progresando hasta el estadio de metafase II (MII) antes de la ovulación. Si bien tradicionalmente la maduración del ovocito hacía referencia sólo a la progresión meiótica, la maduración abarca otros procesos como la reorganización del citoplasma (conocida como maduración citoplasmática) y la diferenciación de las células del cumulus. Luego de la oleada de LH las células de la granulosa modifican su patrón de transcripción y síntesis de proteínas (Richards, 1994), induciendo la diferenciación de las células del cumulus (Shimada *et al.*, 2012).

Históricamente se ha considerado que el proceso de maduración es controlado por las células somáticas que rodean el ovocito; sin embargo en los últimos años se ha descrito que el ovocito tiene un rol activo y que existe un eje de comunicación bidireccional entre ambos tipos celulares (Eppig, 2001; Gilchrist *et al.*, 2004). El AMPc y el GMPc actúan como factores inhibidores que difunden desde las células de la granulosa y del cumulus hacia el ovocito mediante las uniones gap que se mantienen entre estas células (Richard, 2007). Con el pico de LH se produce la activación de protein quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Estas enzimas fosforilan a proteínas que intervienen en las uniones gap, obstruyendo la comunicación entre el ovocito y las células del cumulus, disminuyendo de esta manera las señales inhibitorias (Sun *et al.*, 2009). Sin embargo, se sabe que la maduración meiótica es independiente del estímulo hormonal ya que cuando los ovocitos son removidos de los folículos antrales, eliminando de esta manera la comunicación con las células de la granulosa y cultivados *in vitro* en ausencia de gonadotrofinas, maduran espontáneamente hasta MII (Sorensen y Wassarman, 1976; Downs, 1993).

El factor promotor de la maduración (FPM) es un heterodímero formado por dos subunidades ciclina B1 y una subunidad catalítica p34 (Liang *et al.*, 2007; Solc *et al.*, 2010) que desempeña un papel importante en la reanudación de la meiosis, siendo clave en la RVG (Liang *et al.*, 2007). Los sustratos sobre los que actúa son: a) la histona H1, cuya fosforilación interviene en la condensación de los cromosomas, b) las láminas que forman una malla fibrilar sobre la cara interna de la membrana nuclear y cuya fosforilación provoca la despolimerización y consiguiente ruptura de la membrana al fin de la profase y c) la nucleolina (Nº 38 o B23) que al ser fosforilada por el FPM provoca el desensamblaje del nucléolo durante la división celular (Peter *et al.*, 1990; Belenguer *et al.*, 1990; Josefsberg *et al.*, 2000).

La maduración citoplasmática incluye aquellos eventos que infunden en el ovocito la capacidad para completar la maduración, la fecundación, la implantación y el normal desarrollo embrionario y fetal (Gandolfi y Gandolfi, 2001; Sirard *et al.*, 2006). En términos generales la maduración citoplasmática se refiere a la acumulación de ARNm, proteínas, sustratos y nutrientes, así como al incremento de los contenidos de Ca^{+2} y antioxidantes, que se requieren para favorecer la competencia del ovocito y los cambios ultraestructurales que se refieren a la reorganización de organelas y citoesqueleto (Gandolfi y Gandolfi, 2001; Krisher, 2004; Sirard *et al.*, 2006). Para que la maduración citoplasmática ocurra es necesaria aún la comunicación entre las células del cumulus y el ovocito (Krisher, 2004).

A su vez, factores secretados por el ovocito modificarían el metabolismo de las células del cumulus estimulando la síntesis de ácido hialurónico y la consecuente expansión o mucificación del cumulus (Gilchrist *et al.*, 2004). La mucificación del cumulus produce pérdida parcial de adhesividad entre las células y adelgazamiento de las proyecciones citoplasmáticas que conectan con la gameta. El volumen del folículo aumenta rápidamente en las horas previas a la ovulación y se produce edema en el área folicular, lo que genera a su vez una cohesión más laxa de las células de la teca.

Los eventos mencionados permiten la expulsión y salida del complejo ovocito-cumulus (COC) del ovario y su captación por el infundíbulo oviductal, en el cual permanecerá en arresto meiótico hasta que el ovocito sea fecundado (figura 2).

Cuando los ovocitos son removidos del folículo antral antes de su ovulación, éstos reanudan la meiosis de forma espontánea completando la primera división meiótica y quedando arrestados en MII. Este efecto fue descrito por primera vez en conejo (Pincus y Enzmann, 1935) y luego generalizado a otros animales domésticos (Edwards, 1965).

Esta pseudomaduración que ocurre por la remoción del ovocito del folículo antral no induce una correcta maduración citoplasmática, que es necesaria para la adquisición de la competencia de desarrollo (Sirard *et al.*, 2006). Si bien los ovocitos madurados *in vitro* o *in vivo* tienen porcentajes similares de maduración nuclear, fecundación y clivaje, existen diferencias en el potencial de desarrollo del embrión, que se expresa en los días 4 y 5 de cultivo embrionario (Sirard y Coenen, 2006). Mientras que el porcentaje de preñez a partir de ovocitos madurados *in vivo* es de 85%, este parámetro se reduce a un tercio cuando la maduración se realiza *in vitro* (Harper y Brackett, 1993).

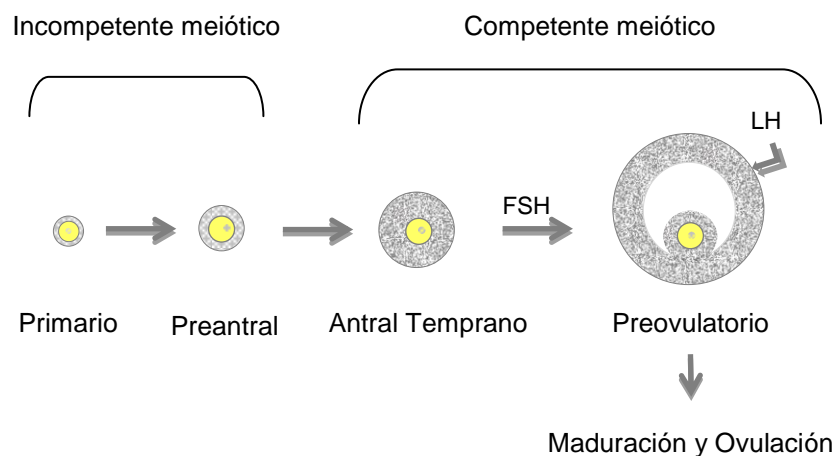


Figura 2: Desarrollo del folículo ovárico. En el estadio antral temprano el ovocito adquiere la capacidad de madurar meióticamente. La competencia de desarrollo la adquiriría durante el crecimiento posterior del folículo. Adaptado de Mehlmann, 2005.

Existen evidencias de que el ovocito durante la transición de folículo antral a folículo preovulatorio atraviesa una fase de “capacitación ovocitaria” en la cual adquiere la habilidad de llevar a cabo el desarrollo embrionario temprano (Hyttel *et al.*, 1997; Gandolfi y Gandolfi, 2001; Sirard *et al.*, 2006), etapa que se omitiría al recolectar los COCs de folículos en crecimiento.

Dos factores metodológicos influyen sobre la adquisición de la competencia ovocitaria, por un lado el criterio de selección de los ovocitos para madurar y por otro lado las condiciones de maduración. La morfología de los COCs se estableció como criterio para seleccionar los más adecuados para ser cultivados (Madison *et al.*, 1992; Blondin y

Sirard, 1995; Hazeleger *et al.*, 1995; Hosoe y Shioya, 1997). La evaluación morfológica debe llevarse a cabo bajo lupa de 40 aumentos teniendo en cuenta el aspecto del cumulus y el del ovocito. Los COCs que se seleccionan para la MIV son aquellos que poseen un cumulus denso y compacto y un citoplasma ovocitario homogéneo (de Loos *et al.*, 1989; Cetica *et al.*, 1999; Süß y Stranzinger, 1987), ya que ha sido observada una relación directa entre el desarrollo del ovocito y el número de células del cumulus que lo rodean (Hirao *et al.*, 1994) (figura 3). Ovocitos desnudos, aislados de folículos antrales y cultivados solos o sobre monocapa de células de la granulosa tienen un desarrollo deficiente (Eppig, 1979) o degeneran después de la fecundación (Osaki *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 1999).

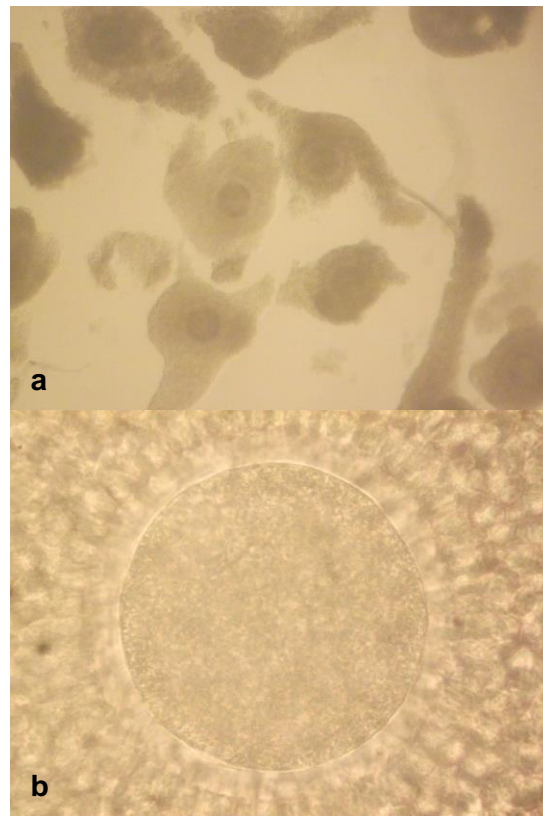


Figura 3: (a) Complejos ovocito cumulus (COCs) inmaduros, presentando un cumulus denso y compacto (20 x), (b) Ovocito inmaduro rodeado de células del cumulus que presenta un citoplasma homogéneo (40 x).

A pesar que la MIV de ovocitos bovinos lleva más de 25 años de desarrollo, el medio de cultivo utilizado en la mayoría de los laboratorios sigue siendo Tissue culture medium - 199 (TCM-199) (Sirard, 2011). Se trata de un medio de cultivo para células somáticas con 200 componentes que es suplementado con suero fetal bovino (SFB), piruvato, FSH, LH y antibióticos (Sirard *et al.*, 1988). Con este sistema, se pueden obtener porcentajes de blastocistos del 30%. Se han probado medios de cultivo definidos en ausencia de suero, pero los porcentajes de blastocistos son similares (Ali y Sirard, 2002) a los obtenidos con el sistema tradicional.

En la actualidad se está trabajando sobre la inducción de un retraso en la maduración nuclear espontánea de forma que el ovocito sea capaz de finalizar la maduración citoplasmática y mejorar de esta manera los resultados de desarrollo embrionario. Uno de los tratamientos utilizados para retrasar la maduración nuclear es la adición de forscolina, que incrementa las concentraciones de AMPc, resultando en menores tasas de MII luego de 21 hs de cultivo por un arresto de la meiosis en estadio de VG (Sirard y Bilodeau 1990; Bilodeau *et al.*, 1993). En el bovino se observó que la inhibición de la reanudación espontánea de la maduración mejoró la calidad ovocitaria y los resultados de embriones obtenidos post maduración (Thomas *et al.*, 2004).

6) Activación del ovocito bovino

La fecundación es un proceso complejo que consiste en la unión de los gametos, la restitución del número somático de cromosomas y el inicio del desarrollo de un nuevo individuo. El primer reporte exitoso de MIV y FIV de bovinos fue realizado por Iritani y Niwa en Japón (1977) y el primer nacimiento por estas técnicas combinadas fue resultado del trabajo de Hanada *et al.* (1985) usando ionóforo de calcio para la capacitación, obteniéndose tres terneros.

El proceso *in vivo* ocurre en el controlado ambiente oviductal, donde existe sincronización entre la ovulación, la capacitación espermática y los movimientos de la musculatura lisa del útero y el oviducto. También es condicionante para que el ovocito sea fecundado que haya madurado citoplasmáticamente. En estado natural, la vaca es servida por el toro durante el período de estro y los espermatozoides están presentes en el tracto reproductivo de la hembra varias horas antes de la ovulación, que ocurre 10 - 12

hs después del fin del estro, siendo la sobrevivencia de los espermatozoides eyaculados del orden de 24 - 48 hs (Hafez y Hafez, 2002).

Luego de la fusión entre el ovocito y el espermatozoide se inician una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que dan lugar a la activación del ovocito (Okitsu *et al.*, 2001) cuyos dos eventos principales son la exocitosis de los gránulos corticales y la reanudación de la meiosis. El núcleo haploide del espermatozoide se transforma en el pronúcleo masculino; el ovocito arrestado en la metafase de la segunda división meiótica completa la meiosis y el complemento haploide de cromosomas se transforma en el pronúcleo femenino; comienza una intensa síntesis de ADN en ambos pronúcleos durante varias horas y cuando están completamente desarrollados se dirigen hacia el centro del ovocito, se desintegran sus envolturas nucleares y sus cromosomas se unen antes de la primera división mitótica donde se considera que finaliza la fertilización y comienza el desarrollo embrionario.

Además de los dos efectos principales de la activación (reanudación de la meiosis y exocitosis de los gránulos corticales), se removerían o enmascararían proteínas inhibitorias en el ooplasma dando lugar al aumento de actividad de las vías oxidativas, el metabolismo lipídico, la respiración celular y la síntesis proteica y de ácidos nucleicos (Epel, 1990; Wassarman y Albertini, 1994b; Chian *et al.*, 1999; Ruddock *et al.*, 2000). La síntesis de proteínas y ácidos nucleicos consume ATP, con el consecuente aumento de ADP que estimula la respiración celular.

Los ovocitos madurados *in vitro* también pueden activarse partenogenéticamente mediante estímulos físicos y químicos como corrientes eléctricas (Tarkowski *et al.*, 1970), hialuronidasa (Graham, 1970; Kaufman, 1973), ionóforos de calcio (Steinhardt *et al.*, 1974; Ware *et al.*, 1989; Chian y Sirard, 1995), etanol (Cuthbertson, 1983; Nagai, 1987; Stice *et al.*, 1994), inhibidores de la síntesis proteica (Eusebi y Siracusa, 1983; Clarke y Masui, 1983; Presicce y Yang, 1994) e inhibidores de la fosforilación de proteínas (Meijer y Pondaven, 1988; Neant y Guerrier, 1988; Szöllösi *et al.*, 1994; Moses y Masui, 1994; Susko-Parrish *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1998; Van de Velde *et al.*, 1999).

La producción de embriones *in vitro*, independientemente del tipo de activación utilizado, aún no es satisfactoria, obteniéndose resultados que varían entre el 30 y el 50% de blastocistos a los 7 – 8 días de desarrollo mediante FIV (Lim *et al.*, 2007, Shirazi *et al.*, 2009). A su vez, la activación química presentó tasas significativamente más bajas comparada con la FIV (Ruggeri *et al.*, 2012), demostrando que el proceso de activación

de ovocitos es un factor esencial para la eficiente producción de embriones por transferencia nuclear de células somáticas (Wells *et al.*, 1999).

7) *Especies reactivas del oxígeno y estado redox*

Especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés reactive oxygen species) es el término que se utiliza para denominar a radicales libres como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) o el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y a las especies activadas del oxígeno que no son radicales libres, pero sí potentes oxidantes, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El término también incluye especies moleculares derivadas de la reacción entre radicales centrados en carbono y oxígeno molecular (O_2), como los radicales peroxilos (ROO^{\cdot}), radicales alcoxilos (RO^{\cdot}) e hidroperóxidos orgánicos ($ROOH$) y potentes oxidantes como el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), considerado a su vez especie reactiva del nitrógeno por derivar del óxido nítrico (ON) y el ácido hipocloroso ($HOCl$) (tabla 1).

Especies reactivas del oxígeno (ROS)		Especies reactivas del nitrógeno (RNS)	
Radicales libres	No radicales	Radicales libres	No radicales
Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	Óxido nítrico (ON^{\cdot})	Ácido nitroso (HNO_2)
Hidroxilo (OH^{\cdot})	Ácido hipocloroso ($HOCl$)	Dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot})	Trióxido dinitrógeno (N_2O_3)
Peroxilo (LO_2^{\cdot})	Oxígeno singlete		Tetróxido dinitrógeno (N_2O_4)
Alcoxilo (LO^{\cdot})	Peróxidos lipídicos		Peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$)
Hidroperoxilo (HO_2^{\cdot})	Ozono (O_3)		Alquil peroxinitritos ($LOONO$)

Tabla 1: Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (Adaptado de Darley - Usmar *et al.*, 1995).

Las ROS son moléculas muy reactivas, capaces de oxidar lípidos de membranas celulares, proteínas e hidratos de carbono, dañar ácidos nucleicos y despolimerizar el ácido hialurónico, teniendo así una importante participación en diversos procesos patológicos como la inflamación, la injuria por isquemia-reperfusión, el envejecimiento celular y la carcinogénesis (Halliwell y Guutteridge, 1990; Cheesman, 1993; Li *et al.*, 1997).

Los radicales libres son especies químicas (átomos o moléculas) de existencia independiente, que poseen uno o más electrones no apareados en su capa externa (Pryor y Squadritto 1976). El electrón desapareado en el orbital externo confiere a la especie carácter paramagnético y reactividad química relativamente alta debido a la tendencia de la especie a adquirir un segundo electrón. Sin embargo, la reactividad de los radicales libres no está sólo determinada por el número impar de electrones externos, sino también por otras características moleculares como la capacidad para deslocalizar electrones, propia de los anillos aromáticos (Boveris, 1998).

La cadena respiratoria mitocondrial se considera como la fuente celular más importante en la producción de la energía celular y de ROS, susceptible de acciones regulatorias y tóxicas y productora de moléculas de señales que dirigen el ciclo celular y los procesos de proliferación y apoptosis (Cadenas, 2004). Está compuesta por una serie de transportadores de electrones (flavoproteínas, S-Fe proteínas, ubiquinona y citocromos) con potenciales de óxido-reducción (redox) estándar entre $-0,320$ y $+0,380$ (Wilson *et al.*, 1974). Los transportadores se encuentran ordenados espacialmente de acuerdo a sus potenciales redox y organizados en cuatro complejos. Los electrones provenientes de los equivalentes de reducción metabólicos (NADH o $FADH_2$) ingresan a la cadena de transporte de electrones a través del complejo I o el complejo II respectivamente y son cedidos al oxígeno molecular (O_2 , $E0' = +0,815$ V) para formar H_2O en el complejo IV. En mitocondrias aisladas, han sido detectados dos sitios capaces de formar $O_2^{\cdot-}$ en la cadena respiratoria, principalmente el sitio de ubiquinona en el complejo III y los grupos flavina mononucleótido del complejo I (Turrens y Boveris 1980; Cadenas *et al.*, 1997).

El H_2O_2 mitocondrial se origina como producto de la transferencia de electrones al oxígeno para formar $O_2^{\cdot-}$, principalmente a nivel de ubisemiquinona (Lisdero *et al.*, 2004; Boveris y Cadenas, 2000) (figura 4). La generación de H_2O_2 está modulada por el estado metabólico mitocondrial y por el estado estacionario de la concentración de óxido nítrico intra mitocondrial (Boveris y Cadenas, 2000). En estado de reposo mitocondrial la producción de H_2O_2 es 4 o 5 veces mayor que en estado activo (Boveris y Cadenas,

1982). Bajas concentraciones de ON inhiben la citocromo oxidasa (cit C) en mitocondrias de músculo y cerebro (Cleeter *et al.*, 1994; Brown y Cooper, 1994).

Los ambientes *in vitro* presentan mayor concentración de O_2 que aquellos *in vivo* y por lo tanto en ellos se produce un aumento en los niveles de ROS (Luvoni *et al.*, 1996). Cuando el sistema celular antioxidante es rebasado por un aumento en la producción de ROS se produce una alteración del estado redox conocido como estrés oxidativo. La modificación oxidativa de compuestos celulares por acción de ROS es uno de los procesos más deletéreos que afectan el funcionamiento de la célula (Halliwell y Gutteridge, 1988).

La interacción de ROS con los mecanismos celulares reguladores, cuando se producen a concentraciones que no generan efectos citotóxicos, indicaría que estas especies están involucradas en procesos de transducción de señales (Kato *et al.*, 1997).

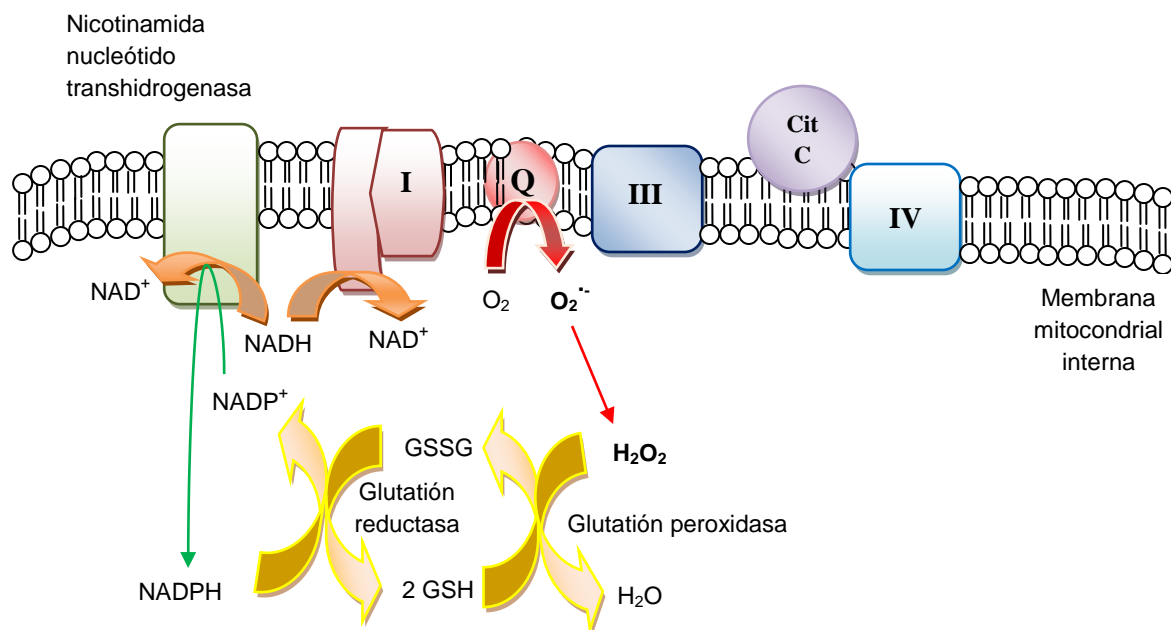


Figura 4: Producción mitocondrial de superóxido y su eliminación. El $O_2^{\cdot-}$ se forma en reacciones secundarias en los Complejos I y III, a medida que el radical ubiquinona parcialmente reducido (Q^{\cdot}) cede un electrón al O_2 . El glutatión reducido (GSH) cede electrones para la producción del H_2O_2 y de residuos de cisteína oxidados (-S-S-) en proteínas y el GSH se regenera a partir de la forma oxidada ($GSSG$) por reducción con $NADPH$. Adaptado de Nelson y Cox, 2008.

Luego de generarse $O_2^{\cdot -}$ se produce una cascada de formación de ROS, algunas de las cuales funcionan como moléculas clave en sistemas de transducción de señales, para lo cual son ideales ya que son de bajo peso molecular, difunden distancias cortas y presentan diversos mecanismos de producción y remoción dentro de la célula (Hancock *et al.*, 2001). Tanto las ROS como las RNS son útiles normalmente como moléculas señalizadoras, pero son tóxicas en exceso; algunos de los mecanismos de defensa endógenos frente a las RNS pueden generar moléculas potencialmente citoprotectoras como nitrosotioles (Darley-Usmar *et al.*, 1995). En células vegetales, se ha observado que el H_2O_2 y el ON funcionan en forma concertada con otras moléculas señalizadoras que podrían ser constitutivas o aumentar su concentración o actividad durante una situación de estrés (Neill *et al.*, 2002).

El estado redox describe la suma de las interacciones entre las formas oxidadas y reducidas de una variedad de moléculas, incluyendo NAD(P):NAD(P)H; FAD:FADH₂; GSH:GSSG (Harvey *et al.*, 2002; Herrick *et al.*, 2006). En diversos tipos de células, el estado redox intracelular participa en la regulación de enzimas probablemente involucradas en mecanismos de transducción de señales (Baker y Aitken, 2004; Hancock *et al.*, 2001). A concentraciones fisiológicas, el $O_2^{\cdot -}$, el H_2O_2 y el ON son consideradas las especies reactivas más importantes que participan de reacciones redox en diversos procesos biológicos (Hancock *et al.*, 2001). El ON y $O_2^{\cdot -}$ generan ONOO⁻ en la matriz mitocondrial, mediante una reacción muy rápida de difusión controlada (Beckman, 1990; Kissner *et al.*, 1997).

Se ha determinado que las reacciones redox son importantes en la regulación de la fosforilación en tirosina de proteínas dado que los agentes de remoción de ROS (scavengers), como la superóxido dismutasa (SOD) o la catalasa, evitan esta modificación postraduccional, mientras que el agregado exógeno de H_2O_2 o la combinación de xantina y xantina oxidasa (XOD) la promueven (Aitken *et al.*, 1995; Leclerc *et al.*, 1997).

8) Especies reactivas del oxígeno y estado redox en sistemas reproductivos

El papel de las ROS en los procesos relacionados con la manipulación y el cultivo de gametas y embriones *in vitro* es contradictorio. En el ratón se propuso que las ROS serían responsables del arresto meiótico del ovocito (Downs y Mastropolo, 1994). En el bovino, se observó que la maduración de ovocitos en medios ricos en glucosa con altas

tensiones de oxígeno aumenta la producción de ROS afectando su competencia de desarrollo (Hashimoto *et al.*, 2000). Sin embargo, la suplementación del medio de maduración con antioxidantes (ácido ascórbico, β -mercaptoetanol, SOD) no aumentó la competencia de maduración ni de desarrollo embrionario del ovocito (Blondin *et al.*, 1997). Por el contrario, el mantenimiento de un ambiente antioxidante durante la maduración redujo la capacidad de maduración nuclear y/o citoplasmática del ovocito en la rata y el bovino (Takami *et al.*, 1999; Dalvit *et al.*, 2005) (figura 5). Del mismo modo, la adición de antioxidantes al medio de FIV afectó negativamente el proceso de fecundación en el bovino (Blondin *et al.*, 1997; Dalvit *et al.*, 1998).

Se ha propuesto que ciertos niveles de ROS serían necesarios para desarrollar una mejor capacidad de maduración del ovocito. Un adecuado nivel de $O_2^{\cdot-}$ sería beneficioso durante la MIV de ovocitos bovinos para aumentar su competencia de desarrollo (Blondin *et al.*, 1997). El ON a bajas concentraciones aumentó la tasa de maduración meiótica de ovocitos de ratón (Bu *et al.*, 2004). También se ha propuesto que niveles fisiológicos de $O_2^{\cdot-}$ y de H_2O_2 serían necesarios para optimizar la interacción espermatozoide-ovocito (Luvoni *et al.*, 1996; Blondin *et al.*, 1997).

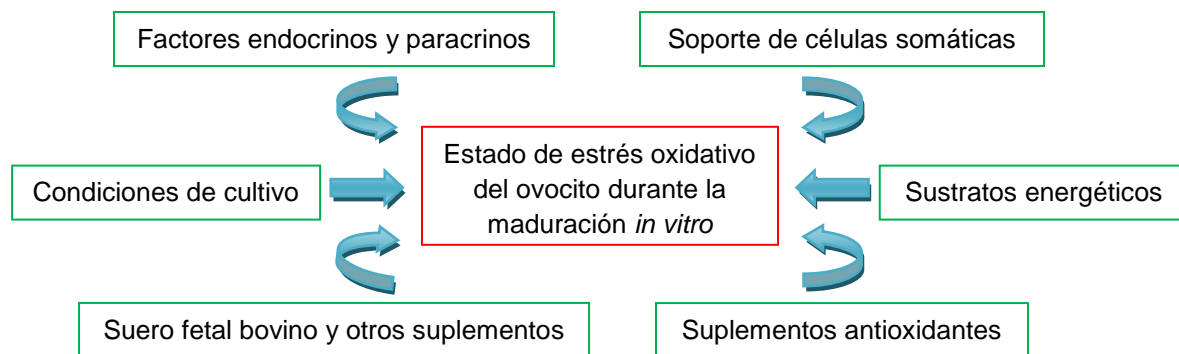


Figura 5: Factores que influyen en el estado de estrés oxidativo del ovocito durante la maduración *in vitro* (Combelles, 2009).

Se requiere integridad mitocondrial para lograr la competencia de desarrollo del ovocito de mamíferos. La fosforilación oxidativa es la principal fuente de síntesis de ATP en el ovocito maduro no fecundado. En ovocitos de ratón, se determinó un íntimo acoplamiento entre la producción de ATP mitocondrial y la demanda celular. La

generación de ATP mitocondrial es esencial para mantener señales de Ca^{++} necesarias para la maduración e iniciar el desarrollo del embrión (Dumollard *et al.*, 2004).

El ON tiene un papel clave en la maduración de ovocitos y en la embriogénesis (Sengoku *et al.*, 2001); el sistema óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)-óxido nítrico (GMPc) (Nakamura *et al.*, 2002) y el ON derivado de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Jablonka-Shariff y Olson, 2000) estarían participando en la maduración meiótica del ovocito.

En ovocitos de ratón, se utilizaron agentes farmacológicos para perturbar la fosforilación oxidativa mitocondrial, determinando que hay una utilización de O_2 dependiente de la fosforilación oxidativa y otra independiente, insensible a efectores de cadena respiratoria (Trimarchi *et al.*, 2000).

En el bovino se observó un aumento gradual en los niveles de ROS desde el estadio de dos células al de mórula tardía, que podría depender de los cambios en el metabolismo del embrión durante su desarrollo (Dalvit *et al.*, 2005). A su vez, se ha demostrado que el consumo de O_2 disminuye en el blastocisto expandido debido a que en este estadio, la glucólisis comienza a contribuir a la producción de ATP (Thompson *et al.*, 1996, 2000). Ese cambio en el consumo de O_2 coincide con el inicio de la diferenciación celular en el embrión, que podría también generar la adquisición de autonomía del genoma embrionario para inducir la síntesis de enzimas que forman parte del sistema antioxidante celular (Dalvit *et al.*, 2005).

Un estudio reportó que altas concentraciones de ROS en el líquido folicular están correlacionadas con pobre calidad ovocitaria y una consecuente disminución de la formación de embriones (Das *et al.*, 2006). Otro estudio sostuvo que un umbral de estrés oxidativo en el líquido folicular estaría relacionado con el número de ovocitos que degeneran y con la tasa de clivaje embrionario (Pasqualotto *et al.*, 2004). Sin embargo, también se documentó una correlación positiva entre una elevada concentración de ROS y las tasas de preñez (Attaran *et al.*, 2000). A su vez, la peroxidación lipídica se correlacionó con las tasas, pero no con la maduración y fecundación de ovocitos y la calidad embrionaria (Wiener-Megnazi *et al.*, 2004).

Hipótesis general

Si bien la maduración *in vitro* de los COCs bovinos podría predisponer a una mayor producción de ROS y propiciar su propagación debido a la peroxidación lipídica, es importante discriminar la influencia que tienen las diferentes ROS y determinar su participación como señales intracelulares en este proceso.

Hemos determinado que en el bovino los niveles de ROS aumentan abruptamente desde el estadio de ovocito maduro hasta el estadio de embrión clivado de 2 células. Sin embargo, la suplementación del medio de fecundación con antioxidantes demostró ejercer un efecto adverso en la tasa de clivaje embrionario, sugiriendo que ciertos niveles de ROS desempeñan una importante función en el proceso. Este aumento de ROS podría deberse al cambio metabólico sufrido por el ovocito al activarse por la fecundación o partenogénicamente. Por lo tanto, la determinación de la producción de ROS y la variación del estado redox durante la FIV contribuirá a dilucidar la implicancia de estos compuestos en el proceso.

Hipótesis particulares

El GSH forma parte del sistema antioxidante no enzimático, actuando en la eliminación de peróxidos y en el control de la concentración intracelular. La limitación del nivel de peróxidos podría conducir a incrementar la competencia del ovocito, evitando el daño peroxidativo *in vitro* y permitiendo su participación en señales intracelulares.

El nivel de estrés oxidativo detectado en la maduración de ovocitos, estaría indicando que el H_2O_2 y/o el ON podrían desencadenar señales intracelulares en la regulación del proceso. La iNOS y/o eNOS, actuarían como moduladores en la MIV.

La maduración de ovocitos requiere energía oxidativa proveniente de la cadena respiratoria mitocondrial. El estado metabólico mitocondrial, dependiente de la carga energética, estaría regulando la generación de ROS. La producción de energía oxidativa y ROS generadas por la cadena respiratoria mitocondrial podrían estar regulando mecanismos involucrados en la maduración de ovocitos.

Objetivo general

Determinar la posible fluctuación en la producción de ROS durante la maduración y activación *in vitro* de ovocitos bovinos en presencia de diferentes moduladores de la generación de ROS y su relación con los principales eventos de ambos procesos.

Objetivos particulares

En la maduración de ovocitos bovinos:

- Modular la producción de GSH y determinar su efecto sobre la generación de ROS (Capítulo 3).
- Evaluar la participación del ON en presencia de donantes o de inhibidores de su producción y su aporte en la generación de ROS (Capítulo 4).
- Evaluar la participación de la NADPH oxidasa citosólica y su aporte en la producción de ROS (Capítulo 5).
- Determinar la influencia de sistemas de generación (xantina + XOD) y remoción (catalasa) de H_2O_2 en los niveles de producción de ROS (Capítulo 6).
- Determinar la influencia de sistemas de generación (xantina + XOD + catalasa) y remoción (SOD + catalasa) de $O_2^{\cdot-}$ en los niveles de producción de ROS (Capítulo 6).
- Determinar la participación de la cadena respiratoria mitocondrial en la generación de ROS mediante el uso de efectores (Capítulo 7).

En la activación de ovocitos bovinos maduros:

- Analizar la variación de los niveles de ROS debida a la activación por espermatozoides o por partenogénesis (ionomicina + 6-dimetilaminopurina + citochalacina B) durante 24 hs de cultivo (Capítulo 2).
- Analizar la variación del estado redox debida a la activación por espermatozoides o por partenogénesis durante 24 hs de cultivo (Capítulo 2).

Todos los químicos y reactivos utilizados fueron suministrados por Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA), excepto aquellos con aclaración particular.

Recolección de los complejos ovocito-cumulus inmaduros bovinos

Los ovarios provenientes de hembras faenadas fueron transportados en termos hasta el laboratorio (figura 6). Los COCs inmaduros se obtuvieron por aspiración de folículos ováricos antrales (2 a 5 mm) (figura 7) y fueron seleccionados bajo lupa estereoscópica. Se utilizaron únicamente ovocitos completamente rodeados por un cumulus íntegro y denso (clase A, Cetica *et al.*, 1999).



Figura 6: Ovario bovino proveniente de una vaquillona de faena que presenta folículos antrales con un diámetro adecuado para ser punzados y un cuerpo lúteo.



Figura 7: Punción de folículos antrales de ovarios bovinos provenientes de faena.

Maduración de ovocitos bovinos in vitro

La maduración se realizó en medio 199 con 50 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de gentamicina, 5% de suero fetal bovino (SFB), 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de FSH y 2 $\mu\text{g/ml}$ de LH bajo aceite mineral a 39°C, 5 % CO_2 en aire y 100 % de humedad durante 22 hs.

Durante la maduración se realizaron tratamientos adicionando diferentes scavengers y sistemas estimuladores de la producción de ROS (capítulos 3 a 7).

Evaluación de la maduración

Los ovocitos madurados *in vitro* fueron denudados por suaves pasajes por pipetas finas y/o agitación con vortex por 1 minuto en solución fisiológica con 100 mg% de hialuronidasa. Luego fueron separados de las células del cumulus, recolectándolos con pipeta Pasteur.

La maduración meiótica fue evaluada por la presencia del estadio de metafase II: los ovocitos denudados fueron incubados en una solución hipotónica de citrato de sodio al 1% durante 15 minutos a 37°C. Luego fueron fijados sobre un portaobjetos con fijador de Carnoy, teñidos con Giemsa 5% por 15 minutos y observados bajo microscopio óptico a 400x y 1000x (Tarkowski, 1966). El porcentaje de maduración meiótica se determinó evaluando la presencia de la placa cromosómica en metafase II (figura 8).

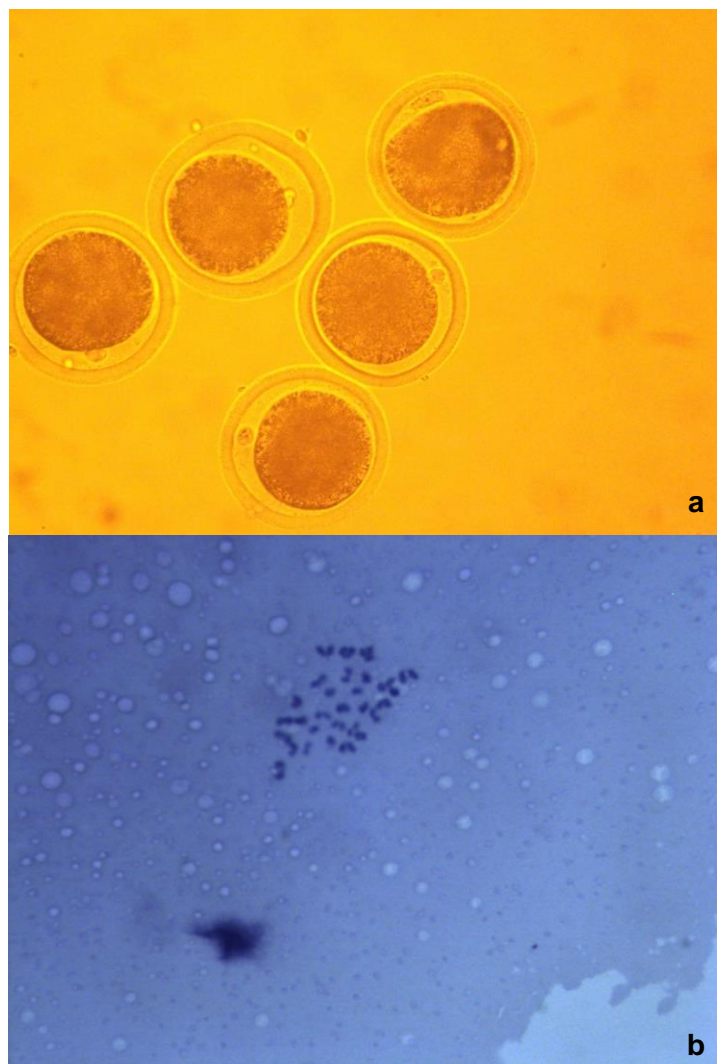


Figura 8: (a) Ovocitos bovinos madurados *in vitro*, presentando primer corpúsculo polar (20x), (b) Metafase II de ovocito bovino madurado *in vitro*, observado mediante tinción con Giemsa luego de la fijación por la técnica de Tarkowski (1000x).

Determinación de la producción de ROS

Los COCs fueron incubados con hialuronidasa 0,1% (m/v) en PBS durante 5 minutos a 37°C y luego los ovocitos fueron desnudados con pipeta Pasteur fina. Los ovocitos fueron incubados durante 30 minutos en PBS adicionado con BSA 3mg/ml en presencia de 5 μ M de 2',7'-diclorodihidrodiacetato de fluoresceína (DCHFDA). Para evaluar la actividad de esterasas, un grupo de ovocitos fue incubado por 15 minutos en PBS adicionado con BSA 3mg/ml en presencia de 0,12 μ M de diacetato de fluoresceína (FDA). Luego de exponer ambos grupos de ovocitos al respectivo fluorocromo, fueron lavados en PBS adicionado con BSA 3mg/ml, montados en portaobjetos y su fluorescencia fue cuantificada a partir de microfotografía digital en un microscopio Jenamed II de epifluorescencia con un filtro de excitación de 450-490 nm y un filtro de emisión de 520 nm. Las imágenes digitalizadas fueron analizadas utilizando el software IMAGE J valorando la luminosidad individual de cada ovocito.

La técnica utilizada se fundamenta en que la membrana plasmática es permeable al DCHFDA, forma esterificada no polar y no fluorescente del compuesto. Las esterasas intracelulares lo hidrolizan a la forma no polar 2',7'-diclorodihidro fluoresceína (DCHF) que es retenida dentro de la célula y en presencia de ROS es oxidada a la forma fluorescente 2',7'-dicloro fluoresceína (DCF). Como esta técnica depende de la actividad de esterasas intracelulares, su actividad es determinada por la técnica de FDA. El fluorocromo penetra libremente la membrana plasmática y es desacetilado por las esterasas transformándose en fluoresceína (F).

Al ser los niveles de fluorescencia de DCHFDA, que reacciona con peróxidos, dependientes de la actividad de esterasas intracelulares, el cociente entre la luminosidad obtenida por DCHFDA para cada ovocito y el promedio de luminosidad por FDA de cada tiempo fue considerado como medida relativa del nivel de ROS producido por cada ovocito (Le Bel *et al.*, 1992; Lane *et al.*, 2002).

Análisis estadístico

Los datos de producción de ROS fueron expresados como Unidades Arbitrarias/ovocito/minuto utilizando media \pm error estándar (SEM) y las comparaciones estadísticas realizadas por ANOVA. Los porcentajes de maduración meiótica fueron comparados por la prueba de Chi-cuadrado para datos no paramétricos. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Capítulo 1

Producción de ROS durante la MIV de ovocitos bovinos

INTRODUCCIÓN

A la fecha hay reportes que presentan resultados controversiales respecto del potencial rol de las ROS en promover o inhibir la RVG y el posterior progreso meiótico de los ovocitos de mamíferos.

En el ratón se ha observado que antioxidantes e inhibidores de la lipoxigenasa con efectos antioxidantes bloquean la RVG en COCs y ovocitos desnudos (Takami *et al.*, 1999). En contraste, se determinó que elevados niveles de estrés oxidativo inhiben la maduración, mientras que el uso de melatonina como scavenger revierte ese efecto y protege a los ovocitos del arresto meiótico inducido por el estrés (Tamura *et al.*, 2008). Durante la MIV porcina, el estrés oxidativo inducido por el sistema hipoxantina-XOD reduce la tasa de MII, mientras que la inhibición de la SOD resulta en una reducción aún mayor del progreso meiótico (Tatemoto *et al.*, 2004).

Diversos estudios proponen que las concentraciones de ROS en el líquido folicular pueden ser el resultado de rangos fisiológicos de agentes pro-oxidantes que serían necesarios para el normal desarrollo del ovocito (Combelles, 2009). Es decir que niveles fisiológicos de ROS serían indicativos de ovocitos saludables, mientras que concentraciones excesivas denotarían un estado de estrés oxidativo, que podría comprometer los resultados de la FIV (Attaran *et al.*, 2000; Agarwal *et al.*, 2003; Pasqualotto *et al.*, 2004; Wiener-Megnazi *et al.*, 2004).

El líquido folicular contiene también antioxidantes y se considera a la capacidad antioxidante total (TAC) como un marcador predictivo de una exitosa FIV (Pasqualotto *et al.*, 2004). El efecto benéfico del líquido folicular frente al daño oxidativo se debería en parte a una elevada actividad de isoenzimas de SOD, que actúan como importantes scavengers de radicales libres. En porcinos se ha propuesto una relación entre una actividad incrementada de SOD en el líquido folicular y un aumento en la tasa de maduración citoplasmática del ovocito (Tatemoto *et al.*, 2004). En humanos, una alta actividad de SOD se asoció a ovocitos que no pudieron ser fecundados (Sabatini *et al.*, 1999), pero concentraciones fisiológicas de otra enzima antioxidante, glutatión peroxidasa dependiente de selenio, presentaron una correlación positiva con las tasas de FIV (Paszowski *et al.*, 1995).

La presencia en el líquido folicular de agentes pro y antioxidantes es relevante para la MIV. Por lo tanto, una aproximación a mejorar las tasas de maduración podría ser aportar en el medio de cultivo una composición similar de antioxidantes a la que se

encuentra *in vivo* (Sabatini *et al.*, 1999; Kodaman y Behrman, 2001). Sin embargo, reproducir en los medios de MIV la exacta proporción fisiológica de agentes anti y prooxidantes encontrada en el líquido folicular podría no ser suficiente para contrarrestar el mayor estrés oxidativo que puede presentarse *in vitro*. Los radicales libres generados durante el metabolismo celular *in vivo* pueden ser controlados por las defensas antioxidantes del folículo, especialmente por las actividades metabólica y secretoria de las células de la granulosa, así como por el microambiente que rodea al folículo, proporcionado por la circulación (Combelles, 2009).

Diversos estudios han demostrado la expresión de antioxidantes a lo largo del cultivo *in vitro* de ovocitos y COCs. Para que el embrión adquiriera la competencia de desarrollo, sería importante también que los antioxidantes sean almacenados en el ovocito (como ARNm o proteínas) durante el crecimiento y la maduración (Combelles, 2009). En células somáticas existen precedentes de regulación de la síntesis de antioxidantes en etapas pre y post traduccionales (Forsberg *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2004; Rhee *et al.*, 2005). Esto podría ser relevante para los ovocitos durante la maduración, en la cual prevalecen la regulación durante la traducción y en las etapas postraduccionales (Oh *et al.*, 2000; Eichenlaub-Ritter y Peschke, 2002; De la Fuente, 2006).

Se encontró ARNm que codifica para glutatión peroxidasa, SOD dependiente de Cu/Zn (Cu/Zn-SOD), SOD dependiente de Mn (Mn-SOD) y γ -glutamylcisteína sintetasa (enzima importante para la síntesis de GSH) tanto en ovocitos inmaduros como maduros de ratón (El Mouatassim *et al.*, 1999). A su vez, en humanos se documentó la regulación de los transcritos de glutatión peroxidasa y Mn-SOD mediante poliadenilación (El Mouatassim *et al.*, 1999). En bovinos, se ha reportado que existen ARNm de Cu/Zn-SOD y Mn-SOD en ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* (Lequarre *et al.*, 2001). Con respecto a catalasa, se ha encontrado ARNm en ovocitos fecundados de ratón y bovino (Harvey *et al.*, 1995), pero no en ovocitos humanos ni en VG ni en MII (El Mouatassim *et al.*, 1999). A su vez, se detectó actividad de catalasa en ovocitos bovinos inmaduros y madurados *in vitro* (Cetica *et al.*, 2001).

La presencia de enzimas antioxidantes en diversas especies de mamíferos sugiere que los mecanismos de defensa se conservan y serían importantes para los últimos pasos de la maduración del ovocito (Combelles, 2009). En bovinos, los ovocitos madurados *in vitro* presentan niveles significativamente mayores de ARNm de Mn-SOD, Cu/Zn-SOD y sarcosina oxidasa que los madurados *in vivo* (Lonergan *et al.*, 2003), lo cual significaría

que hay una inducción de la transcripción para proteger al ovocito frente al daño oxidativo. Estos resultados también podrían indicar una inapropiada degradación del ARNm materno previa a la activación del genoma embrionario. Es interesante también que el ARNm mitocondrial de Mn-SOD se expresa a mayores niveles en ovocitos derivados de pequeños folículos (antes y después de la MIV) en comparación con ovocitos recolectados en el momento del pico de LH y luego madurados *in vitro* (Lonergan *et al.*, 2003). Estos reportes sugieren diferencias en la expresión de antioxidantes, principalmente Mn-SOD, en ovocitos que varían en cuanto a su competencia de desarrollo.

Es relevante la demostración que la inhibición de la meiosis previa a la MIV está asociada a cambios en la poliadenilación del ARNm y la expresión de genes de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y Mn-SOD, las cuales responden a regulación por oxidación (Gomez *et al.*, 2004; Lequarre *et al.*, 2004). Durante el arresto meiótico, se ha encontrado menor cantidad de transcriptos de Mn-SOD. A su vez, la concentración de Mn-SOD disminuye luego de la MIV, pero es mayor en ovocitos previamente arrestados que en los no arrestados (Gomez *et al.*, 2004). Las concentraciones de G6PDH se incrementan luego del arresto meiótico, pero los ovocitos que no sufren el arresto expresan mayor concentración de esta enzima al final de la MIV que los ovocitos no arrestados (Gomez *et al.*, 2004).

En estudios previos hemos detectado una fluctuación en la actividad oxidativa y mitocondrial en ovocitos bovinos durante la MIV, presentando ambos parámetros variaciones similares con una alta correlación (Gutnisky *et al.*, 2012). La actividad oxidativa mostró un incremento a las 15 y 22 hs de cultivo, coincidiendo con eventos clave de la maduración como la formación de la placa metafásica de la primera división meiótica y la extrusión del primer corpúsculo polar respectivamente (Gordon *et al.*, 1994; Gutnisky *et al.*, 2012). A su vez, se ha documentado que la síntesis de proteínas aumenta 3 veces durante la metafase I comparada con la RVG (Ferreira *et al.*, 2009), sugiriendo que el incremento en la actividad oxidativa que observamos a la hora 15 estaría relacionado con la síntesis de nuevas proteínas.

Hemos observado también que las tinciones de Redox-Sensor Red (niveles oxidativos) y Mitotracker Green (actividad mitocondrial) están estrechamente co-localizadas en el citosol del ovocito en bovinos (Gutnisky *et al.*, 2012). Esta relación puede ser el resultado de un incremento de agentes reductores citosólicos como lactato y malato

en el ovocito y es congruente con el patrón característico de células metabólicamente activas (Chen y Gee, 2000).

Los reportes aparentemente contradictorios encontrados en la bibliografía y los resultados previos de nuestro grupo justifican la necesidad de profundizar la investigación para determinar si las ROS desempeñan un rol importante en el progreso meiótico y/o en la maduración citoplasmática del ovocito. Por lo tanto, este capítulo tuvo como objetivo determinar la posible fluctuación de los niveles de ROS durante la MIV de ovocitos bovinos y su relación con los principales eventos de este proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de la producción de ROS

Para determinar si existe una fluctuación en los niveles de ROS del ovocito durante la MIV se realizaron determinaciones de su producción mediante la técnica de DCHFDA en intervalos de 2 hs durante todo el proceso. El cociente entre la luminosidad obtenida por DCHFDA para cada ovocito y el promedio de luminosidad por FDA de cada tiempo fue considerado como medida relativa del nivel de ROS producido por cada ovocito (figura 8).

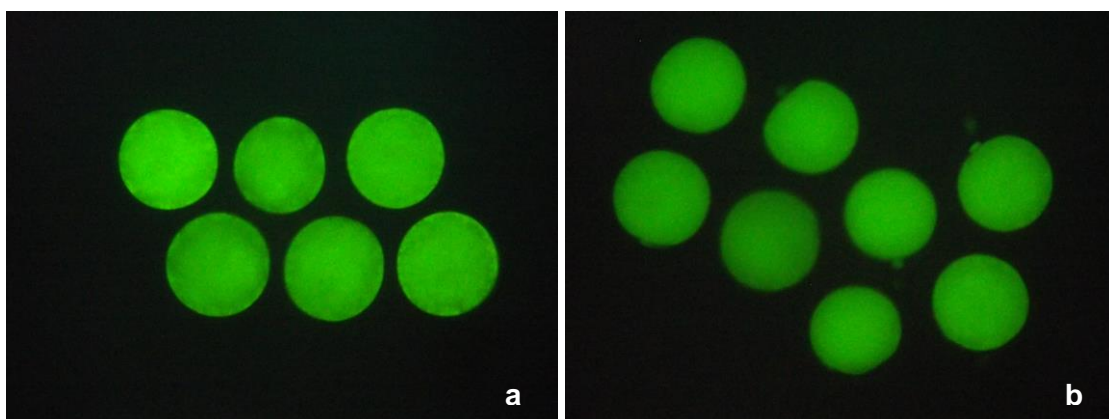


Figura 8: (a) Ovocitos bovinos desnudos teñidos con FDA, (b) Ovocitos bovinos desnudos teñidos con DCHFDA (100x).

RESULTADOS

Determinación de la producción de ROS durante la maduración in vitro

La producción de ROS, expresada como cociente entre la luminosidad registrada por las técnicas de DCHFDA y FDA (DCHFDA: FDA), demostró ser fluctuante durante el cultivo *in vitro*. Se detectó una disminución significativa en los niveles de ROS a partir de las 2 hs de la MIV comparado con la hora 0 ($p < 0,05$). Más allá de este punto, los niveles de ROS presentaron pequeñas fluctuaciones hasta las 18 hs y aumentaron hasta valores similares a los observados a la hora 0 recién al final de la maduración (figura 9).

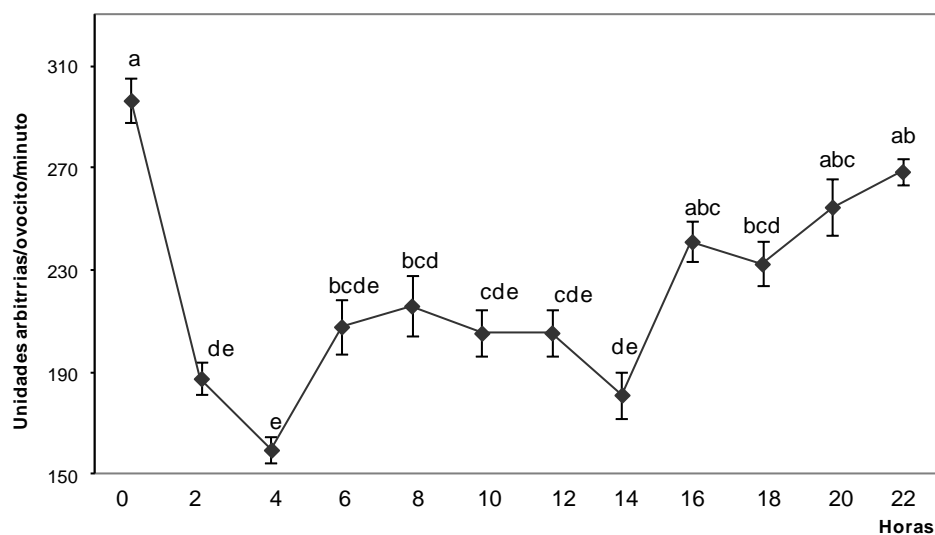


Figura 9: Producción de especies reactivas del oxígeno (ROS)/actividad de esterasas durante la maduración *in vitro*. Los valores son el cociente entre los valores de las técnicas de 2',7'-diclodihidro diacetato de fluoresceína (DCHFDA) y diacetato de fluoresceína (FDA) y están expresados como media de Unidades Arbitrarias/ovocito/minuto \pm SEM. $n = 282$ ovocitos. Valores con diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La actividad de esterasas, determinada por FDA, no presentó diferencias significativas en los diferentes tiempos evaluados durante la MIV (figura 10).

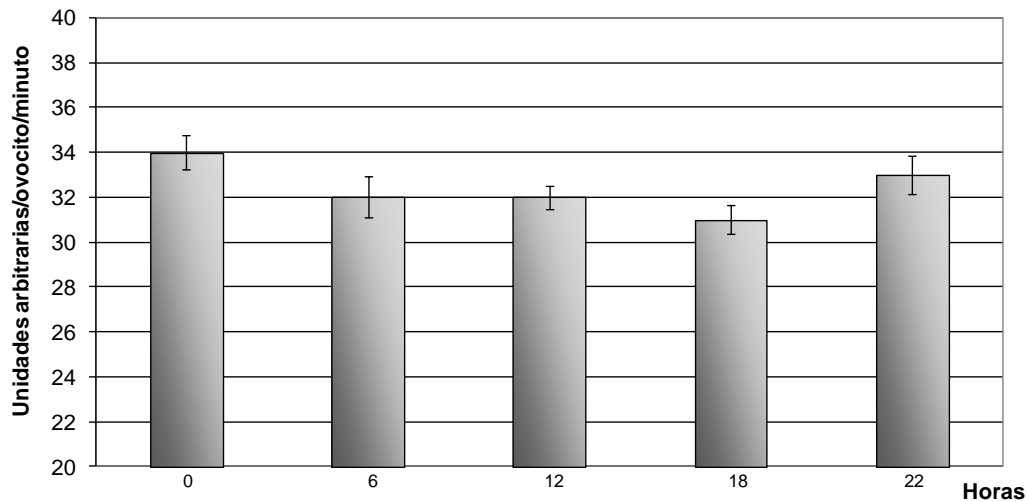


Figura 10: Actividad de esterases determinada por diacetato de fluoresceína. Los valores están expresados como media de Unidades Arbitrarias/ovocito/minuto \pm SEM. n=88 ovocitos. Los valores no difieren significativamente.

A las 18 hs de maduración el porcentaje de ovocitos que presentó protrusión del primer corpúsculo polar fue de 80% (19/24 ovocitos) y a las 22 hs el 87% alcanzó el estadio de metafase II (26/30 ovocitos).

DISCUSIÓN

Por primera vez se determinó la producción de ROS durante la MIV de una gameta de mamífero, observándose una fluctuación característica a lo largo del proceso. Estudios previos informaron que los niveles de ROS no difieren entre ovocitos bovinos inmaduros y madurados *in vitro* (Cetica et al., 2001). En el presente trabajo estos datos fueron corroborados, sin embargo se observó una significativa fluctuación de los valores de ROS durante las 22 hs que dura el proceso de MIV.

Previamente, fue demostrado que el consumo de oxígeno se incrementa a lo largo de la MIV (Sutton *et al.* 2003), siendo la fosforilación oxidativa mitocondrial la principal fuente de ATP en el ovocito no fecundado (Dumollard *et al.*, 2004). Esto coincide con

nuestros trabajos previos, en los que hemos detectado fluctuaciones altamente correlacionadas en la actividad oxidativa y mitocondrial en ovocitos bovinos durante la MIV (Gutnisky *et al.*, 2012). Por lo tanto, la significativa fluctuación observada en los niveles de ROS durante las 22 hs de cultivo podría atribuirse a variaciones en la actividad metabólica del ovocito en las diferentes fases de la maduración, con una activa participación de la cadena respiratoria.

En la maduración de ovocitos bovinos, la síntesis de proteínas es requerida en 4 etapas diferentes: (1) para la ruptura de la vesícula germinal (6 hs); (2) para proceder hacia el estado de metafase I (MI); (3) durante un corto período de tiempo durante la MI (12 hs) y para mantener la configuración de la MII (18 hs, protrusión del primer corpúsculo polar) (Sirard *et al.*, 1989). Por lo tanto, consideramos que estos son los eventos principales para la adquisición de la competencia de desarrollo del ovocito.

En el ovocito de ratón, a su vez, se observaron tres picos en los cuales aumentan los niveles de ATP citosólicos y mitocondriales separados por dos períodos de menos producción de ATP. El primer incremento ocurre durante la RVG, el segundo durante la migración del huso meiótico y el tercero en la transición entre MI y MII (Yu *et al.*, 2010). Los incrementos en los niveles de ATP observados por los autores, coinciden entonces con los eventos en los que en el bovino aumenta la síntesis proteica y con las fluctuaciones observadas en la actividad oxidativa y mitocondrial por nuestro equipo en trabajos previos.

Por lo tanto, la significativa disminución en la generación de ROS entre las 2 y las 18 hs de maduración podría corresponder a un período que demanda una alta producción de energía por parte de la cadena respiratoria para la síntesis de proteínas requerida durante las fases preparatorias para los eventos principales de la MIV. Este resultado coincide con lo observado en otros modelos celulares, en los cuales se determinó que la producción de H_2O_2 en la fase de reposo (estado 4) de la cadena respiratoria es aproximadamente 4 a 5 veces mayor que en la fase activa (estado 3), lo cual indica que el generador de H_2O_2 es un componente de la cadena respiratoria que modifica su actividad en la transición de estado 4 a estado 3 (Boveris y Cadenas, 1982).

La variación en las concentraciones de ROS observadas durante la maduración también podría disparar eventos de señalización implicados en el progreso meiótico, como fue demostrado en otros procesos celulares (Irani *et al.*, 1997; Finkel, 1998; Forman y Torres, 2002). Ha sido propuesto que las ROS intervendrían en diferentes mecanismos de transducción de señales y en vías de señalización intracelular que regularían la

relación de fosforilación/defosforilación, actividad de MAPK, fosfolipasas, factores de transcripción y estado de óxido-reducción, entre otros (Hancock *et al.*, 2001).

En conclusión, hemos determinado por primera vez que existe una significativa fluctuación en los niveles de ROS durante las 22 hs de MIV, coincidente con las variaciones en la actividad oxidativa previamente observadas y con los eventos fisiológicos clave del proceso de maduración. En base al perfil observado en los niveles de ROS durante la maduración *in vitro*, se podrían conducir futuros estudios que permitan modular los niveles de ROS producidos por el gameto femenino en durante los eventos clave del proceso para dilucidar si las fluctuaciones responden solamente a las variaciones en la actividad metabólica o si estos compuestos intervienen además en sistemas regulatorios o de señalización.

Capítulo 2

Producción de ROS y estado redox en la activación de ovocitos bovinos in vitro

INTRODUCCIÓN

En bovinos, la activación es un factor fundamental para la exitosa producción de embriones reconstruidos por transferencia nuclear de células somáticas (Wells *et al.*, 1999), partenogénesis e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Motlik *et al.*, 2002).

La 6-dimetil amino purina (6-DMAP) es un inhibidor de la síntesis proteica y de la fosforilación de serina/treonina quinasas que previene la reacumulación de FPM reduciendo la actividad de la Cdc2 quinasa (Alberio *et al.*, 2000) e induce la activación diploide de ovocitos en metafase II previniendo la separación de los cromosomas y la extrusión del segundo corpúsculo polar (Liu *et al.*, 1998). La citocalasina B permite la segregación de los cromosomas, pero no la citocinesis, resultando en cigotos diploides con dos pronúcleos (Presicce y Yang, 1994; Liu *et al.*, 1998).

En la actualidad existe evidencia que demuestra que las ROS tienen una importante participación en la regulación de todos los parámetros de función espermática analizados, incluyendo movilidad, capacitación, interacción espermatozoide-zona pellucida, reacción acrosomal y fusión espermatozoide-ovocito (Baker y Aitken, 2004; Rivlin *et al.*, 2004). En el bovino, las ROS tendrían un rol en la capacidad fecundante del espermatozoide así como en la interacción entre el espermatozoide y el ovocito (Gonçalves *et al.*, 2010).

A su vez, se sabe que diversos factores de transcripción involucrados en procesos de desarrollo están regulados por el potencial redox intracelular (Dickinson y Forman, 2002; Funato *et al.*, 2006; Imai *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2002). El descubrimiento reciente de que estos factores son sensibles a la oxidación por ROS o S-glutationilación y que requieren NAD(P)H o NAD(P)⁺ ha abierto nuevas perspectivas en la regulación del desarrollo embrionario (Dumollard *et al.*, 2007).

Se ha observado que el estado redox y los niveles de ROS están asociados negativamente en la célula. Una alta actividad oxidativa celular (por ejemplo por un incremento en la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial) está usualmente asociada con una menor producción de ROS y viceversa (Boveris y Cadenas, 1982). En el ratón, ha sido demostrada la importancia fundamental del estado redox y la regulación de la producción ROS en el desarrollo embrionario temprano (Dumollard *et al.*, 2007).

En el bovino, la generación de ROS ha sido implicada como una causa importante de un pobre desarrollo de embriones *in vitro*, participando en el bloqueo embrionario y la

muerte celular (Hashimoto *et al.*, 2000) y, a elevadas concentraciones, en el arresto meiótico (Nakamura *et al.*, 2002). A su vez, se ha determinado que en el ovocito es necesaria una determinada concentración de ácido ascórbico intracelular para una normal maduración citoplasmática y una adecuada competencia de desarrollo embrionario (Tatemoto *et al.*, 2001) y que los COCs han desarrollado estrategias antioxidantes para controlar la producción de ROS (Cetica *et al.*, 2001, Tatemoto *et al.*, 2001, Dalvit *et al.*, 2005a).

El objetivo de este capítulo fue analizar la variación de los niveles de ROS y el estado redox debida a la activación por espermatozoides o partenogenética durante 24 hs de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Activación de ovocitos maduros mediada por espermatozoides

En la FIV se utilizó semen congelado en pajuelas proveniente de toros Holstein de fertilidad comprobada. El semen fue descongelado a 37°C en fluido oviductal sintético modificado (mSOF) (Takahashi y First, 1992) adicionado con teofilina 10 mM, fue centrifugado dos veces a 500 xg por 5 minutos y luego resuspendido en medio de fertilización hasta una concentración final de 2×10^6 espermatozoides móviles/ml. La co-incubación de COCs madurados *in vitro* y espermatozoides fue llevada a cabo en medio IVF-mSOF, que consiste en mSOF suplementado con heparina 10 UI/ml y albúmina sérica bovina (BSA) 5 mg/ml, bajo aceite mineral a 39°C, 5% CO₂ en aire humidificado durante 24 hs.

Activación partenogenética de ovocitos maduros

Los ovocitos madurados *in vitro* fueron desnudados por pasaje por pipeta Pasteur en solución buffer fosfato salina (PBS) suplementada con BSA 3 mg/ml. Los ovocitos fueron considerados maduros por la presencia del primer corpúsculo polar. Sólo los ovocitos maduros fueron incubados en medio tyrodes-albúmina-lactato-piruvato (TALP) suplementado con BSA 3 mg/ml + ionomicina 5 µM por 5 minutos y luego en mSOF adicionado de 6-DMAP 2 mM + citocalasina B 7,5 µg/ml por 3 hs según lo descrito por

Gruppen *et al.*, 2002. Luego los ovocitos fueron lavados e incubados en IVF-mSOF bajo aceite mineral a 90% N₂: 5% CO₂: 5% O₂ en aire humidificado por 21 hs.

Determinación del estado redox y el estadio nuclear

Para determinar el estado redox y el estadio nuclear, los ovocitos maduros y los potenciales cigotos fueron recolectados del medio de cultivo cada 2 hs entre las 7 y las 24 hs post-activación/inseminación para ser denudados y posteriormente incubados en PBS suplementado con BSA 3 mg/ml en presencia de RedoxSensor Red CC-1 1 mM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) + Hoechst 33342 1 μM por 10 minutos a 39,5°C. Luego, fueron lavados en PBS suplementado con BSA 3 mg/ml y colocados en una pequeña gota sobre un portaobjetos para determinar la fluorescencia de cada célula por medio de microfotografía digital utilizando un microscopio de epifluorescencia Jenamed II con un objetivo 12x y filtros de 450-490 nm (excitación) y 570 nm (emisión) para RedoxSensor Red CC-1. Se determinó la intensidad de fluorescencia de cada ovocito/cigoto mediante el software Image J 1.240 (National Institutes of Health, Federal Government of the United States). El estadio nuclear fue evaluado por Hoescht 33342 a 400x usando filtros de 330-380 nm (excitación) y 420 nm (emisión) (figura 11).

Demostración de la especificidad de las técnicas de tinción:

Para demostrar la especificidad de las técnicas de RedoxSensor Red CC-1 y DCHFDA, los ovocitos madurados *in vitro* fueron denudados y luego divididos en dos grupos. Un grupo fue incubado en medio 199 adicionado con piruvato 5 mM por 2 hs, mientras que el resto permaneció en el medio control por el mismo período de tiempo. Se escogió piruvato para la experiencia debido a que este compuesto fue descrito como un efectivo antioxidante fisiológico (Upreti *et al.*, 1998).

Los ovocitos incubados en presencia de piruvato presentaron una significativa disminución en la generación de ROS respecto del control (piruvato: 606,27 ± 30,97 vs control: 989,14 ± 43,24 unidades arbitrarias/ovocito; p<0,05; n= 30 ovocitos por grupo). Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas en la actividad oxidativa entre ambos tratamientos [piruvato: (3,962 ± 0,216). 10⁶ vs control: (4,323 ± 0,117). 10⁶ unidades arbitrarias/ovocito; n= 30 ovocitos por grupo].

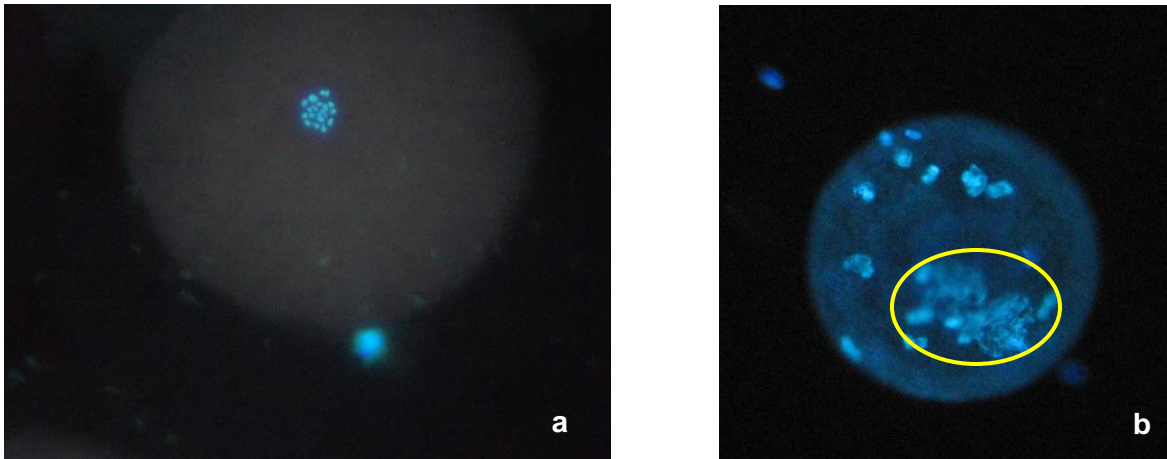


Figura 11: (a) Ovocito bovino madurado *in vitro* (puede observarse la MII dentro del ovocito y el corpúsculo polar extruido); (b) Ovocito bovino evaluado a las 13 hs post activación mediada por espermatozoides (pueden observarse los pronúcleos en la región seleccionada). Ambos ovocitos fueron observados mediante tinción con Hoechst 33342 (120x).

RESULTADOS

Activación mediada por espermatozoides:

En la activación mediada por espermatozoides, la formación de pronúcleos comenzó a las 9 hs y alcanzó el porcentaje máximo (alrededor de 80%) a las 13-15 hs, decreciendo luego lentamente hasta las 24 hs. El estadio de singamia comenzó a las 13 hs y presentó una meseta (alrededor de 40%) entre las 17 y las 24 hs. Los primeros embriones clivados se observaron a las 21 hs (figura 15a).

Activación partenogenética:

En la activación partenogenética, todos los ovocitos presentaron pronúcleos hasta las 17 hs y luego avanzaron hacia el estadio de singamia y el clivaje, alcanzando altos valores (47% de singamia y 76% de clivaje) alrededor de las 19-21 hs (figura 16a).

Determinación del estado redox en las activaciones mediada por espermatozoides y partenogenética:

En los ovocitos activados por espermatozoides, se observó una ligera disminución de la actividad oxidativa entre las 0 y las 11-13 hs y luego un incremento significativo entre las 15 y las 19 hs ($p < 0,05$), disminuyendo luego nuevamente ($p < 0,05$) (figura 12A-D y 15b). Por otra parte, en los activados partenogenéticamente, se detectó un ligero aumento en la actividad oxidativa a las 7 hs y luego una disminución a las 9 hs ($p < 0,05$), permaneciendo baja con pequeñas fluctuaciones hasta las 24 hs de desarrollo (figura 12E-H y 16b).

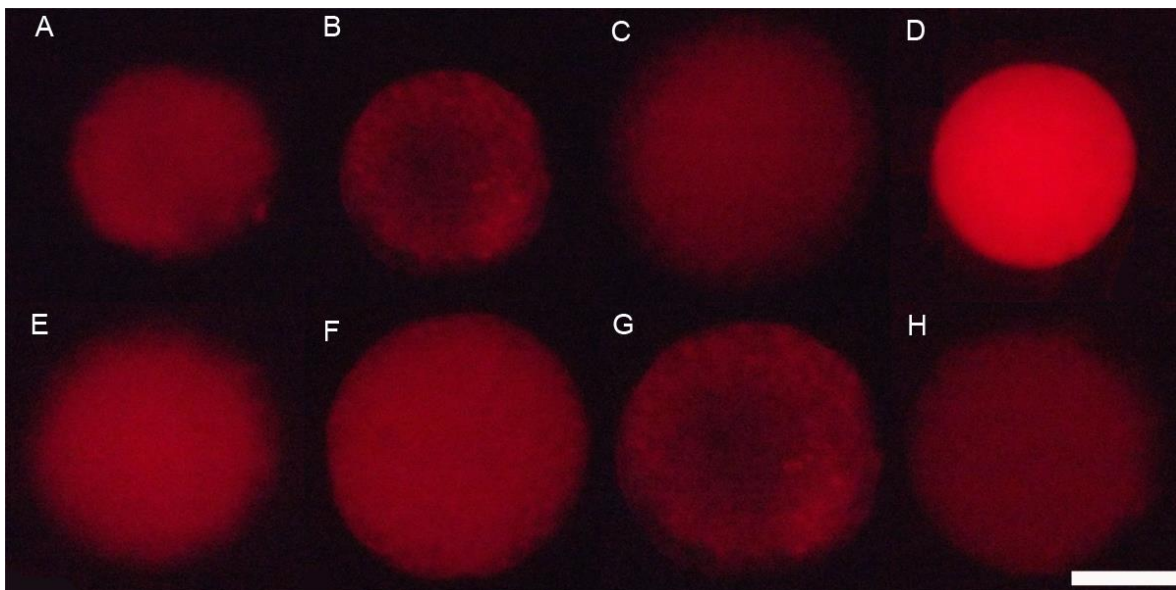


Figura 12: Ovocitos activados y cigotos putativos teñidos con RedoxSensor Red CC1 (120x) (A, B, C y D) Ovocitos activados por espermatozoides a las 0, 7, 11 y 19 hs de activación; (E, F, G y H) Ovocitos activados partenogenéticamente a las 0, 7, 11 y 19 hs. Barra: 50 μm .

Para determinar si la variación en la actividad oxidativa detectada en la activación temprana depende de la propia activación o simplemente refleja los cambios debidos al tiempo transcurrido desde la maduración, se incubaron ovocitos no activados durante 24 hs, revelando una disminución significativa entre las 11 y las 17 hs ($p < 0,05$; figura 14a). A su vez, a las 7 hs, momento clave de la activación, los ovocitos activados presentaron

valores inferiores de actividad oxidativa [activados por espermatozoides: $(2,12 \pm 0,39) 10^6$ Unidades arbitrarias/ovocito/minuto, $n= 21$ ovocitos; activados partenogenéticamente: $(2,9 \pm 0,23) 10^6$ Unidades arbitrarias/ovocito/minuto, $n= 32$ ovocitos] respecto de los no activados [$(7,20 \pm 0,15) 10^6$ Unidades arbitrarias/ovocito/minuto, $n= 45$ ovocitos] ($p < 0,05$).

Determinación de la producción de ROS en las activaciones mediada por espermatozoides y partenogenética:

En la activación mediada por espermatozoides, los niveles de ROS fluctuaron a lo largo de las 24 hs de desarrollo, presentando picos a las 7, 19 y 24 hs ($p < 0,05$) (figura 13A-D y 15c), mientras que en los activados partenogenéticamente los picos se detectaron a las 7, 11 y 17 hs ($p < 0,05$) (figura 13E-H y 16c).

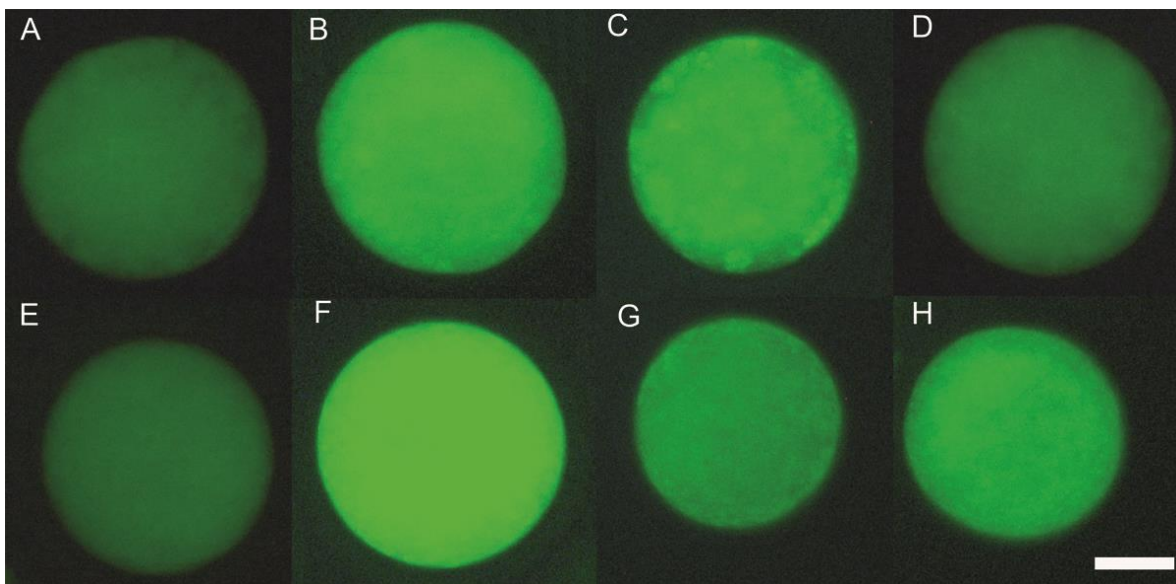


Figura 13: Ovocitos activados y cigotos putativos teñidos con DCHFDA (120x) (A, B, C y D) Ovocitos activados por espermatozoides a las 0, 7, 11 y 19 hs de activación; (E, F, G y H) Ovocitos activados partenogenéticamente a las 0, 7, 11 y 19 hs. Barra: 50 μ m.

Para determinar si el incremento temprano en los niveles de ROS depende de la activación o si se debe a un proceso de envejecimiento de los ovocitos maduros, se cultivaron ovocitos activados y no activados y se determinó la producción de ROS en ambos grupos durante 24 hs luego de la maduración, observándose una disminución

significativa después de las 0 hs ($p < 0,05$; figura 14b). A las 7 hs, momento clave de la activación en el cual se evidencian picos de producción de ROS independientemente del mecanismo de activación, sólo en los ovocitos activados se observó el incremento [activados por espermatozoides: $(2,04 \pm 0,07) \cdot 10^3$ Unidades arbitrarias/ovocito/minuto, $n = 60$ ovocitos; ovocitos activados partenogénicamente: $(1,97 \pm 0,08) \cdot 10^3$ Unidades arbitrarias/ovocito/minuto, $n = 30$ ovocitos], mientras que en los no activados se detectaron niveles decrecientes a lo largo del mismo período [$(1,42 \pm 0,55) \cdot 10^3$ Unidades arbitrarias/ovocito/minuto, $n = 65$, $p < 0,05$].

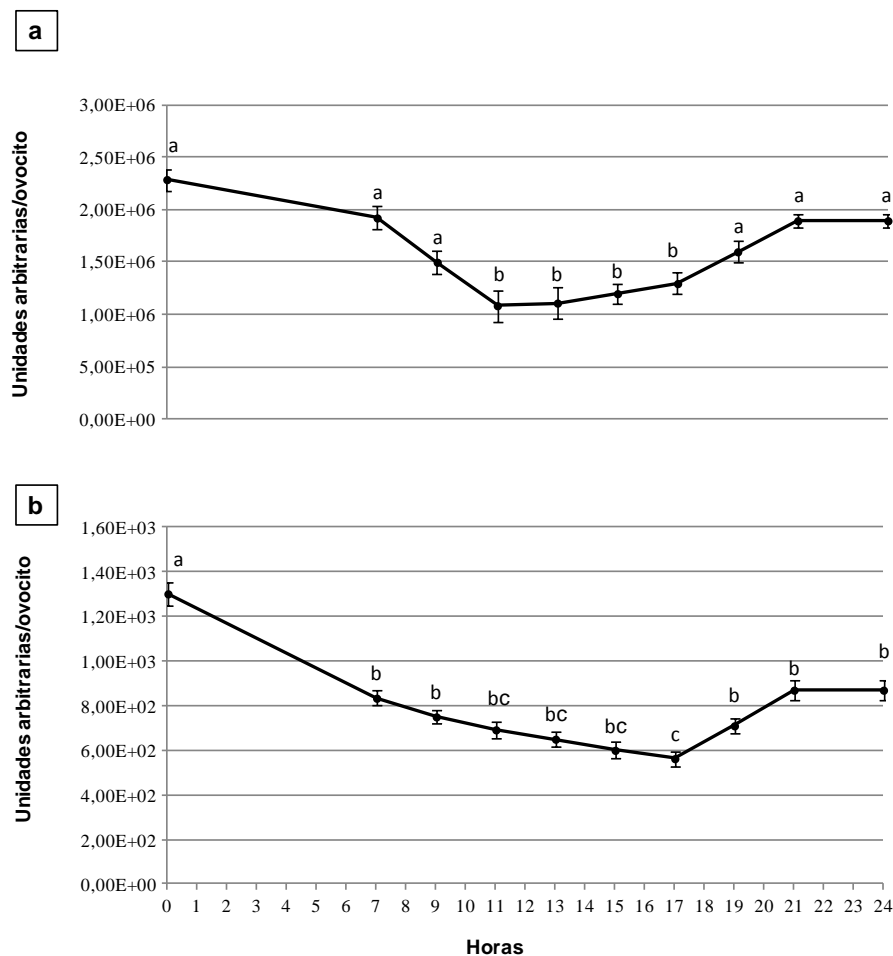


Figura 14: (a) Estado redox en ovocitos no activados. Los valores están expresados como media de Unidades Arbitrarias/ovocito/minuto \pm SEM. $n = 180$ ovocitos. ^{a,b} Valores con diferentes superíndices representan diferencias significativas ($p < 0,05$). (b) Producción de especies reactivas del oxígeno/ actividad de esterasas en ovocitos no activados. Los valores están expresados como media de Unidades arbitrarias/ovocito/minuto \pm SEM. $n = 200$ ovocitos. ^{a,b,c} Valores con diferentes superíndices representan diferencias significativas.

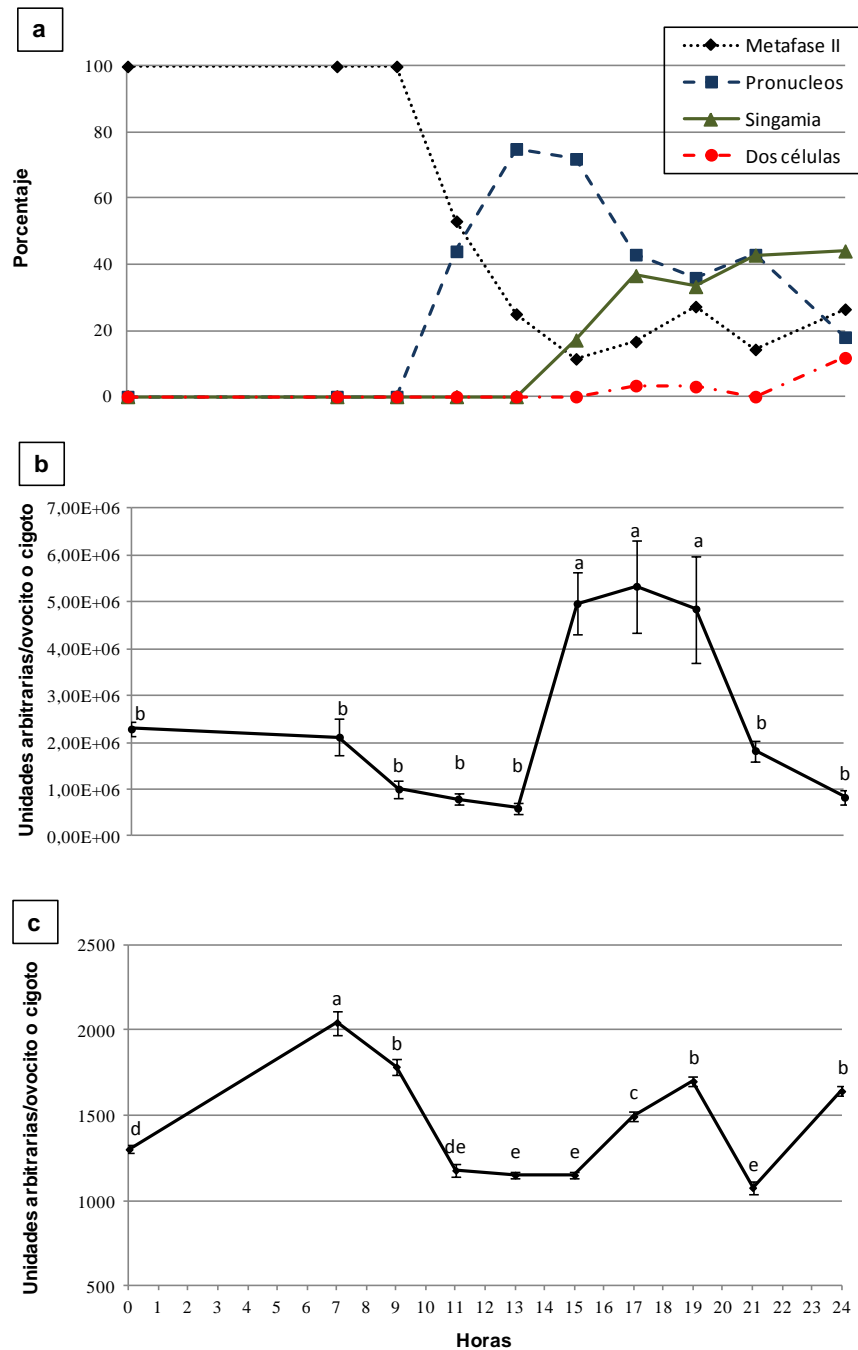


Figura 15: (a) Estadio nuclear de los cigotos putativos obtenidos por activación mediada por espermatozoides. n= 224 cigotos. (b) Estado redox en la activación mediada por espermatozoides. Los valores están expresados como media de Unidades Arbitrarias/cigoto/minuto ± SEM. n= 134 cigotos putativos. ^{a,b} Valores con diferentes superíndices representan diferencias significativas. (c) Producción de especies reactivas del oxígeno/actividad de esterasas en la activación mediada por espermatozoides. Los valores están expresados como media de Unidades arbitrarias/cigoto/minuto ± SEM. n= 1478 cigotos putativos. ^{a,b,c,d,e} Valores con diferentes superíndices representan diferencias significativas.

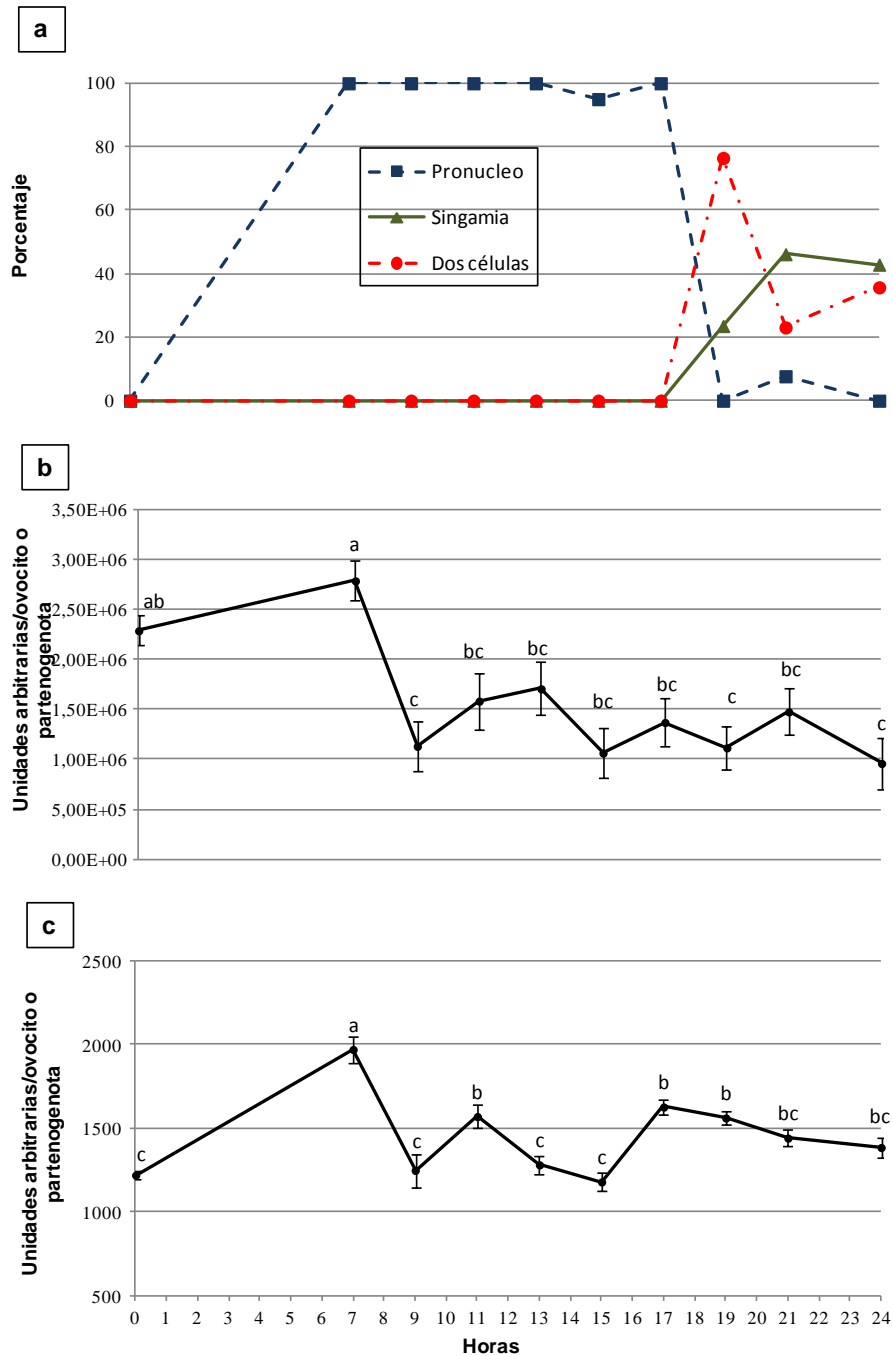


Figura 16: (a) Estadio nuclear de los cigotos putativos obtenidos por activación partenogenética. n= 196 cigotos. (b) Estado redox en la activación partenogenética. Los valores están expresados como media de Unidades Arbitarias/cigoto/minuto ± SEM. n= 172 cigotos putativos. ^{a,b,c} Valores con diferentes superíndices representan diferencias significativas (p<0,05). (c) Producción de especies reactivas del oxígeno/ actividad de esterasas en la activación partenogenética. Los valores están expresados como media de Unidades arbitrarias/cigoto/minuto ± SEM. n= 458 cigotos putativos. ^{a,b,c} Valores con diferentes superíndices representan diferencias significativas.

DISCUSIÓN

Se determinaron por primera vez fluctuaciones significativas en la producción de ROS y el estado redox en asociación con eventos temporales de la activación de los ovocitos bovinos mediante FIV o partenogénicamente.

En la activación de ovocitos maduros los eventos nucleares presentaron diferentes patrones temporales según el tipo de activación. En los potenciales cigotos obtenidos por la activación partenogénica se observó un comportamiento sincrónico hasta el clivaje, a diferencia de lo ocurrido en los ovocitos activados por espermatozoides. La secuencia temporal de eventos nucleares observada en ambos tipos de activación son similares a los previamente reportados en cigotos bovinos (Gordon, 1994). La diferencia observada en los patrones es atribuida a la asincronía en la penetración espermática, que tarda alrededor de 4 hs en el bovino (Jiang *et al.*, 1991). De todas formas, la progresión nuclear sincrónica observada en los ovocitos activados partenogénicamente no necesariamente redundará en un mejor desarrollo embrionario *in vitro* (Monaghan *et al.*, 1993).

El incremento en la actividad oxidativa observada en los ovocitos activados por espermatozoides entre las 15 y las 19 hs corresponde con el inicio de la formación de los pronúcleos y la primera división mitótica, sugiriendo un aumento en los requerimientos de energía para esos eventos. Fue demostrado que los embriones bovinos de dos células son dependientes de la fosforilación oxidativa mitocondrial, consumiendo sustratos oxidativos para producir ATP (Kim *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1996). En coincidencia, se detectó un mayor consumo de oxígeno previo al clivaje (Lopes *et al.*, 2010).

En contraste, los cigotos partenogénicos inicialmente presentaron una alta actividad oxidativa, que disminuyó a partir de las 7 hs de la activación y permaneció baja con pequeñas oscilaciones durante el proceso de desarrollo. Este bajo nivel de actividad oxidativa detectado podría deberse a una alteración en la regulación del metabolismo citosólico en este tipo de embriones, como por ejemplo una dependencia exclusiva de la actividad glucolítica como fuente de ATP. Coincidentemente, en el ratón, embriones partenogénicos de 1-2 células presentan un menor metabolismo de la glucosa, menor contenido de glucógeno y ATP y menor actividad de adenilato quinasa que los embriones obtenidos por FIV (Han *et al.*, 2008).

Esta diferencia metabólica en el comportamiento entre ambos grupos de cigotos podría ser responsable, en parte, de la notablemente menor competencia de desarrollo de los ovocitos activados partenogénicamente.

En cuanto a la producción de ROS, en los ovocitos activados por espermatozoides se observaron picos antes y/o durante eventos estructurales asociados con el clivaje. El primer pico ocurre durante las etapas preparativas para la formación de pronúcleos (7 hs), que involucran la penetración y la decondensación de la cabeza espermática, mientras que el segundo y tercer pico están asociados al estadio de dos pronúcleos (19 hs) y a la primera división mitótica (24 hs), respectivamente. Por el contrario, en los ovocitos no fecundados los niveles de ROS disminuyeron después de las 7 hs. Estos resultados coinciden con los reportados en cigotos de ratón, en los cuales sólo los ovocitos fecundados presentaron un incremento en la producción de ROS, mientras que en los no fecundados se detectaron niveles menores durante el mismo período de tiempo (Nasr-Esfahani y Johnson, 1991). Fue sugerido anteriormente que ciertos niveles de ROS son necesarios para la interacción entre el espermatozoide y el ovocito durante la FIV bovina, indicando que podrían desempeñar diferentes roles dependiendo del momento y los niveles en los que están presentes (Blondin *et al.*, 1997).

Recientemente fue identificada una nueva clase de dioxigenasas, las proteínas de translocación 10-11 (Tet 1-3), que son clave para la hidroxilación de 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina, iniciando así los primeros pasos a la de-metilación del ADN (Kriaucionis y Heintz, 2009; Tahiliani *et al.*, 2009). Considerando que la de-metilación del ADN es un proceso clave en el desarrollo embrionario temprano inmediatamente luego de la fecundación y la formación de pronúcleos, quizá el incremento observado en la producción de ROS refleje la actividad de las proteínas Tet. Más aún, en el bovino, los cigotos en estadio de pronúcleo presentan niveles significativos de hidroximetilcitosina en el pronúcleo masculino, pero no en el pronúcleo femenino, lo cual se debe a la actividad de la Tet 3 (Wossidlo *et al.*, 2011).

En cigotos partenogénéticos se observaron altos niveles de ROS en relación con el estadio de dos pronúcleos (7 y 11 hs) y el período previo al clivaje (17 hs), demostrando que la producción de ROS estaría asociada a eventos estructurales relacionados con el desarrollo embrionario temprano, coincidiendo con lo observado en ovocitos de ratón activados partenogénicamente (Nasr-Esfahani y Johnson, 1991).

Es interesante el comportamiento contrastante observado entre los picos de ROS y los de actividad oxidativa en ambos tipos de activación. Se sabe que en células somáticas, la mitocondria en estado de reposo (estado 4) produce niveles más elevados de ROS que los producidos con alto consumo de oxígeno (estado 3) (Boveris y Cadenas, 1975, 1982). Durante la activación mediada por espermatozoides se ha observado que las

oscilaciones de los niveles de Ca^{+2} desencadenadas por los espermatozoides estimulan la respiración mitocondrial (Campbell y Swann, 2006; Dumollard *et al.*, 2003, 2004; Schomer y Epel, 1998). Por lo tanto, la menor actividad oxidativa observada en los cigotos partenogenéticos podría deberse a que el pico único de liberación de Ca^{+2} desencadenado por la activación partenogenética no sería eficiente para estimular a la mitocondria en forma consistente.

En conclusión, hemos determinado por primera vez que existen patrones metabólicos diferentes entre ovocitos no activados, activados por espermatozoides y activados partenogenéticamente. Los comportamientos característicos observados en la actividad oxidativa y las fluctuaciones de la producción de ROS son relevantes para aumentar el conocimiento respecto de la competencia de desarrollo de los ovocitos y los embriones tempranos.

Capítulo 3

Participación del GSH en la producción de ROS, MIV y FIV

INTRODUCCIÓN

El glutatión es el principal compuesto sulfhidrilo no proteico en células de mamíferos (Lafleur *et al.*, 1994) y tiene la habilidad de ciclar entre su estado reducido (GSH) y oxidado (disulfato de glutatión, GSSG) (figura 17), participando así en diversos procesos biológicos como la síntesis de ADN y proteínas (Zuelke *et al.*, 1997) y cumpliendo un rol crítico como antioxidante para el normal funcionamiento celular (De Matos y Furnus, 2000). En las gametas masculinas y femeninas el GSH está involucrado en la protección frente al daño oxidativo, pero en el ovocito tiene un rol adicional ya que interviene en el mantenimiento de la morfología del huso meiótico (Luberda, 2005).

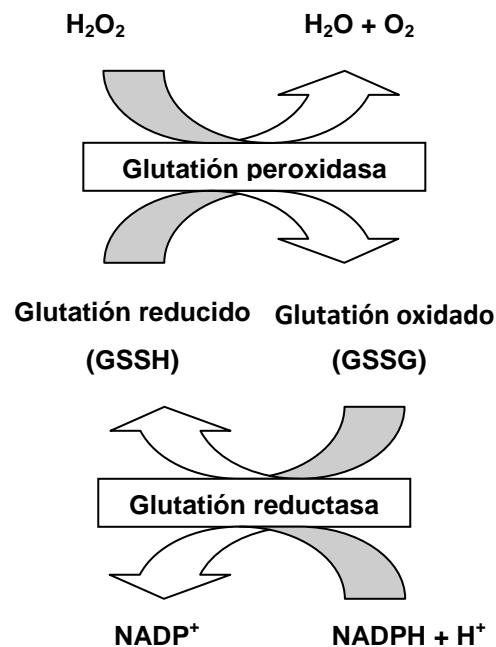


Figura 17: Representación esquemática de las reacciones de reducción y oxidación del glutatión.

Se ha demostrado que el GSH es sintetizado durante la MIV de ovocitos bovinos (de Matos *et al.*, 1996) y que es acumulado en el ovocito durante su desarrollo en el ovario, brindándole protección en estadios posteriores (Gardiner y Reed, 1995). Sin embargo, se observó que la concentración intracelular de GSH es menor en ovocitos fecundados en estado de pronúcleos que en ovocitos maduros (Funahashi *et al.*, 1994).

En el ovocito equino se observó que el contenido de GSH se incrementa durante la MIV, pero no se correlaciona con su posterior competencia de desarrollo, por lo que otros factores antioxidantes serían los que impactan en la calidad del ovocito (Luciano *et al.*, 2006). En este sentido, deben considerarse las moléculas con rol protector antioxidante no sólo del ovocito, sino también en las células del cúmulus y los demás compartimentos intrafolículos (Combelles, 2009).

En porcinos, se han detectado concentraciones menores de GSH en ovocitos que sufrieron arresto meiótico previamente a la MIV, reflejando así que existe una relación entre el arresto pre-maduración y el estado de estrés oxidativo del ovocito y que la protección frente a las ROS podría estar comprometida en los ovocitos arrestados, siendo subóptima la calidad de esos ovocitos (Romar y Funahashi, 2006).

En células somáticas existen precedentes sobre la sensibilidad del citoesqueleto (tanto de microtúbulos como de microfilamentos) al estrés oxidativo (Bellomo y Mirabelli, 1992; Dalle-Donne *et al.*, 2001). En cultivos neuronales se ha observado que los radicales libres generan una disrupción de los tres elementos del citoesqueleto (Allani *et al.*, 2004). Se ha postulado que el potencial redox y la actividad mitocondrial de las células, incluyendo ovocitos, puede modular las propiedades dinámicas y la integridad del citoesqueleto (Eichenlaub-Ritter *et al.*, 2004). En ovocitos de ratón se ha propuesto que estas alteraciones del huso meiótico pueden deberse a la reducción de la producción mitocondrial de ATP relacionada con el estrés oxidativo (Zhang *et al.*, 2006). También han sido implicados poros de permeabilidad transitoria producidos en la mitocondria.

El estado redox resultante de la acumulación de ROS y una disminución de las concentraciones de antioxidantes está involucrada en la muerte celular por apoptosis (Ott *et al.*, 2007). En cuerpos lúteos y folículos de roedores, los antioxidantes juegan un rol similar a las gonadotropinas en la protección de las células de la apoptosis *in vitro* (Tilly y Tilly, 1995; Dharmarajan *et al.*, 1999). En humanos, el estrés oxidativo puede inducir la apoptosis de ovocitos en forma tiempo y dosis dependiente (Zhang *et al.*, 2006). En folículos de rata se ha demostrado una relación entre la apoptosis químicamente inducida y un incremento de los niveles de ROS junto con una disminución de la concentración de GSH (Tsai-Turton *et al.*, 2007).

El efecto sobre la maduración de ovocitos y el posterior desarrollo embrionario de diversos precursores e inhibidores de la síntesis de GSH ha sido estudiado previamente por otros grupos de trabajo. Algunos reportes sostienen que la presencia de cisteína al igual que la combinación de β -mercaptoetanol y cisteamina en el medio de MIV

incrementa el nivel de GSH en los ovocitos, la competencia de desarrollo luego de la FIV y la producción de embriones en estadio de blastocisto (de Matos *et al.*, 1997, 2000, 2002; Funahashi, 2005). En coincidencia, la utilización de butionin sulfoximina como inhibidor de la γ -glutamil cisteína sintetasa en el medio de MIV disminuye la proporción blastocistos (Takahashi *et al.*, 1993).

Sin embargo, otros estudios han determinado que la presencia de cisteamina y β -mercaptoetanol produce una disminución en la formación de pronúcleos, sin afectar la tasa de penetración de los ovocitos por los espermatozoides (Gonçalves *et al.*, 2010). La disminución de la calidad espermática por la acción de antioxidantes durante el cultivo en FIV (Gonçalves *et al.*, 2010) podría deberse a que el $O_2^{\cdot -}$ es requerido durante el proceso de capacitación y el H_2O_2 participa en modificaciones enzimáticas y de membrana que estimulan la inducción de la reacción acrosomal en espermatozoides criopreservados (O'Flaherty *et al.*, 1999). Los efectos deletéreos de los antioxidantes podrían ocurrir durante y luego del proceso de capacitación, afectando procesos sucesivos como el bloqueo de la polispermia, la decondensación de la cromatina, la activación del ovocito, la transformación de la cabeza del espermatozoide en el pronúcleo masculino e incluso el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto (Gonçalves *et al.*, 2010).

En los trabajos citados, si bien se postula que los resultados observados tienen relación con el rol antioxidante del glutatión, no se ha determinado el efecto de moduladores de los niveles de GSH sobre la producción de ROS en el ovocito, ni el efecto de la adición al medio de MIV de compuestos que remuevan el GSH en forma no oxidativa, como el 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) (Muzyamba *et al.*, 2000).

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue modular la producción de GSH y determinar su efecto sobre la generación de ROS durante la MIV y sobre las tasas de maduración meiótica y de clivaje embrionario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Maduración de ovocitos bovinos in vitro en presencia o ausencia de moduladores de GSH

La maduración se realizó en medio 199 con 50 μ g/ml de sulfato de gentamicina, 5% de suero fetal bovino (SFB), 0,2 μ g/ml de FSH y 2 μ g/ml de LH en ausencia o

presencia de cisteína 0,6 mM o CDNB 1 mM bajo aceite mineral a 39°C, 5 % CO₂ en aire y 100 % de humedad durante 22 hs.

Determinación de la producción de ROS

Considerando las fluctuaciones observadas en los niveles de ROS del ovocito durante la MIV, que han sido descritas en el capítulo 1 (Morado *et al.*, 2009), se eligieron las horas 0, 6, 12, 18 y 22 para determinar el efecto de los moduladores de GSH. Estos puntos coinciden con eventos clave del proceso de maduración en los cuales hay variaciones en la producción de ROS. La determinación se realizó utilizando la misma metodología explicada en el capítulo 1 (Morado *et al.*, 2009).

Fecundación de ovocitos bovinos madurados *in vitro* en presencia o ausencia de cisteína

Luego de ser madurados *in vitro*, se utilizó un grupo de ovocitos del medio control y un grupo madurado en presencia de cisteína para evaluar la tasa de clivaje obtenida mediante FIV. La inseminación se realizó con semen congelado en pajuelas proveniente de toros Holstein de fertilidad comprobada. El semen fue descongelado a 37°C en fluido oviductal sintético modificado (mSOF) (Takahashi y First, 1992) adicionado con teofilina 10 mM, fue centrifugado dos veces a 500 xg por 5 minutos y luego resuspendido en medio de fertilización hasta una concentración final de 2×10^6 espermatozoides móviles/ml. La co-incubación de COCs madurados *in vitro* y espermatozoides fue llevada a cabo en medio IVF-mSOF, que consiste en mSOF suplementado con heparina 10 UI/ml y albúmina sérica bovina (BSA) 5 mg/ml, bajo aceite mineral a 39°C, 5% CO₂ en aire humidificado durante 24 hs.

RESULTADOS

En ovocitos madurados en presencia de cisteína, precursor del GSH, los niveles de ROS tendieron a ser menores que en el grupo control a lo largo del proceso, presentando diferencias significativas a las 12 y 18hs ($p < 0,05$). Por otro lado, en presencia de CDNB,

complejante de GSH, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de ROS respecto del control (figura 18).

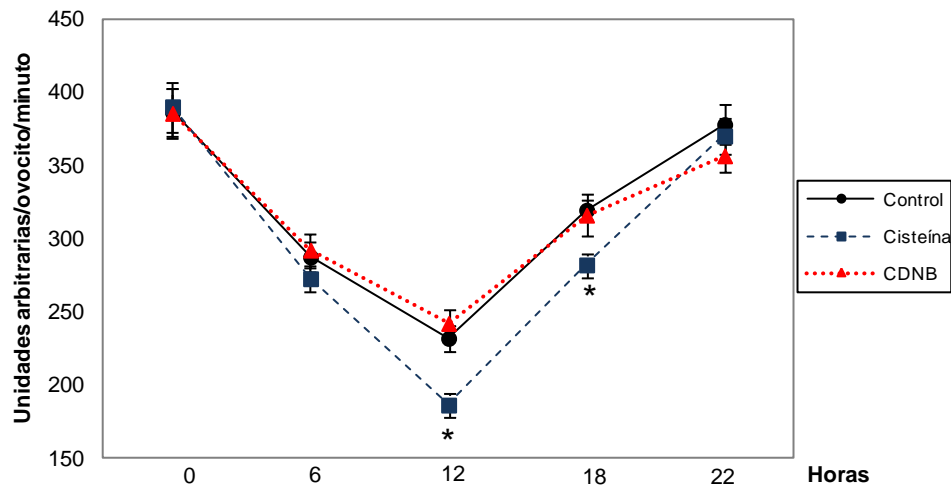


Figura 18: Producción de especies reactivas del oxígeno/actividad de esterasas durante la maduración *in vitro* en medio control y en presencia de cisteína y 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB). Los valores están expresados como media de Unidades Arbitrarias \pm SEM. n= 575 ovocitos. ^{a,b,c} Diferentes superíndices en un mismo tratamiento difieren significativamente.

* Diferencias significativas entre tratamientos a la misma hora ($p < 0,05$).

Sin embargo, en los ovocitos madurados en presencia de cisteína no se detectó una diferencia significativa en el porcentaje de maduración (54 ovocitos maduros/ 67 ovocitos, 81%), mientras que en presencia de CDNB todos los ovocitos se detuvieron en el estadio de vesícula germinal (0 ovocitos maduros de 61 ovocitos).

Teniendo en cuenta que al complejar el GSH los ovocitos no lograron completar la maduración meiótica, no se evaluó la tasa de clivaje embrionario en los ovocitos madurados en presencia de CDNB. Por lo tanto, en la FIV sólo se evaluó el efecto de la modulación de los niveles de GSH del ovocito por la adición de cisteína. De esta forma, se observó que los ovocitos madurados en presencia de cisteína y luego fecundados, no presentaron diferencias significativas en la tasa de clivaje con respecto al control (control: 80% vs. cisteína: 69%; n= 92 ovocitos fecundados).

DISCUSIÓN

En este capítulo se estudió por primera vez el efecto de la modulación de la producción de GSH sobre la generación de ROS durante la maduración del ovocito bovino, observándose fluctuaciones similares a las que se presentan en el medio control con variaciones significativas puntuales al utilizar un precursor de la síntesis de glutatión.

La disminución observada en la producción de ROS en presencia de cisteína respecto del control sugiere que el GSH actúa como un importante sistema antioxidante no enzimático en el ovocito bovino. Si bien no encontramos diferencias significativas en cuanto a la maduración meiótica ni la tasa de clivaje con este tratamiento, los bajos niveles de ROS a las 12 y 18hs de la MIV podrían en parte explicar la mayor competencia de desarrollo reportada en la bibliografía para los ovocitos cultivados en medio con cisteína (de Matos y Furnus, 2000).

La remoción de GSH por la formación de un complejo con CDNB durante la maduración no tuvo efecto en los niveles de ROS respecto del control, pero impidió el progreso meiótico de los ovocitos. Esto podría explicarse porque otros componentes del sistema antioxidante del ovocito (Cetica *et al.*, 2001) podrían compensar la falta de GSH como scavenger. Sin embargo, el rol que cumple el GSH en el mantenimiento de la morfología del huso meiótico del ovocito no podría ser reemplazado.

En relación a esto, muchos estudios relacionan las modificaciones de la arquitectura del huso meiótico con el origen de las gametas y las condiciones de cultivo durante la MIV (Sanfins *et al.*, 2003, 2004; Ibanez *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006) y existen evidencias de que el GSH influye en los microtúbulos del huso tanto en estadios posteriores a la maduración en ovocitos de hámster (Zuelke *et al.*, 1997) como durante la maduración en bovinos (Curnow *et al.*, 2008). A su vez, el estrés oxidativo resulta en alteraciones en la dinámica de los microtúbulos y la alineación de los cromosomas en ovocitos de ratón durante la maduración dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición (Choi *et al.*, 2007).

Se ha reportado también que cambios en el pool de glutatión total podrían llevar al daño oxidativo de proteínas mitocondriales clave, ya que se ha determinado que la inhibición de la síntesis de GSH o su remoción causan inactivación de los complejos I (Hsu *et al.*, 2005), II/III y IV (Heales *et al.*, 1995; Seyfried *et al.*, 1999). Esto tendría como consecuencia una disminución del ATP producido en la cadena respiratoria que podría impedir la síntesis de proteínas requeridas para la progresión de la maduración meiótica,

explicando así también que los ovocitos cultivados en presencia de CDNB se detuvieran en estadio de RVG.

En conclusión, hemos determinado por primera vez el efecto de la modulación de los niveles de GSH sobre la producción de ROS durante la maduración del ovocito bovino. Los resultados que encontramos sugieren que, si bien el rol antioxidante del GSH podría ser suplido por otros componentes del sistema antioxidante del ovocito, su participación en el mantenimiento de la morfología normal del huso meiótico es esencial para que se lleve a cabo la maduración.

Capítulo 4

Participación del ON en la producción de ROS, MIV y FIV

INTRODUCCIÓN

El ON es un gas biológicamente activo generado por casi todas las células del organismo (Nathan, 1992), que debido a su bajo peso molecular y naturaleza lipofílica difunde rápidamente a través de membranas lipídicas y participa en una variedad de mecanismos de señales celulares fisiológicas en varios tejidos a través de la activación de guanilato ciclasa (Lowenstein *et al.*, 1994). La máxima solubilidad del ON en agua, a 1 atm de presión y a temperatura ambiente, es aproximadamente 2 mM, la cual es aproximadamente dos veces superior a la del O₂. El ON es una molécula diatómica simple con un electrón desapareado. Al combinar un átomo de nitrógeno con tres electrones desapareados, con un átomo de oxígeno con dos electrones no apareados, se forma la molécula de ON, con sólo un electrón desapareado en su órbita externa, quedando así formado un radical libre centrado en el nitrógeno. La naturaleza radical del ON se pone de manifiesto por su capacidad para reaccionar con otras especies reactivas, tales como el anión superóxido. No obstante, a temperatura y presión ambiente, el ON muestra una baja probabilidad de producir un proceso de dimerización radical-radical.

El ON es sintetizado por células de mamíferos a través de diferentes NOS, las cuales actúan a través de un mecanismo común (figura 19). Las NOS son proteínas homodiméricas que catalizan la oxidación de uno de los dos nitrógenos guanidínicos equivalentes de la L-arginina, para producir ON y L-citrulina (Knowles y Moncada, 1994). La oxidación de la L-arginina se produce a través de dos reacciones de mono-oxidación sucesivas, produciendo NG-hidroxi-L-arginina como intermediario inestable. Por cada mol de ON formado se consumen 2 moles de O₂ y 1,5 moles de NADPH (Stuehr y Griffith, 1992). Para que la catálisis ocurra, la NOS debe unir y activar al O₂ en la proximidad del sitio activo que une L-arginina, utilizando 5 cofactores o grupos prostéticos: flavina adenina dinucleótido (FAD), flavina mononucleótido (FMN), Fe-protoporfirina IX (hemo), tetrahidrobiopterina (H4B) y calmodulina (CaM) (Liu y Gross, 1996). Tres isoformas de la enzima han sido descritas, dos constitutivas y dependientes de calcio (nNOS expresada principalmente en células neuronales y periféricas y eNOS identificada en el endotelio vascular) y una isoforma inducible, independiente de calcio (iNOS, sintetizada principalmente en macrófagos; Marletta, 1993). La presencia de la isoforma mitocondrial de NOS (mitNOS) ha sido detectada por primera vez en mitocondrias de hígado de rata.

La producción enzimática de ON es sensible a los inhibidores de las isoformas de NOS, indicando que mitNOS participa en la generación de ON mitocondrial (Ghafourifar y Cadenas, 2005). Las mitocondrias producen ON a través de una NOS mitocondrial (mitNOS) sensible al calcio. El inhibidor del uniporter de calcio mitocondrial (rojo de rutenio) disminuye la producción de ON por mitNOS (Kanai *et al.*, 2001). El ON producido por mitNOS regula el consumo de O_2 mitocondrial y el potencial transmembrana vía una reacción reversible con citocromo c oxidasa.

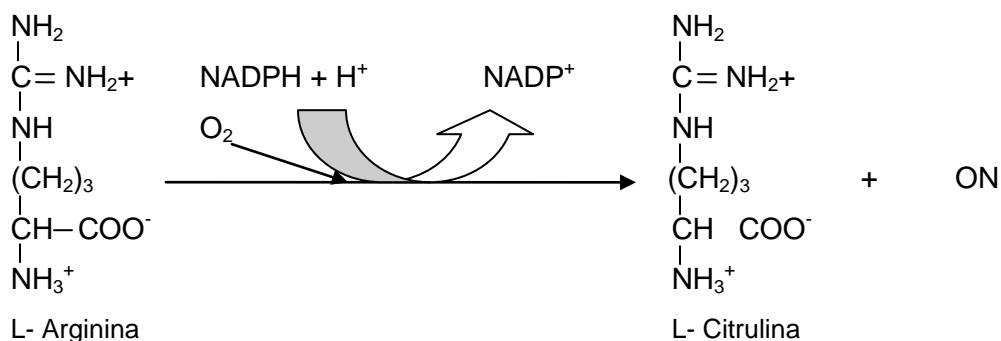


Figura 19: Representación esquemática de la reacción catalizada por las diferentes isoformas de óxido nítrico sintasa.

La reacción del ON con el $O_2^{\cdot-}$, generada en la cadena respiratoria mitocondrial, produce ONOO^- , que modifica irreversiblemente proteínas mitocondriales induciendo estrés oxidativo o nitrativo (Ghafourifar y Cadenas, 2005). El ONOO^- inicia procesos de oxidación de uno o dos electrones que resultan en la oxidación, nitración y/o nitrosación de componentes mitocondriales críticos que alteran la fisiología y la homeostasis mitocondrial. El ONOO^- mitocondrial interacciona con canales de aniones dependientes de voltaje (VDAC), creatina quinasa, ATPasa, aconitasa, proteínas presentes en la membrana externa, espacio intermembrana, membrana interna y matriz mitocondrial, debido a una excesiva formación de ON. En condiciones fisiológicas, el ONOO^- puede

reaccionar con sustancias reducidas como citocromo c oxidasa, glutatión y ubiquinol (Radi *et al.*, 2002).

Incluso a pH fisiológico, la estabilidad relativa del ONOO^- le permite difundir considerables distancias a escala celular, e incluso atravesar membranas celulares (Beckman *et al.*, 1994). Numerosas biomoléculas son oxidadas y/o nitradas por el peroxinitrito, como proteínas (Pietraforte y Minetti, 1997; Sies y Arteel, 2000), lípidos (Rubbo *et al.*, 1994) y ADN (Epe *et al.*, 1996). El ONOO^- reacciona con el aminoácido tirosina para formar un marcador nitrado, la 3-nitrotirosina (Greenacre e Ischiropoulos, 2001). Incluso grupos sulfhidrilos de las estructuras celulares son también blanco del ONOO^- , tanto afectando la función de sistemas de señalización, como produciendo compuestos derivados del ON de origen tisular (White *et al.*, 1999; Crow, 2000). Se asume que los sitios de formación de ONOO^- están espacialmente asociados a las fuentes de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (como la enzima NADPH oxidasa de membrana plasmática o los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial) porque si bien el ON es un radical libre relativamente estable y altamente difusible, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ posee una vida media mucho más corta y una difusión restringida a través de las membranas biológicas (Szabó *et al.*, 2007) (figura 20).

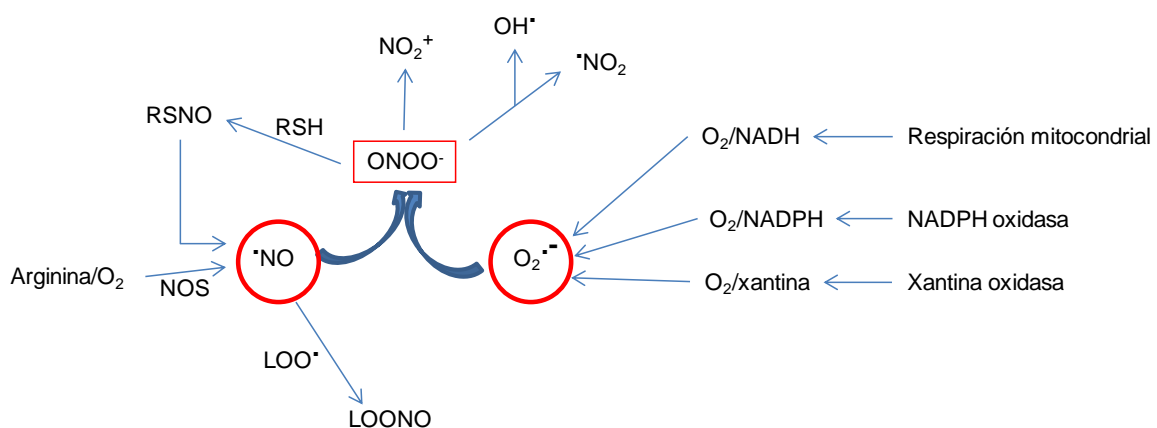


Figura 20: Orígenes e interacciones entre ROS y RNS en sistemas biológicos. Adaptado de Brown y Borutaite, 2006.

Niveles excesivos de ON pueden inhibir la glucólisis, la cadena respiratoria mitocondrial y la replicación del ADN (Cleeter *et al.*, 1994). Estos efectos pueden ser directos, pero habitualmente involucran interacciones con ROS. El ON también reacciona con radicales peróxidos lipofílicos, que son importantes en la propagación de la lipoperoxidación, generando peroxinitratos alquilo (LONOO). Los LONOO parecen más estables que el ONOO⁻ (Rubbo *et al.*, 1994). Si los derivados de LONOO pueden ser metabolizados sin la liberación de radicales libres tóxicos, la reacción de ON con radicales peroxilos es potencialmente beneficiosa, ya que permite detener la peroxidación lipídica.

El ON participa en vías de transducción de señales dependientes de GMP cíclico o independientes, como la nitrosilación de proteínas. A su vez, trabaja en forma orquestada con el H₂O₂ y otras moléculas transductoras de señales que pueden estar presentes en forma constitutiva o incrementar su concentración en la célula. La activación de la cascada de MAPK sería uno de los puntos de convergencia de las vías de transducción de señales del ON y el H₂O₂ (Neill *et al.*, 2002).

En los modelos reproductivos, se ha descrito que el ON juega un rol importante en sistemas intracelulares de transducción de señales para la maduración de ovocitos de mamíferos en estadio pre-ovulatorio (Hattori y Tabata, 2006). En el ratón, algunos trabajos han estudiado el efecto de donantes de óxido nítrico y de inhibidores de las NOS en la maduración de ovocitos. Se ha demostrado que el L-NAME, inhibidor de NOS, inhibe la protrusión del primer corpúsculo polar en ovocitos de ratón (Bu *et al.*, 2004; Tao *et al.*, 2004), mientras que la aminoguanidina, inhibidor específico de iNOS, bloquea también la RVG (Tao *et al.*, 2004; Huo *et al.*, 2005). En contraste, los donantes de ON como el SNP mostraron un efecto bifásico estimulando la maduración meiótica a bajas concentraciones (Sengoku *et al.*, 2001), pero retrasando la RVG y suprimiendo la formación del primer corpúsculo polar a altas concentraciones (Nakamura *et al.*, 2002; Bu *et al.*, 2004).

El objetivo de este capítulo fue evaluar la participación del ON en la maduración y la activación de ovocitos bovinos *in vitro* en presencia de donantes o de inhibidores de su producción y su aporte en la generación de ROS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Maduración de ovocitos bovinos *in vitro* en presencia o ausencia de moduladores de la producción de ON

La maduración se realizó en medio 199 con 50 µg/ml de sulfato de gentamicina, 5% de suero fetal bovino (FBS), 0,2 µg/ml de FSH y 2 µg/ml de LH en ausencia o presencia de L-NAME 0,5 mM o SNP 10 µM o detanonoato (DN) 100 µM bajo aceite mineral a 39°C, 5 % CO₂ en aire y 100 % de humedad durante 22 hs.

Determinación de la producción de ROS

Considerando las fluctuaciones observadas en los niveles de ROS del ovocito durante la MIV, que han sido descritas en el capítulo 1 (Morado *et al.*, 2009), se eligieron las horas 0, 6, 12, 18 y 22 para determinar el efecto de los moduladores de la producción de ON. Estos puntos coinciden con eventos clave del proceso de maduración en los cuales hay variaciones en la producción de ROS. La determinación se realizó utilizando la misma metodología explicada en el capítulo 1 (Morado *et al.*, 2009).

Fecundación de ovocitos bovinos madurados *in vitro* en presencia o ausencia de L-NAME

Luego de ser madurados *in vitro*, se utilizó un grupo de ovocitos del medio control y un grupo madurado en presencia de L-NAME para evaluar la tasa de clivaje obtenida mediante FIV. La inseminación se realizó con semen congelado en pajuelas proveniente de toros Holstein de fertilidad comprobada. El semen fue descongelado a 37°C en fluido oviductal sintético modificado (mSOF) (Takahashi y First, 1992) adicionado con teofilina 10 mM, fue centrifugado dos veces a 500 xg por 5 minutos y luego resuspendido en medio de fertilización hasta una concentración final de 2 x 10⁶ espermatozoides móviles/ml. La co-incubación de COCs madurados *in vitro* y espermatozoides fue llevada a cabo en medio IVF-mSOF, que consiste en mSOF suplementado con heparina 10 UI/ml y

albúmina sérica bovina (BSA) 5 mg/ml, bajo aceite mineral a 39°C, 5% CO₂ en aire humidificado durante 24 hs.

RESULTADOS

En ovocitos madurados en presencia de L-NAME, inhibidor de la eNOS, no se detectaron diferencias significativas en la generación de ROS (figura 21), ni en el porcentaje de maduración respecto del control. De los ovocitos madurados en presencia de L-NAME se evaluó un grupo de 29 ovocitos, de los cuales 24 alcanzaron el estadio de metafase II (83%), no hallándose diferencias significativas respecto del control (80%).

En presencia de dos donantes de ON, SNP y detanonoato, se detectó una significativa disminución en el porcentaje de maduración (20 y 21% respectivamente, $p < 0,05$) respecto del control, deteniéndose la mayoría de los ovocitos entre los estadios de vesícula germinal y metafase I (figura 21). Sin embargo, en cuanto a los niveles de ROS, los donantes presentaron diferentes comportamientos; en presencia de SNP se detectó un aumento significativo a las 12 hs de maduración ($p < 0,05$) (figura 22), mientras que en presencia de detanonoato no se detectaron diferencias significativas (figura 23).

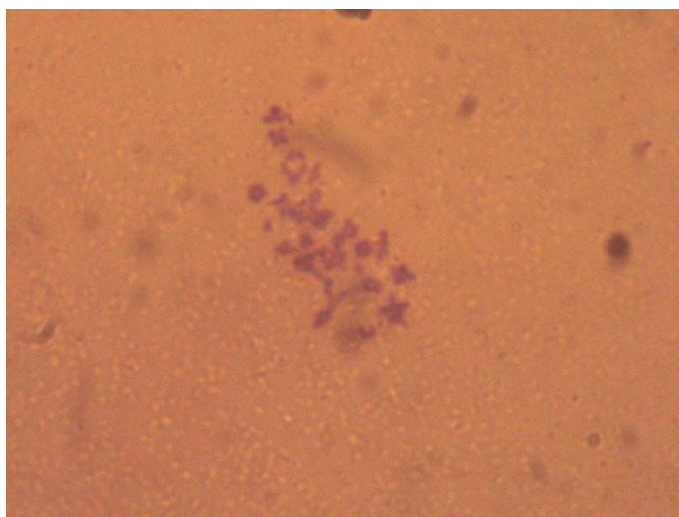


Figura 21: Ovocito madurado en presencia de SNP detenido en estado de metafase I observado mediante tinción con Giemsa luego de la fijación por la técnica de Tarkowski (1000x).

Teniendo en cuenta que al adicionar ON exógeno al medio de cultivo los ovocitos no lograron completar la maduración meiótica, no se evaluó la tasa de clivaje embrionario en los ovocitos madurados en presencia de SNP ni detanonoato. Por lo tanto, en la FIV sólo se evaluó el efecto de la modulación de los niveles de ON del ovocito por la inhibición de la eNOS. De esta forma, se observó que los ovocitos madurados en presencia de L-NAME y luego fecundados, no presentaron diferencias significativas en la tasa de clivaje con respecto al control (control: 80% vs. L-NAME: 73%; n= 70 ovocitos fecundados).

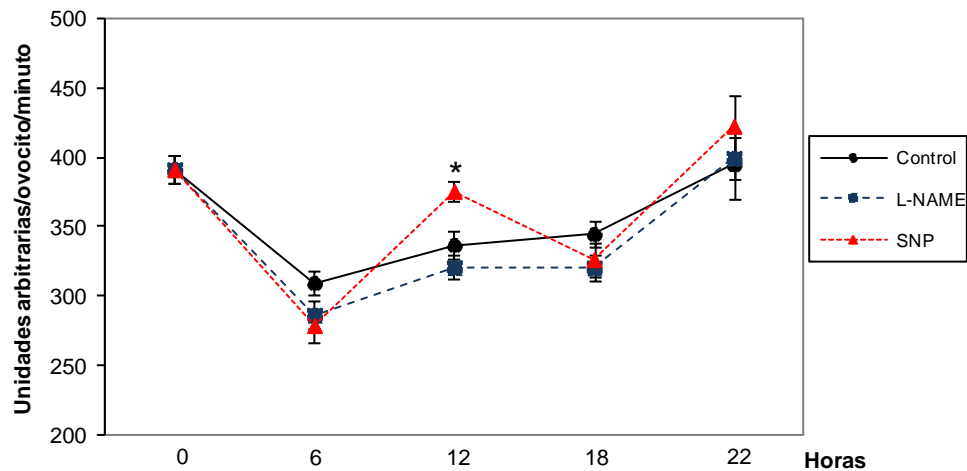


Figura 22: Producción de especies reactivas del oxígeno/actividad de esterasas durante la maduración *in vitro* en medio control y en presencia de N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) y nitroprusiato de sodio (SNP). Los valores están expresados como media de Unidades Arbitrarias \pm SEM. n= 565 ovocitos. ^{a,b,c} Diferentes superíndices en un mismo tratamiento difieren significativamente. * Diferencias significativas entre tratamientos a la misma hora ($p < 0,05$).

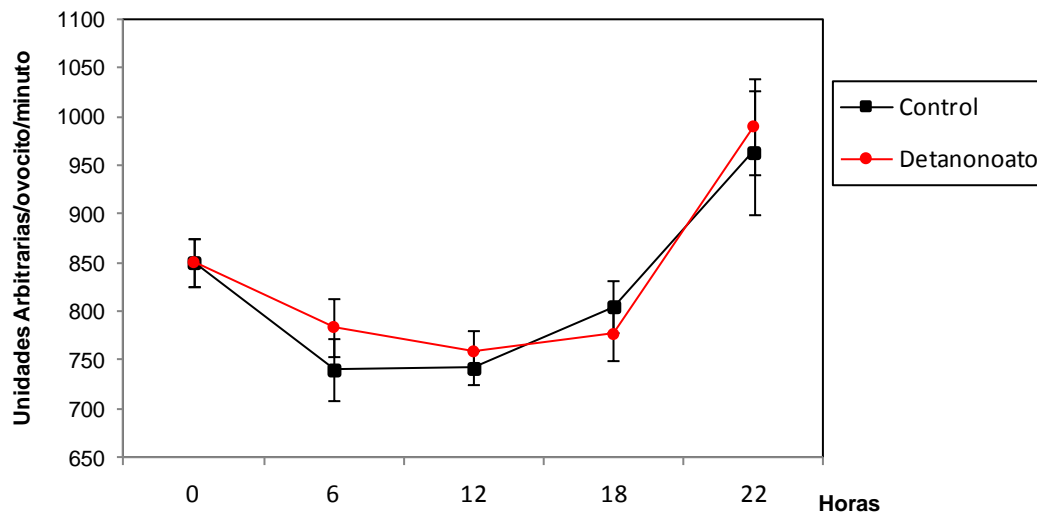


Figura 23: Producción de especies reactivas del oxígeno / actividad de esterasas durante la maduración *in vitro* en medio control y en presencia de Detanonoato. Los valores son el cociente entre las técnicas de DCHFDA y FDA, y están expresados como media de Unidades Arbitrarias/ovocito/minuto \pm SEM. $n = 192$ ovocitos. ^{a,b,c} Diferentes superíndices en un tratamiento difieren significativamente.

DISCUSIÓN

En este capítulo se estudió por primera vez el efecto de la modulación de los niveles ON sobre la generación de ROS durante la maduración del ovocito bovino, observándose fluctuaciones similares a las que se presentan en el medio control con variaciones significativas puntuales al utilizar un dador de ON exógeno.

La adición de L-NAME no modificó la generación de ROS, la maduración meiótica ni la tasa de clivaje embrionario. Por lo tanto, la inhibición de la eNOS no tendría efecto sobre dichos procesos.

La adición de ON exógeno mediante SNP incrementó los niveles de ROS a las 12 hs de la MIV. Este incremento puede atribuirse a la estimulación de la producción de $O_2^{\cdot -}$ debido a la inhibición competitiva de la citocromo oxidasa por el ON (Antunes *et al.*, 2004) y a la inhibición del transporte de electrones en el complejo III (Poderoso *et al.*, 1996). A su vez, bajo las presentes condiciones de cultivo, el $O_2^{\cdot -}$ que normalmente dismuta a H_2O_2

podría combinarse con ON para formar ONOO⁻. Ya que la técnica de DCHFDA detecta diferentes peróxidos, el incremento observado a las 12 hs podría corresponder a la formación de ONOO⁻.

La inhibición de la progresión meiótica observada por la adición de SNP podría deberse a tres causas principalmente. Por un lado, la menor actividad de la cadena respiratoria, resultante de la inhibición de la citocromo oxidasa y el complejo III, conduciría a una reducción en la producción de ATP, necesario para la síntesis de proteínas durante la maduración. Por otro lado, la utilización de O₂⁻ para la formación de ONOO⁻ tiene como consecuencia la disminución de O₂⁻ y H₂O₂, que podrían participar en mecanismos de señalización intracelular que intervengan en la maduración nuclear del ovocito. Sumado a esto, el ONOO⁻ podría producir oxidación, nitración y/o nitrosación de proteínas, perjudicando la maduración.

En el caso de la adición de detanonoato, que no produjo variaciones en la producción de ROS, la disminución de la maduración no estaría relacionada a la formación de ONOO⁻. Se ha reportado que el ON inhibe la actividad de la MAPK (Ingram *et al.*, 2000), la cual cumple un rol importante en el progreso meiótico del ovocito (Fan y Sun, 2004). La MAPK se encuentra en una elevada concentración después de la RVG, pero presenta una mayor actividad durante la transición de MI a MII (Fan y Sun, 2004). Esto sugiere que la adición ON exógeno en este caso estaría impidiendo el progreso meiótico mediante la inhibición de la acción de la MAPK y del FPM, que actúan en la RVG.

En conclusión, hemos determinado por primera vez el efecto de la modulación de los niveles de ON exógeno y endógeno sobre la producción de ROS durante la maduración del ovocito bovino. La adición de un donante de ON exógeno demostró ser perjudicial para la maduración independientemente de las variaciones en los niveles de ROS. Un aumento en la concentración de ON en el ovocito impediría el progreso meiótico tanto por la formación de ONOO⁻ como por la inhibición de la MAPK y del MPF, que intervienen en sistemas de señalización intracelular clave para la maduración.

Capítulo 5

Participación de la NADPH oxidasa en la producción de ROS, MIV y FIV

INTRODUCCIÓN

La NADPH oxidasa es una enzima localizada en la membrana plasmática de las células, que oxida el NADPH en el citosol y reduce el O_2 a $O_2^{\cdot-}$ en el medio extracelular. El $O_2^{\cdot-}$ generado dismuta a H_2O_2 y ambas moléculas participan de los efectos celulares en los que interviene la enzima. Durante largo tiempo se consideró que esta regulación de la producción de ROS por la NADPH oxidasa era propiedad exclusiva de las células fagocíticas, relacionada con la eliminación de microorganismos; sin embargo, se ha documentado que esta enzima está relacionada con diversos procesos celulares, entre ellos la proliferación y la migración celular (Van der Vliet, 2008).

El $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 generados fuera de la célula pueden activar o inactivar moléculas blanco, tanto extra como intracelulares, sensibles a la oxidación, interviniendo así en diferentes sistemas de señalización celular. Se ha descrito que el H_2O_2 ingresa a la célula por difusión facilitada mediante aquaporinas o peroxiporinas (Bienert *et al.*, 2007; Henzler y Steudle, 2000), mientras que el $O_2^{\cdot-}$ lo hace a través del canal de cloro 3 (Hawkins *et al.*, 2007) (figura 24).

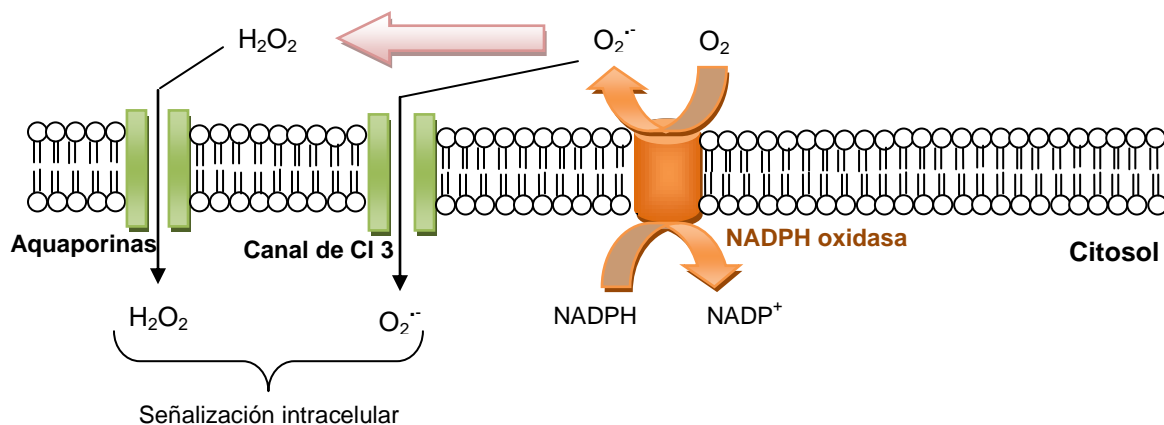


Figura 24: Acción de la NADPH oxidasa. Se observa cómo el $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 producidos en el medio extracelular ingresan a la célula, en la cual pueden mediar diversas respuestas celulares. Modificado de Van der Vliet, 2007.

Se ha descrito que el $O_2^{\cdot-}$ dependiente de NADPH oxidasa puede participar en diversos mecanismos de señalización intracelular. Por un lado, podría oxidar grupos ferro-sulfurados de diferentes proteínas regulando así la función mitocondrial (Gardner, 1997). A su vez, activaría la proteína quinasa C actuando sobre residuos de cisteína (Knapp y Klann, 2000) e inactivaría proteínas tirosina fosfatasa (Barrett *et al.*, 1999). Por otro lado, mediante la combinación con ON, formando $ONOO^-$, podría regular la acción de algunas proteínas mediante su modificación por oxidación (Radi, 2004).

Los neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos (células del sistema inmunológico) ejercen su acción microbicida a través del complejo sistema enzimático de la NADPH oxidasa (Babior *et al.*, 1997). En otros tipos celulares, como los fibroblastos (Meier *et al.*, 1991), las células endoteliales (Nakano *et al.*, 1995) y las células del músculo liso vascular (Griendling *et al.*, 1994), se ha determinado la presencia de una oxidasa dependiente de NADPH que produce $O_2^{\cdot-}$. Mientras tanto en espermatozoides humanos (Aitken y Clarkson, 1987) y en ovocitos (Heinecke y Shapiro, 1989) se ha propuesto la presencia de una oxidasa que genera ROS y se considera responsable del incremento respiratorio insensible al cianuro luego de la fertilización (Foerder y Shapiro, 1977; Foerder *et al.*, 1978).

En la bibliografía se reportan diferentes inhibidores de la NADPH oxidasa que actúan a su vez sobre otros sistemas enzimáticos en diversos modelos celulares. El más utilizado es el difeniliodonio (IDP), que a bajas concentraciones actúa como inhibidor de NADPH oxidasa (Cross y Jones, 1986; O'Flaherty *et al.*, 2005), mientras que a concentraciones más elevadas inhibe también la eNOS (Stuehr *et al.*, 1991), la XOD (Sanders *et al.*, 1997), la P-450 reductasa (Tew, 1993) y el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Luetjens *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003).

En el ovocito bovino, no se encuentran estudios concluyentes sobre el rol de la NADPH oxidasa en los procesos de MIV y FIV. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue evaluar la participación de la NADPH oxidasa en la maduración y la activación de ovocitos bovinos *in vitro* y su aporte en la producción de ROS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Maduración de ovocitos bovinos *in vitro* en presencia o ausencia de un inhibidor de la NADPH oxidasa

La maduración se realizó en medio 199 con 50 µg/ml de sulfato de gentamicina, 5% de suero fetal bovino (FBS), 0,2 µg/ml de FSH y 2 µg/ml de LH en ausencia o presencia de IDP 2 µM bajo aceite mineral a 39°C, 5 % CO₂ en aire y 100 % de humedad durante 22 hs.

Determinación de la producción de ROS

Considerando las fluctuaciones observadas en los niveles de ROS del ovocito durante la MIV, que han sido descriptas en el capítulo 1 (Morado *et al.*, 2009), se eligieron las horas 0, 6, 12, 18 y 22 para determinar el efecto de la inhibición de la NADPH oxidasa. Estos puntos coinciden con eventos clave del proceso de maduración en los cuales hay variaciones en la producción de ROS. La determinación se realizó utilizando la misma metodología explicada en el capítulo 1 (Morado *et al.*, 2009).

Fecundación de ovocitos bovinos madurados *in vitro* en presencia o ausencia de IDP

Luego de ser madurados *in vitro*, se utilizó un grupo de ovocitos del medio control y un grupo madurado en presencia de IDP para evaluar la tasa de clivaje obtenida mediante FIV. La inseminación se realizó con semen congelado en pajuelas proveniente de toros Holstein de fertilidad comprobada. El semen fue descongelado a 37°C en fluido oviductal sintético modificado (mSOF) (Takahashi y First, 1992) adicionado con teofilina 10 mM, fue centrifugado dos veces a 500 xg por 5 minutos y luego resuspendido en medio de fertilización hasta una concentración final de 2 x 10⁶ espermatozoides móviles/ml. La co-incubación de COCs madurados *in vitro* y espermatozoides fue llevada a cabo en medio IVF-mSOF, que consiste en mSOF suplementado con heparina 10 UI/ml y

albúmina sérica bovina (BSA) 5 mg/ml, bajo aceite mineral a 39°C, 5% CO₂ en aire humidificado durante 24 hs.

RESULTADOS

En ovocitos madurados en presencia del inhibidor de la NADPH oxidasa (IDP) no se observaron diferencias significativas en la producción de ROS respecto del control (figura 25). La tasa de maduración meiótica a las 22 hs, 68 ovocitos maduros/91 ovocitos (75%), tampoco presentó diferencias significativas respecto del grupo control, 72/90 ovocitos (80%). Sin embargo, en ovocitos madurados en presencia de IDP y luego fecundados se observó una disminución significativa en la tasa de clivaje (control: 80% vs. IDP: 18%; n= 90 ovocitos fecundados; p<0,05) (figura 26).

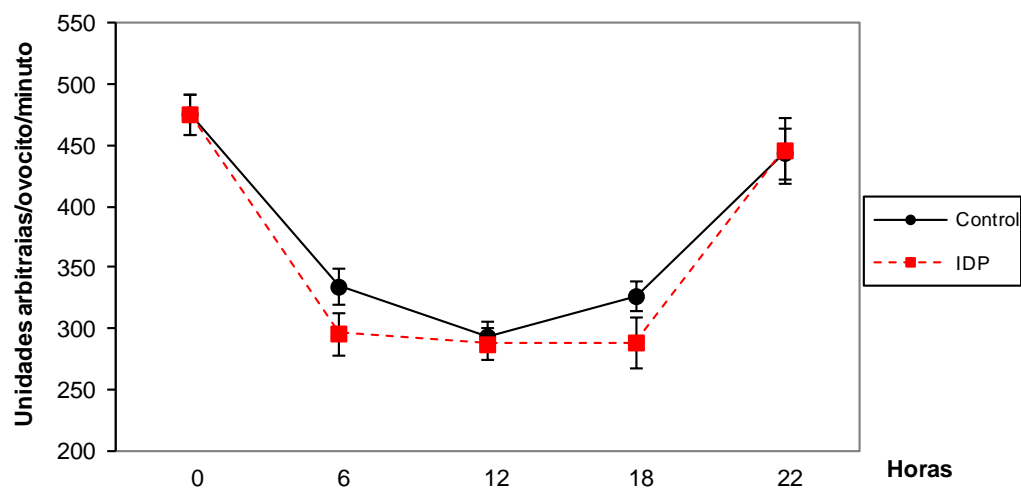


Figura 25: Producción de especies reactivas del oxígeno/ actividad de esterasas durante la maduración in vitro en medio control y en presencia de difeniliodonio (IDP). Los valores están expresados como media de Unidades arbitrarias/ovocito/minuto \pm SEM. n= 312 ovocitos. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

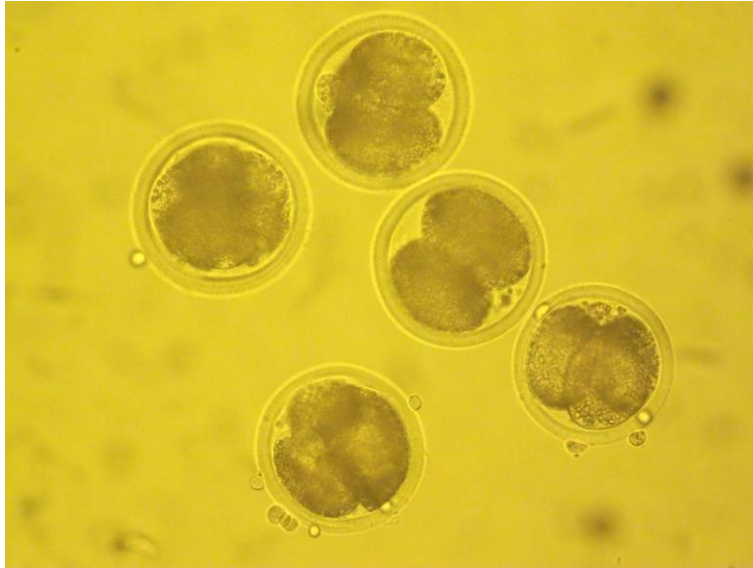


Figura 26: Embriones clivados y en estadio de 4 células, observados a las 48 hs post FIV de ovocitos madurados en medio control (40x).

DISCUSIÓN

En este capítulo se estudió por primera vez el efecto de la inhibición de la enzima NADPH oxidasa sobre la generación de ROS durante la maduración del ovocito bovino, observándose las mismas fluctuaciones que en el medio control.

A bajas concentraciones, el IDP inhibe la NADPH oxidasa de membrana, flavoproteína que genera $O_2^{\bullet-}$, como fue reportado en espermatozoides bovinos (O'Flaherty *et al.*, 2005). A su vez, al inhibir la NADPH oxidasa, habría disponible más NADPH, que funciona como sustrato de la glutatión y de la tiorredoxina reductasas, que producen GSH y tiorredoxina reducida respectivamente (Veal *et al.*, 2007), dos de los principales sistemas antioxidantes de las células. Por lo tanto, esperábamos que la inhibición de esta enzima generara un incremento de los niveles de ROS del ovocito.

Contrariamente a lo esperado, durante la maduración, en el presente estudio no se observaron cambios en la generación de ROS ni en el porcentaje de maduración luego de la adición de una baja concentración de IDP. Por lo tanto, a diferencia de lo que ocurre en

la capacitación del espermatozoide, la inhibición de la NADPH oxidasa no tendría efecto durante la MIV.

Sin embargo, la adición de IDP al medio de maduración produjo una profunda disminución de la tasa de clivaje embrionario. Esto podría deberse a la disminución de la generación de $O_2^{\bullet-}$, que participaría de mecanismos de señalización intracelular durante la activación del ovocito bovino. Se ha reportado en la bibliografía que las acciones celulares de la NADPH oxidasa estarían asociadas primariamente con dos mecanismos generales de señalización, la señalización mediada por Ca^{2+} y la fosforilación de residuos tirosina (Van der Vliet, 2008). Por medio de estos mecanismos, por lo tanto, la NADPH oxidasa estaría implicada en la activación del ovocito bovino.

En conclusión, hemos determinado por primera vez el efecto de la inhibición de la NADPH oxidasa sobre la producción de ROS durante la maduración del ovocito bovino. La inhibición de la enzima no generaría cambios en los niveles de ROS del ovocito, pero la disminución del $O_2^{\bullet-}$ generado por esta enzima afectaría la tasa de clivaje embrionario, posiblemente por la participación de este compuesto en mecanismos de señalización intracelular necesarios para la activación.

Capítulo 6

Participación de sistemas de generación y remoción de H_2O_2 y O_2^{\bullet} en la MIV

INTRODUCCIÓN

El $O_2^{\cdot-}$ se forma cuando el O_2 adquiere un electrón adicional y es intermediario de una serie de reacciones de importancia bioquímica, es un radical libre muy poco reactivo en solución acuosa, que posee una vida media muy corta de alrededor de 1 milisegundo y se convierte rápidamente en H_2O_2 y O_2 por acción de la enzima SOD o por dismutación espontánea (figura 27).

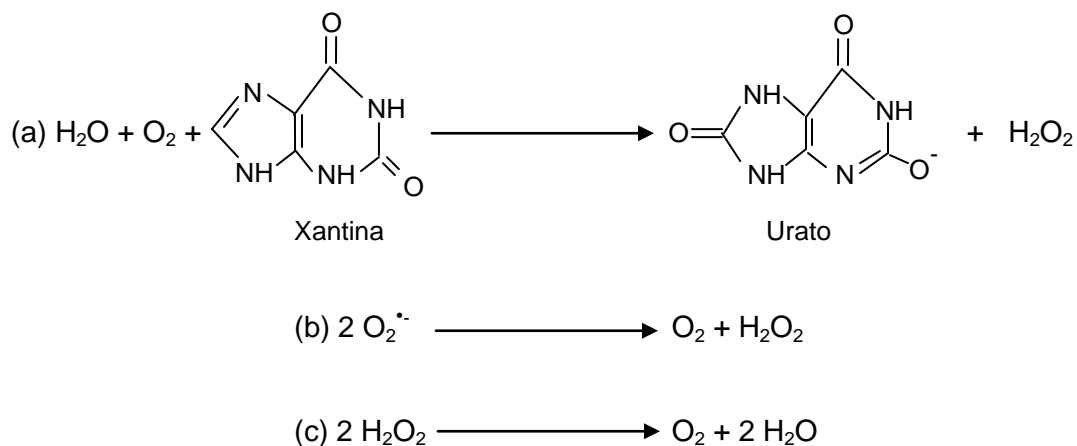


Figura 27: Esquemas de las reacciones catalizadas por las enzimas (a) Xantina oxidasa, (b) Superóxido dismutasa, (c) Catalasa.

Si bien el O_2 consumido por los organismos vivos es reducido finalmente a H_2O , aproximadamente un 2% es reducido univalentemente a $O_2^{\cdot-}$ (Chance *et al.*, 1979; Boveris, 1998). El $O_2^{\cdot-}$ es el primer intermediario en la reducción secuencial univalente del oxígeno. La cadena respiratoria mitocondrial es la fuente fisiológica más importante de producción de $O_2^{\cdot-}$. El $O_2^{\cdot-}$ se produce por auto-oxidación de componentes de la cadena respiratoria, principalmente en dos sitios: complejo I (NADH-ubiquinona reductasa) y complejo III (ubiquinol-citocromo c reductasa) (Boveris y Cadenas, 1975; Boveris *et al.*, 1976; Chance *et al.*, 1979; Turrens y Boveris, 1980).

A pH 7,4, el complejo I contribuye con un 25% de la producción total de $O_2^{\bullet-}$ y el complejo III con el 75% restante (Turrens y Boveris, 1980). Asimismo, el $O_2^{\bullet-}$ puede producirse, en células aeróbicas, a través de la acción de numerosas enzimas solubles, tales como la XOD (Fridovich, 1970) y por auto-oxidación de pequeñas moléculas (flavinas, catecolaminas, etc.; Cohen, 1984; Cadenas *et al.*, 1992) y ciclos redox de xenobióticos (paraquat, nitrofurantoinas, etc.; Docampo *et al.*, 1981). La XOD genera $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 y es usada frecuentemente en modelos para investigar los efectos citotóxicos iniciados por $O_2^{\bullet-}$ (Link y Riley, 1988). Por lo tanto, un sistema generador de ROS que combine xantina y XOD resultaría en la producción de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 (de Lamirande y Gagnon, 1993; Blondin *et al.*, 1997), mientras que el sistema xantina-XOD en presencia de catalasa generaría principalmente $O_2^{\bullet-}$ (O'Flaherty *et al.*, 1999).

Como ya se ha establecido en los capítulos anteriores, las células poseen sistemas naturales conocidos como scavengers para contrarrestar los efectos negativos de ROS. Diferentes compartimentos celulares contienen diferentes antioxidantes. La SOD intracelular elimina $O_2^{\bullet-}$ a través de una reacción que lo convierte en H_2O_2 y O_2 . A su vez, la catalasa y la glutatión peroxidasa transforman H_2O_2 en H_2O y $O_2^{\bullet-}$, eliminando de esa manera radicales superóxido e hidroxilo (Meister, 1983). En el fluido folicular de ovocitos en desarrollo, antioxidantes enzimáticos, como SOD y catalasa, trabajan en conjunto con antioxidantes no enzimáticos como la vitamina C y la taurina (Shiotani *et al.*, 1991; Sabatini *et al.*, 1999; Carbone *et al.*, 2003).

En estudios realizados en plantas, se ha descrito que diferentes estímulos podrían activar en forma específica diferentes enzimas generadoras de H_2O_2 (Bolwell *et al.*, 2002). A su vez, se ha determinado que los sistemas antioxidantes de las células impiden que el H_2O_2 difunda por diferentes compartimentos celulares y se localice, de esta forma, en micro-dominios. Por lo tanto, el efecto sobre el destino de la célula dependería del sitio celular en el cual se genere el H_2O_2 (Neill *et al.*, 2002), pudiendo participar en determinados casos de sistemas de señalización intracelular y en otros como una sustancia deletérea (figura 28).

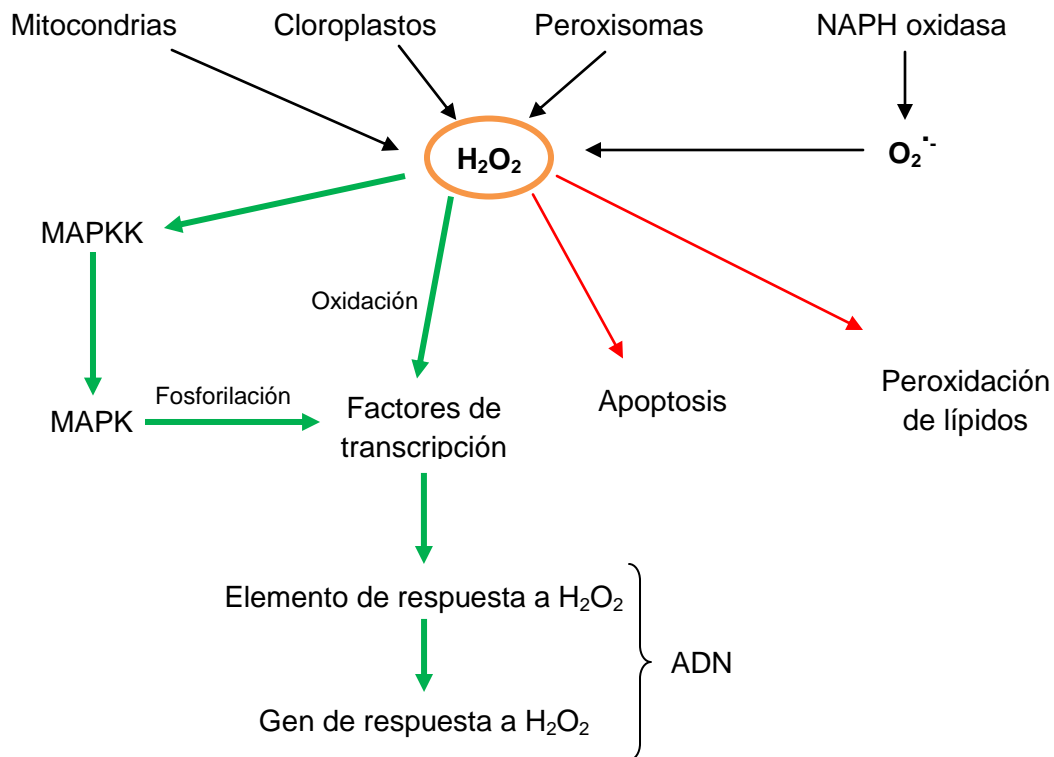


Figura 28: Mecanismos de señalización y de daño celular en los que interviene el H_2O_2 en células vegetales. Adaptado de Neill *et al.*, 2002.

Si bien se ha estudiado en trabajos previos de nuestro grupo el efecto de diferentes sistemas generadores y scavengers de H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$ en la maduración del ovocito y en el posterior desarrollo embrionario, no hay reportes sobre la relación entre la adición de esos sistemas al medio de maduración y los niveles de ROS en el ovocito. Por lo tanto, el objetivo del presente capítulo fue determinar la influencia de sistemas de generación y remoción de H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$ en los niveles de ROS de ovocitos bovinos durante la MIV y en la tasa de maduración meiótica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Maduración de ovocitos bovinos *in vitro* en presencia o ausencia de sistemas generadores o scavengers de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$

La maduración se realizó en medio 199 con 50 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de gentamicina, 5% de suero fetal bovino (FBS), 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de FSH y 2 $\mu\text{g/ml}$ de LH en ausencia o presencia de xantina + XOD (generador de H_2O_2) o xantina + XOD + catalasa (generador de $O_2^{\cdot-}$) o catalasa (scavenger de H_2O_2) o SOD + catalasa (scavenger de $O_2^{\cdot-}$).

Determinación de la producción de ROS

Considerando las fluctuaciones observadas en los niveles de ROS del ovocito durante la MIV, que han sido descritas en el capítulo 1 (Morado *et al.*, 2009), se eligieron las horas 0, 6, 12, 18 y 22 para determinar el efecto de generadores y scavengers de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$. Estos puntos coinciden con eventos clave del proceso de maduración en los cuales hay variaciones en la producción de ROS. La determinación se realizó utilizando la misma metodología explicada en el capítulo 1 (Morado *et al.*, 2009).

RESULTADOS

Efecto de sistemas de generación y remoción de H_2O_2 :

En ovocitos madurados en presencia de sistemas generadores y scavengers de H_2O_2 no se observaron diferencias significativas en cuanto a la producción de ROS durante la maduración (figura 29). Sin embargo, la tasa de maduración meiótica fue menor en presencia de ambos sistemas (xantina + XOD: 47%; catalasa: 52%) con respecto al control (92%) (tabla 2, $p < 0,05$).

Tratamiento	Vesícula germinal (%)	RVG – Metafase I (%)	Metafase II (%)
Control	8	-	92 *
Xantina + XOD	12	41	47
Catalasa	11	37	52
Xantina + XOD + catalasa	10	25	65
SOD + catalasa	11	35	54

Tabla 2: Porcentaje de maduración meiótica en presencia y ausencia de sistemas generadores o scavengers de H₂O₂ y O₂^{•-}. * Diferencia significativa entre tratamientos (p<0,05). N= 139 ovocitos.

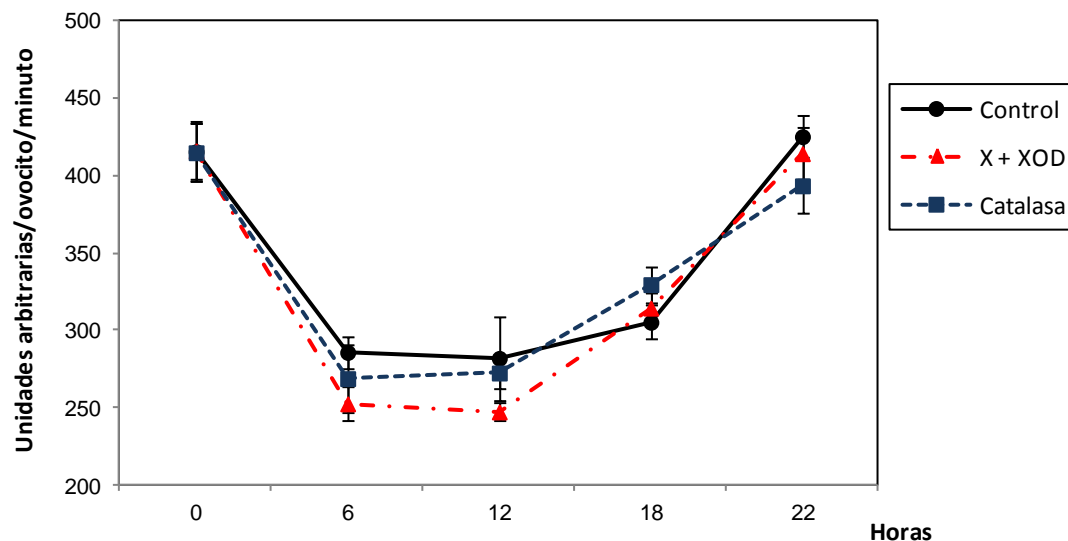


Figura 29: Producción de especies reactivas del oxígeno/actividad de esterasas durante la maduración de ovocitos bovinos *in vitro* en medio control y en presencia de xantina + XOD, catalasa. Los valores fueron expresados como media de Unidades arbitrarias/ovocito/minuto ± SEM. n= 217 ovocitos. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

Efecto de sistemas de generación y remoción de $O_2^{\cdot-}$:

Si bien en ovocitos madurados en presencia de scavengers de $O_2^{\cdot-}$ no se observaron diferencias significativas en cuanto a la producción de ROS durante la maduración, en presencia de sistemas generadores se observó un aumento significativo en los niveles de ROS a las 6 y a las 18 hs respecto del control ($p < 0,05$) (figura 30). Sin embargo, la tasa de maduración meiótica fue menor en presencia de ambos sistemas (xantina + XOD + catalasa: 65%; SOD + catalasa: 54%) con respecto al control (92%) (tabla 2, $p < 0,05$).

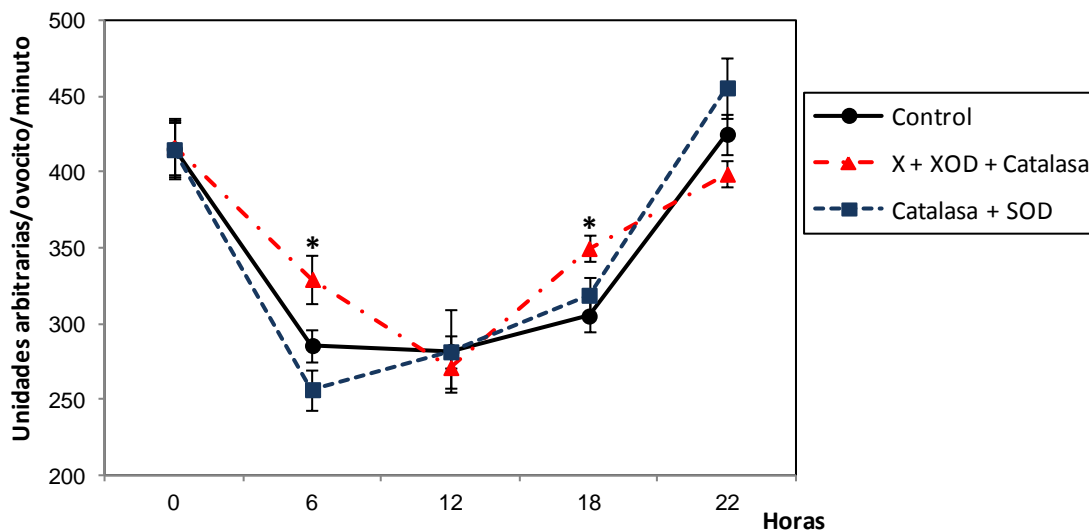


Figura 30: Producción de especies reactivas del oxígeno/actividad de esterasas durante la maduración de ovocitos bovinos *in vitro* en medio control y en presencia de xantina + XOD + catalasa o catalasa + SOD. Los valores fueron expresados como media de Unidades arbitrarias/ovocito/minuto \pm SEM. $n = 225$ ovocitos. * Diferencias significativas entre tratamiento y control ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

En este capítulo se estudió por primera vez el efecto de sistemas generadores y de remoción de H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$ sobre la generación de ROS durante la maduración del ovocito bovino, observándose fluctuaciones similares a las que se presentan en el medio control con aumentos significativos puntuales al utilizar un sistema generador de $\text{O}_2^{\cdot-}$.

El estudio del efecto de sistemas generadores y de remoción de H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$, profundiza el conocimiento de la participación de las ROS en el proceso de maduración. El incremento en H_2O_2 generado por la adición de xantina + XOD podría ser compensado por la alta actividad de catalasa observada en las células del cúmulus (Cetica *et al.*, 2001), explicando de esa manera que no hayamos observado un incremento en la producción de ROS en el ovocito con ese tratamiento. Por otro lado, el incremento en $\text{O}_2^{\cdot-}$ generado por la adición de xantina + XOD + catalasa no podría ser compensado por la relativamente baja actividad de SOD en las células del cúmulus, explicando el incremento en la producción de ROS en el ovocito.

El H_2O_2 y el $\text{O}_2^{\cdot-}$ generados por los sistemas enzimáticos adicionados al medio de maduración ingresarían al ovocito a través de peroxiporinas y canales de cloro 3 respectivamente, como ya fue descrito en el capítulo 5. Al ingresar al ovocito, ambas ROS podrían activar diferentes sistemas de señalización intracelular, entre ellos los que involucran la acción de MAPK (Hancock *et al.*, 2001). El incremento en el ingreso de H_2O_2 producido por los sistemas generadores de ROS adicionados, podría estimular una generación aún mayor de H_2O_2 en la mitocondria, posiblemente también por la vía de la MAPK, iniciando un ciclo de amplificación del estrés oxidativo que podría llevar a la muerte celular (Van Camp *et al.*, 1996). De esta manera se explicaría que, mientras que la remoción del H_2O_2 y el $\text{O}_2^{\cdot-}$ podrían afectar el progreso meiótico de los ovocitos por interferir con sistemas de señalización intracelular, el exceso de estas ROS afectaría también el proceso por generar un daño oxidativo en el ovocito.

En el ovocito bovino también se documentó la expresión de 6 isoformas de un grupo de enzimas antioxidantes, las peroxirredoxinas (PRDX), durante la maduración (tanto en el ovocito como en las células del cúmulus) y el desarrollo embrionario temprano (Leyens *et al.*, 2004a). Se observó que el incremento de la expresión de PRDX6 en el

ovocito es dependiente del contacto con las células del cúmulus, mientras que la expresión en las células del cúmulus depende de factores secretados por el ovocito (Leyens *et al.*, 2004b). Las PRDX no sólo participarían de la prevención del daño oxidativo sino que además participarían de sistemas de transducción de señales involucrados en la expansión del cúmulus (Leyens *et al.*, 2004b). Otras PRDX influirían en la calidad del ovocito, como la PRDX1, cuya expresión tiene una correlación positiva con la con la competencia de desarrollo de los ovocitos bovinos provenientes de folículos de diferentes tamaños (Mourot *et al.*, 2006). Esta influencia bidireccional entre el ovocito y las células del cúmulus en la modulación del estado de estrés oxidativo del COC, coincide con el rol vital que cumplen las células del cúmulus en la maduración y la adquisición de la competencia de desarrollo de los ovocitos (Eppig, 2001; Tanghe *et al.*, 2002; Gilchrist *et al.*, 2004; Gilchrist y Thompson, 2007). En este sentido, las células del cúmulus podrían proteger al ovocito proveyéndole antioxidantes y/o regulando la utilización de estos durante la MIV (Combelles, 2009).

En porcinos, ha sido demostrado que la adición de sistemas enzimáticos antioxidantes como SOD, catalase o tioredoxina es efectivo para el desarrollo embrionario mediante la remoción de ROS (Takahashi, 2012). Sin embargo, en estudios realizados por nuestro equipo de trabajo, la adición de catalasa o catalasa + SOD, no modificó los niveles de ROS endógenos de los ovocitos porcinos durante la MIV ni mejoró la tasa de maduración (Álvarez *et al.*, 2014). Por lo tanto, los sistemas antioxidantes propios del ovocito porcino junto con la protección brindada por las células del cúmulus propuesta en trabajos anteriores (Tatemoto *et al.*, 2000) sería suficiente para regular la producción de ROS durante la MIV, haciendo innecesaria la adición de scavengers al medio de cultivo en esta especie.

En conclusión, hemos determinado por primera vez el efecto de la adición de sistemas enzimáticos generadores y scavengers al medio de MIV sobre la producción de ROS durante la maduración del ovocito bovino. Si bien la adición de sistemas generadores de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ serían perjudiciales para la calidad del ovocito, el uso de scavengers alteraría el proceso de maduración por intervenir con diferentes sistemas de señalización intracelular. Estos resultados estarían demostrando que determinados niveles de ROS son necesarios para que el ovocito bovino lleve a cabo la maduración por participar en sistemas de señalización que intervienen en el proceso.

Capítulo 7

Participación de la cadena respiratoria en la producción de ROS durante la MIV

INTRODUCCIÓN

Los ovocitos primarios contienen aproximadamente 6000 mitocondrias y durante la maduración citoplasmática el número se incrementa a más de 100000 (Trimarchi *et al.*, 2000; Cummins, 2004). En el bovino se ha observado que pocos ovocitos inmaduros presentan actividad mitocondrial, probablemente porque la mayoría de las mitocondrias son inmaduras (Stojkovic *et al.*, 2001; Wilding *et al.*, 2001; Tamassia *et al.*, 2004). Por lo tanto, la energía sería provista pasivamente desde las células de la granulosa (Tanghe *et al.*, 2002; Fair, 2003). Luego de la MIV, la actividad mitocondrial aumenta y su distribución se hace difusa alrededor del citoplasma (Tarazona *et al.*, 2006); aparentemente se requerirían altos niveles de actividad mitocondrial para determinados eventos que ocurren durante la maduración que consumen ATP, tales como la maduración nuclear y la competencia meiótica (de Vanterly *et al.*, 1997; Picton *et al.*, 1998), la maduración citoplasmática (Picton *et al.*, 1998), la reestructuración del citoesqueleto (Wang y Lessman, 2002; Van Blerkom *et al.*, 2000) y la acumulación de ARNm necesario para el desarrollo embrionario temprano, previo al comienzo de la transcripción del ADN embrionario (Picton *et al.*, 1998; Gary, 2001; Trounson *et al.*, 2001). Ha sido documentado que existe una relación entre una alta actividad mitocondrial y la RVG, lo cual puede explicarse por el aumento de la demanda energética para la condensación de la cromatina y para la reorganización del citoplasma (Kątska-Książkiewicz *et al.*, 2011).

Se observó también que los cambios en los niveles de ATP en el ovocito de ratón están correlacionados temporalmente con cambios en el patrón de localización de las mitocondrias, sugiriendo que la formación de grandes conglomerados de mitocondrias podría ser un factor de estimulación de la producción de ATP por las mitocondrias (Yu *et al.*, 2010).

Durante el desarrollo embrionario temprano las mitocondrias no aumentan en número; sin embargo, sí lo hacen luego de la expansión del blastocisto, sugiriendo que la mitocondria de origen ovocitario proveería la energía necesaria para el clivaje embrionario y los estadios anteriores al blastocisto (Tarazona *et al.*, 2006). Luego de la activación del genoma embrionario, cuando el embrión ingresa al útero encuentra una menor concentración de O₂ con respecto al oviducto y comienza a utilizar la fermentación láctica como fuente de energía (Thompson *et al.*, 2000). Se observó también que los embriones

no competentes presentan menor actividad mitocondrial y su clivaje fue bloqueado previo a la activación del genoma (cuarto ciclo celular), lo cual sugiere que la energía producida a nivel mitocondrial sería necesaria para el proceso de activación del genoma (Tarazona *et al.*, 2006).

En el ovocito bovino, el RedoxSensor red CC-1, que determina la actividad oxidativa, y el MitoTracker green FM, que determina la actividad mitocondrial, se colocan alrededor del citosol, coincidiendo con el patrón característico de células metabólicamente activas (Chen y Gee, 2000). Esta relación sería el resultado de agentes reductores citosólicos, como lactato o malato que son sustratos de lactato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa, respectivamente (Cetica *et al.*, 1999, 2002). Ha sido reportado que durante la maduración del ovocito, la reorganización de las mitocondrias y el incremento en la producción de ATP son inhibidos si la progresión del ciclo celular es inhibida (Yu *et al.*, 2010). En coincidencia con estos resultados, se ha determinado que cambios en la actividad oxidativa y mitocondrial están relacionados con la normal migración de las mitocondrias, sugiriendo que el ovocito bovino se comporta como otras células metabólicamente activas (Gutnisky *et al.*, 2012).

Se ha observado también que existe una relación recíproca entre la actividad mitocondrial y las variaciones en las concentraciones intracelulares de Ca^{+2} en ovocitos durante la fecundación. Las señales de Ca^{+2} intracelulares estimulan la actividad de las mitocondrias, mientras que el segundo incremento de la concentración de Ca^{+2} provocado por la activación del ovocito por el espermatozoide es dependiente de la producción de ATP mitocondrial (Dumollard *et al.*, 2003).

La utilización de moduladores de la actividad mitocondrial demostró tener el mismo efecto en embriones que en células somáticas. El uso de desacoplantes de la fosforilación oxidativa como el protonóforo carbonil cianuro fenilhidrazona (FCCP) produjo un aumento del consumo de O_2 y una disminución de la concentración de coenzima NAD reducida (NADH) en la matriz mitocondrial, mientras que el cianuro bloqueó el consumo de O_2 e incrementó la concentración de NADH en la matriz (Dumollard *et al.*, 2003) (figura 31). Ambos moduladores disminuyen o inhiben la producción de ATP en la cadena respiratoria, en el primer caso por equilibrar el gradiente electroquímico entre el espacio intermembrana y la matriz y en el segundo por inhibir el transporte de electrones y, por ende, la translocación de protones. Por acción de estos moduladores, podría generarse

entonces una depleción energética en la célula, alterando su actividad metabólica o incluso pudiendo producir la muerte celular.

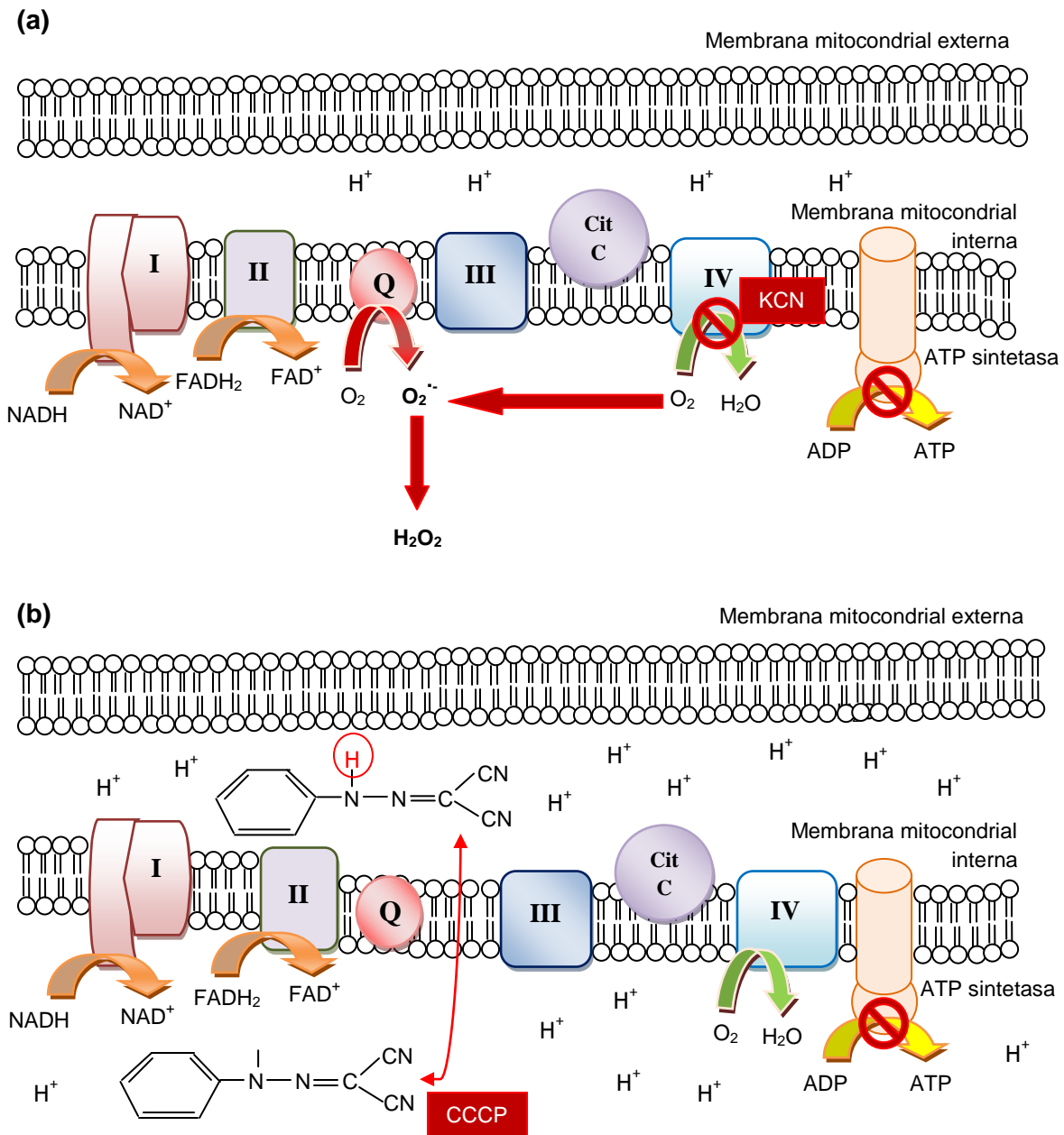


Figura 31: Representación esquemática del mecanismo de acción de los moduladores de la actividad de la cadena respiratoria (a) Mecanismo de acción del cianuro (KCN); (b) Mecanismo de acción del carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona (CCCP).

Si bien estos y otros estudios han analizado el efecto de moduladores de la cadena respiratoria en embriones y espermatozoides, no se ha estudiado su relación con la producción de ROS durante la maduración de ovocitos. Por lo tanto, el objetivo del presente capítulo fue determinar la participación de la cadena respiratoria mitocondrial en la generación de ROS durante la MIV mediante el uso de efectores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para estudiar la participación de la cadena respiratoria mitocondrial en la producción de ROS y en el proceso de maduración, los COCs fueron madurados en medio control y luego expuestos durante 30 minutos a KCN 1 mM (Wang *et al.*, 2003), inhibidor de la citocromo c oxidasa, o a CCCP 0,42 μ M (Beconi *et al.*, 1993), desacoplante de la fosforilación oxidativa, respectivamente, en cada tiempo (0, 6, 12, 18 y 22 hs).

La determinación de la producción de ROS se realizó utilizando la misma metodología explicada en el capítulo 1 (Morado *et al.*, 2009).

RESULTADOS

Efecto de moduladores de cadena respiratoria:

En los ovocitos tratados con un inhibidor de la citocromo c oxidasa (KCN) se detectó un aumento significativo en la producción de ROS a las 12 hs respecto del control ($p < 0,05$) mientras que en los ovocitos expuestos al desacoplante CCCP no se detectaron diferencias significativas (figura 32).

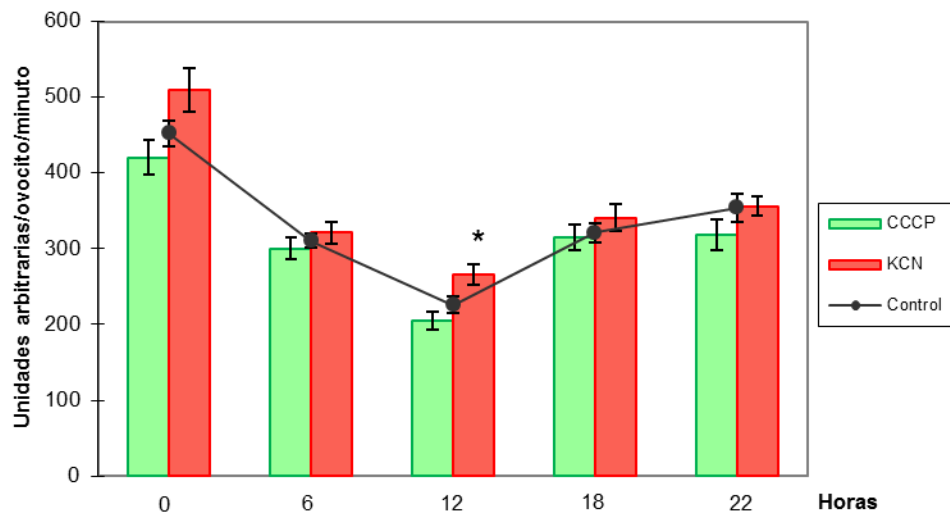


Figura 32: Producción de especies reactivas del oxígeno/actividad de esterasas durante la maduración in vitro en medio control y expuestos a carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona (CCCP) y cianuro de potasio (KCN). Los valores están expresados como media de unidades arbitrarias/ovocito/minuto \pm SEM. n= 296 ovocitos. * Diferencias significativas entre tratamientos a la misma hora ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

El incremento en la generación de ROS observado a las 12 hs del proceso de maduración sugiere que la inhibición de la citocromo oxidasa aumentaría la producción de ROS por los complejos I y III (Chen *et al.*, 2003), principales sitios de generación de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial (Muller *et al.*, 2004), ya que previene la oxidación de esos complejos. Al permanecer estos complejos reducidos, transfieren sus electrones al O_2 generando $O_2^{\cdot-}$ que podría dismutar a H_2O_2 , siendo así responsable del incremento observado en la producción de ROS.

El desacoplante CCCP incrementa el consumo de O_2 sin producción de ATP, conduciendo a una disminución en la generación de $O_2^{\cdot-}$. Aunque no se detectaron diferencias significativas entre los ovocitos control y los tratados con CCCP, los niveles de ROS tendieron a ser menores luego del tratamiento. Por lo tanto, al aumentar la velocidad

del transporte de electrones, tendería a ser menor la generación de ROS. Esta tendencia confirmaría, entonces, la participación de la cadena de transporte de electrones en la generación de ROS por el ovocito bovino durante la MIV.

En conclusión, hemos determinado por primera vez el efecto de la modulación de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial sobre la producción de ROS durante la maduración del ovocito bovino. Nuestros resultados sostienen la hipótesis de que la reducción de la generación de ROS observada durante la maduración coincide con un aumento de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial que cubre las necesidades energéticas del ovocito debido a su mayor demanda de actividad metabólica. El ATP generado por la cadena respiratoria sería especialmente importante a las 12 hs, momento en el cual hay una activa síntesis proteica y que coincide con la transición entre MI y MII.

1. Se observó una significativa fluctuación en los niveles de ROS a lo largo de la maduración y la activación de ovocitos bovinos *in vitro*, coincidente con eventos clave de ambos procesos.
2. Durante la MIV se determinó una disminución en la producción de ROS entre las 2 y las 18 hs y una recuperación de los niveles iniciales hacia las 22 hs.
3. Los ovocitos activados y los no activados presentaron patrones de actividad oxidativa y producción de ROS diferentes luego de la maduración.
4. Los ovocitos activados por espermatozoides y los activados partenogenéticamente presentaron patrones de actividad oxidativa y producción de ROS diferentes entre sí.
5. En los ovocitos activados por espermatozoides, se observó una ligera disminución de la actividad oxidativa entre las 0 y las 11-13 hs seguida de un incremento significativo entre las 15 y las 19 hs disminuyendo luego nuevamente, mientras que en los activados partenogenéticamente se detectó un ligero aumento en la actividad oxidativa a las 7 hs y luego una disminución a las 9 hs, permaneciendo luego baja con pequeñas fluctuaciones hasta las 24 hs de desarrollo.
6. Los ovocitos activados por espermatozoides presentaron picos en los niveles de ROS a las 7, 19 y 24 hs, mientras que los activados partenogenéticamente presentaron picos a las 7, 11 y 17 hs.
7. El tratamiento con cisteína no afectó la tasa de maduración meiótica. Sin embargo, la disminución observada en los niveles de ROS de los ovocitos debida a este tratamiento podría provocar modificaciones citoplasmáticas que justifiquen la mejor competencia de desarrollo que ha sido documentada en esos ovocitos.

8. La remoción no oxidativa del GSH afectó la maduración meiótica sin modificar los niveles de ROS, sugiriendo que el rol antioxidante del GSH podría ser compensado por otros sistemas antioxidantes del ovocito, pero su participación sería esencial en otros procesos celulares involucrados en la maduración.
9. La adición de L-NAME al medio de maduración no modificó los porcentajes de maduración meiótica ni de FIV, por lo que la inhibición de la eNOS no tendría efecto sobre estos procesos.
10. La adición de SNP al medio de maduración produjo un incremento en los niveles de ROS que podría deberse a la formación ONOO^- , mientras que la adición de detanonoato no modificó los niveles de ROS. Sin embargo, ambos impidieron el progreso meiótico de los ovocitos. Por lo tanto, la disminución de la tasa de maduración meiótica observada por este tratamiento podría ser consecuencia de la acción del ONOO^- o de la disminución concomitante del $\text{O}_2^{\cdot-}$.
11. La inhibición de la NADPH oxidasa no modificó la producción de ROS ni la maduración meiótica, pero disminuyó la tasa de clivaje embrionario. Por lo tanto, esta enzima tendría participación en la activación *in vitro* del ovocito bovino, posiblemente por generar $\text{O}_2^{\cdot-}$ que participaría de mecanismos de señalización intracelular.
12. El porcentaje de maduración meiótica disminuyó tanto en presencia de sistemas generadores como en presencia de scavengers enzimáticos de H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$. Por lo tanto, a pesar de que la adición de sistemas enzimáticos de generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 podría ser perjudicial para la calidad del ovocito, el uso de scavengers también alteraría el proceso de maduración.
13. El tratamiento de los ovocitos con un desacoplante de la fosforilación oxidativa no tuvo efecto sobre los niveles de ROS a diferentes tiempos durante la MIV.

14. La inhibición de la cadena respiratoria con KCN produjo un aumento en los niveles de ROS a las 12 hs, lo cual estaría determinando la participación de la mitocondria en la producción de ROS durante la maduración y su relación con la variación en la tasa de actividad metabólica del ovocito.

Por primera vez se observó una significativa fluctuación de los niveles de ROS a lo largo de la maduración y la activación de ovocitos bovinos *in vitro* y se pudo comprobar que las variaciones observadas tienen una relación temporal con eventos clave de ambos procesos.

Las fluctuaciones en la producción de ROS y la actividad oxidativa presentaron comportamientos contrastantes durante la maduración y la activación. La mayor demanda de actividad metabólica que tiene lugar durante la maduración del ovocito bovino coincide con una concomitante reducción de la generación de ROS. De esta forma, los ovocitos presentan el mismo comportamiento que las células somáticas, en las cuales fue demostrado que en las mitocondrias en estado de reposo (estado 4) hay una mayor producción de ROS que en las que presentan un alto consumo de O₂ (estado 3) debido a que parte de los electrones que se transportan en la cadena respiratoria son transferidos al oxígeno, formando O₂^{•-} que puede derivar a H₂O₂.

En cuanto a la activación, en el presente trabajo determinamos que existen patrones metabólicos diferentes entre ovocitos no fecundados, activados por espermatozoides y activados partenogénicamente. Los comportamientos característicos observados en la actividad oxidativa y la generación de ROS en los dos tipos de activación son relevantes para aumentar el conocimiento respecto de la competencia de desarrollo de los ovocitos y los embriones tempranos. Las fluctuaciones que observamos en la actividad oxidativa y los niveles de ROS de los cigotos bovinos obtenidos por FIV serían parte de su metabolismo normal, mientras que las diferencias observadas en los cigotos partenogénicos con respecto a los patrones oxidativos podrían en parte explicar su menor capacidad de desarrollo.

En presencia de sistemas moduladores se observaron cambios en los niveles de ROS y en las tasas de maduración y clivaje embrionario. La adición de diferentes agentes pro-oxidantes al medio de maduración produjo aumentos significativos en la generación de ROS en diferentes tiempos de la MIV. El sistema xantina + XOD + catalasa produjo un aumento a las 6 y 18 hs, mientras que el SNP y el KCN lo hicieron a las 12 hs. Por otro lado, la suplementación del medio de MIV con cisteína como agente antioxidante redujo la

producción de ROS a las 12 y 18 hs. Estos tiempos coinciden con la RVG (6 hs), el progreso de MI a MII (12 hs) y la protrusión del primer corpúsculo polar (18 hs), sugiriendo que la variación en la producción de ROS estaría íntimamente relacionada con estos puntos críticos de la MIV de ovocitos bovinos.

El incremento en H_2O_2 generado por la adición de xantina + XOD podría ser compensado por la elevada actividad de catalasa en las células del cúmulus, que observamos en un trabajo previo de nuestro equipo de trabajo, explicando así la ausencia de un incremento en la producción de ROS detectada en el ovocito. Por otro lado, el incremento de $O_2^{\cdot-}$ generado por la adición de xantina + XOD + catalasa no podría ser compensado debido a la relativamente baja actividad de SOD de las células del cúmulus, observándose así el incremento esperado en los niveles de ROS en el ovocito. Estos resultados sugieren que las células del cúmulus tendrían un importante rol en la modulación de los niveles de ROS del ovocito tanto en condiciones de cultivo normales como en presencia de diferentes sistemas pro o antioxidantes.

La disminución en las tasas de maduración meiótica y de clivaje observadas con sistemas enzimáticos de remoción de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ y con un inhibidor de la NADPH oxidasa respectivamente, indicaría que, si bien en exceso pueden ser nocivas por generar daño oxidativo, a concentraciones fisiológicas ciertas ROS podrían participar de mecanismos de señalización intracelular que intervienen en esos procesos. Estos resultados también sugieren que, al igual que lo observado en otros modelos celulares, el sitio en el que se producen las ROS podría determinar que esos compuestos generen un efecto beneficioso o deletéreo para la maduración y la activación de ovocitos bovinos.

Estudios futuros deberían profundizar el conocimiento sobre la relación entre el potencial redox, la relación entre pro y antioxidantes en el medio y la tolerancia al daño de los ovocitos bovinos y de diferentes especies. En este sentido, debería considerarse también la influencia de cualquier modificación de los sustratos energéticos durante la MIV en el estado redox y en los niveles de ROS de los ovocitos.

La utilización y el potencial beneficio de los antioxidantes durante el cultivo *in vitro* está aún en discusión y uno de los desafíos es determinar la proporción de pro y antioxidantes que brinde las condiciones óptimas para la maduración de los COCs. Ya que el tracto reproductivo consta de defensas antioxidantes propias, es necesario controlar los factores físicos y químicos del ambiente de cultivo que pueden influir en el estado redox y en la calidad del ovocito para simular lo que ocurre *in vivo*.

En lo que respecta a la activación, estudios posteriores sobre el control metabólico de la activación partenogenética podrían contribuir a mejorar la performance de estos embriones en diferentes aplicaciones biotecnológicas como transferencia nuclear, clonación y transgénesis.

Pensando en el impacto que este y futuros estudios podrían tener en la reproducción humana, la MIV es una técnica prometedora para la reproducción asistida debido a que involucra un protocolo simple y de bajo costo y a que permite prevenir la hiperestimulación, a diferencia de la FIV de ovocitos madurados *in vivo*. La técnica podría ser más exitosa si se controlaran factores aún no detectados que pueden intervenir y si se corrigieran deficiencias en los medios de cultivo.

1. Agarwal A, Saleh RA y Bedaiwy MA (2003) Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*, 79: 829–843.
2. Aitken RJ y Clarckson JS (1987) Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 81: 459-469.
3. Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham D y Van Duin M (1995) Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci*, 198: 2017-2025.
4. Alberio R, Kubelka M, Zakhartchenko V, Hajdúch M, Wolf E y Motlik J (2000) Activation of bovine oocytes by specific inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Reprod Dev*, 55(4): 422-432.
5. Ali A y Sirard MA (2002) Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol Reprod* 66(4): 901-905.
6. Allani PK, Sum T, Bhansali SG, *et al.* (2004) A comparative study of the effect of oxidative stress on the cytoskeleton in human cortical neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196: 29–36.
7. Antunes F, Boveris A y Cadenas E (2004) On the mechanism and biology of cytochrome oxidase by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 16774-16779.
8. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, *et al.* (2000) The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in-vitro fertilization. *International Journal of Fertility and Women's Medicine*, 45: 314–320.
9. Babior BM, Benna J, Chanock SJ y Smith RB (1997) The NADPH oxidase of leukocytes: the respiratory burst oxidase. In *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidants defenses*. Scandalios JG (ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, North Carolina, USA, 21-48.
10. Baker M y Aitken RJ (2004) The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Molecular Cellular Endocrinology*, 216: 47-54.
11. Baker T (1986) Gametogenesis. En: *Comparative primate biology: reproduction and development*. Alan R ed., Liss Inc, New York, 195-213.

12. Baker T y Hunter R (1978) Oogenesis and follicular growth in the cow: implications for superovulation. En: Control of reproduction in the cow. Screenan J, ed., CEC Publications, Luxemburgo, 34-79.
13. Balaban RS, Nemoto S y Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120: 483-495.
14. Barrett WC, De Gnore JP, Keng YF, Zhang ZY, Yim MB y Chock PB (1999) Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem*, 274(49): 34543-34546.
15. Bane A y Rajakoski E (1961) The bovine estrous cycle. *Cornell Vet*, 51:77-95.
16. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA y Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87(4):1620-1624.
17. Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H y Crow JP (1994) Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods enzymol*, 233:229-240.
18. Beconi MT, Francia CR, Mora NG y Affranchino MA (1993) Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, 40: 841-851.
19. Belenguer P, Caizergues-Ferrer M, Labbe JC, Doree M y Amalric F (1990) Mitosis-specific phosphorylation of nucleolin by p34cdc2 protein kinase. *Mol Cell Biol*, 10(7): 3607-3618.
20. Bellomo G y Mirabelli F (1992) Oxidative stress and cytoskeletal alterations. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 663: 97-109.
21. Bienert GP, Møller AL, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IM, Schjoerring JK y Jahn TP (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem*, 282(2): 1183-1192.
22. Bilodeau S, Fortier M y Sirard M (1993) Effect of adenylate cyclase stimulation on meiotic resumption and cyclic AMP content of zona-free and cumulus-enclosed bovine oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 97:5-11.
23. Blondin P y Sirard MA (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, 41(1): 54-62.

24. Blondin P, Coenen K. y Sirard M (1997) The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *Journal of Andrology*, 18: 454-460.
25. Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C y Minibayeva F (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot*, 53(372): 1367-1376.
26. Boveris A (1998) Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina*, 58(4): 350-356.
27. Boveris A, Cadenas E y Stoppani AO (1976) Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J*, 156(2): 435-544.
28. Boveris A y Cadenas E (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett*, 54: 311-314.
29. Boveris A y Cadenas E (1982) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In "Superoxide dismutase" (Ed L.W. Oberley) pp. 15-30. (CRC Press: Boca Raton, FL.) .
30. Boveris A, Costa LE, Poderoso JJ, Carreras MC y Cadenas E (2000) Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Ann NY Acad Sci*, 899: 121-135.
31. Brown GC y Borutaite V (2006) Interactions between nitric oxide, oxygen, reactive oxygen species and reactive nitrogen species. *Biochem Soc Trans*, 34(5): 953-956.
32. Brown GC y Cooper CE (1994) Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett*, 356: 295-298.
33. Brown NM, Torres AS, Doan PE y O'Halloran TV (2004) Oxygen and the copper chaperone CCS regulate posttranslational activation of Cu, Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 5518-5523.
34. Bu S, Xie H, Tao Y, Wang J y Xia G (2004) Nitric oxide influences the maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes cultured in spontaneous maturation medium and hypoxanthine-supplemented medium through different pathways. *Mol Cell Endocrinol*, 223: 85-93.

35. Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ y Eppig JJ (1990) FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev Biol*, 138(1): 16-25.
36. Buhimschi IA, Kramer WB, Buhimschi CS, Thompson LP y Weiner CP (2000) Reduction-oxidation (redox) state regulation of matrix metalloproteinase activity in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 182: 458-464.
37. Cadenas E (2004) Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med*, 25(1-2): 17-26.
38. Cadenas E, Boveris A, Ragan CI y Stoppani AOM (1997) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 180: 248-257.
39. Cadenas E, Hochstein P, Ernster L (1992) Pro- and antioxidant functions of quinones and quinone reductases in mammalian cells. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 65: 97-146.
40. Calabrese V, Boyd-Kimball D, Scapagnini G y Butterfield DA (2004) Nitric oxide and cellular stress response in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of vitagenes. *In vivo*, 18: 245-267.
41. Calvin HI, Grosshans K, Blake EJ (1986) Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: Relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gamete Res*, 14: 265-275.
42. Campbell K y Swann K (2006) Ca²⁺ oscillations stimulate an ATP increase during fertilization of mouse eggs. *Dev Biol*, 298: 225-233.
43. Carabatsos MJ, Sellitto C, Goodenough DA y Albertini DF (2000) Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Dev Biol*, 226(2): 167-179.
44. Carbone MC, Tatone C, Delle Monache S, Marci R, Caserta D, Colonna R y Amicarelli F (2003) Antioxidant enzymatic defenses in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod*, 9(11): 639-643.
45. Cetica P, Dalvit G y Beconi M (1999) Study of evaluation criteria used for in vitro bovine oocyte selection and maturation. *Biocell*, 23: 125-133.

46. Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC y Beconi MT (2001) Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life*, 51: 57-64.
47. Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC y Beconi MT (2002) Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction*, 124: 675-681.
48. Chance B, Sies H y Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59: 527-605.
49. Cheesman KH (1993) Lipid peroxidation and cancer. In: DNA and free radicals. Halliwell B, Aruoma OI (eds.), Ellis Horwood, Chichester, West Sussex, pp. 109-144.
50. Chen CS y Gee KR (2000) Redox-dependent trafficking of 2,3,4,5,6-pentafluorodihydro-tetramethylrosamine, a novel fluorogenic indicator of cellular oxidative activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 28: 1256-1278.
51. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL y Lesnfsky EJ (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria. *J Biol Chem*, 278: 36027-36031.
52. Chian RC y Sirard MA (1995) Effects of cumulus cells and follicle-stimulating hormone during in vitro maturation on parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, 42(4): 425-431.
53. Chian RC, Tan SL y Sirard MA (1999) Protein phosphorylation in bovine oocytes following fertilisation and parthenogenetic activation in vitro. *Zygote*, 7(2):135-142.
54. Choi WJ, Banerjee J, Falcone T, *et al.* (2007) Oxidative stress and tumor necrosis factor- α -induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure. *Fertility and Sterility*, 88: 1220–1231.
55. Clarke HJ y Masui Y (1983) The induction of reversible and irreversible chromosome decondensation by protein synthesis inhibition during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol*, 97(2): 291-301.
56. Cleeter MWJ, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S y Shapira AHV (1994) Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett*, 345: 50-54.
57. Cohen G (1984) Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology*, 5(1): 77-82.

58. Combelles (2009) Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? *Reprod Biomed Online*, 18(6): 864-880.
59. Cross AR y Jones OT (1986) The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem J*, 237: 111-116.
60. Crow JP (2000) Peroxynitrite scavenging by metalloporphyrins and thiolates. *Free Radic Biol Med*, 28:1487-1494.
61. Cummins JM (2004) The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1: s23-s29.
62. Curnow EC, Ryan J, Saunders D y Hayes ES (2008) Bovine in vitro oocyte maturation as a model for manipulation of the gamma-glutamyl cycle and intraoocyte glutathione. *Reprod Fert Dev*, 20: 579–588.
63. Cuthbertson KS (1983) Parthenogenetic activation of mouse oocytes in vitro with ethanol and benzyl alcohol. *J Exp Zool*, 226(2): 311-314.
64. Dalle-Donne I, Rossi R, Milzani A, *et al.* (2001) The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radical Biology and Medicine*, 31:1624–1632.
65. Dalvit GC, Cetica PD y Beconi MT (1998) Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine in vitro fertilization. *Theriogenology*, 49: 619-627.
66. Dalvit GC, Cetica PD, Pintos LN y Beconi MT (2005) Reactive oxygen species in bovine embryo in vitro production. *Biocell*, 29: 209-212.
67. Dalvit GC, Llanes SP, Descalzo A, Insani M, Beconi M y Cetica P (2005) Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte in vitro maturation. *Reprod Domest Anim*, 40: 93-97.
68. Darley-USmar V, Wiseman H y Halliwell B (1995) Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett*, 369(2): 131-135.
69. Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, *et al.* (2006) Reactive oxygen species level in follicular fluid – embryo quality marker in IVF? *Hum Reprod*, 21: 2403–2407.
70. De La Fuente R (2006) Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Dev Biol*, 292: 1–12.

71. De La Fuente R y Eppig JJ (2001) Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. *Dev Biol*, 229(1): 224-236.
72. de Lamirande E y Gagnon CA (1993) A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl*, 16: 21-25.
73. de Loos F, van Vliet C, van Maurik P y Kruip TA (1989). Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res*, 24(2): 197-204.
74. de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martínez AG y Matkovic M (1996) Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev*, 45: 451-457.
75. de Matos GD, Furnus CC y Moses DF (1997) Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod*, 57: 1420-1425.
76. de Matos GD y Furnus CC (2000) The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*, 53: 761-771.
77. de Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini SR y Thompson JG (2002) Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology*, 57(5): 1443-1451.
78. de Vanterly C, Stutz A, Vassalli JD y Schorderet-Slatkine S (1997) Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocytes is controlled at both translational and posttranslational levels. *Dev Biol*, 187: 43-54.
79. Dharmarajan AM, Hisheh S, Singh B, *et al.* (1999) Antioxidants mimic the ability of chorionic gonadotropin to suppress apoptosis in the rabbit corpus luteum in vitro: a novel role for superoxide dismutase in regulating bax expression. *Endocrinology*, 140: 2555-2561.
80. Dickinson DA y Forman HJ (2002) Glutathione in defense and signalling: lessons from a small thiol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 973: 488-504.
81. Docampo R, Moreno SN y Stoppani AO (1981) Nitrofurantoin enhancement of microsomal electron transport, superoxide anion production and lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 207(2): 316-324.

82. Downs SM (1993) Purine control of mouse oocyte maturation: evidence that nonmetabolized hypoxanthine maintains meiotic arrest. *Mol Reprod Dev*, 35(1): 82-94
83. Downs SM, Coleman DL y Eppig JJ (1986) Maintenance of murine oocyte meiotic arrest: uptake and metabolism of hypoxanthine and adenosine by cumulus cell-enclosed and denuded oocytes. *Dev Biol*, 117(1): 174-183.
84. Downs SM y Eppig JJ (1984) Cyclic adenosine monophosphate and ovarian follicular fluid act synergistically to inhibit mouse oocyte maturation. *Endocrinology*, 114(2): 418-427.
85. Downs SM y Mastropolo AM (1994) The participation of energy substrates in the control of meiotic maturation in murine oocytes. *Dev Biol*, 162: 154-168.
86. Dumollard R, Hammar K, Porterfield M, Smith PJ, Cibert C, Rouviere C y Sardet C (2003) Mitochondrial respiration and Ca²⁺ waves are linked during fertilization and meiosis completion. *Development*, 130: 683-692.
87. Dumollard R, Marangos P, Fitzharris G, Swann K, Duchen M y Carroll J (2004) Sperm-triggered [Ca²⁺] oscillations and Ca²⁺ homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production. *Development*, 131: 3057-3067.
88. Dumollard R, Ward Z, Carroll J y Duchen R (2007) Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo. *Development*, 134: 455-465.
89. Edwards RG (1965) Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208(5008): 349-351.
90. Eichenlaub-Ritter U y Peschke M (2002) Expression in in-vivo and in-vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. *Human Reproduction Update*, 8: 21-41.
91. Eichenlaub-Ritter U, Vogt E, Yin H y Gosden R (2004) Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*, 8: 45-58.
92. El Mouatassim S, Guerin P y Ménézo Y (1999) Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. *Molecular Human Reproduction*, 5: 720-725.

93. Epe B, Ballmaier D, Roussyn I, Briviba K y Sies H (1996) DNA damage by peroxyxynitrite characterized with DNA repair enzymes. *Nucleic Acids Res*, 24: 4105-4110.
94. Epel D (1990) The initiation of development at fertilization. *Cell Diff Dev*, 29:1-12.
95. Eppig JJ (1979) A comparison between oocyte growth in coculture with granulosa cells and oocytes with granulosa cell-oocyte junctional contact maintained in vitro. *J Exp Zool*, 209(2): 345-353.
96. Eppig JJ (2001) Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122(6): 829-838.
97. Erikson B (1966a) Developmental and ratio-response of the prenatal bovine ovary. *J Reprod Fertil*, 10: 97-105.
98. Erickson, B. H. (1966b). Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci*, 25(3): 800-805.
99. Eusebi F y Siracusa G (1983) An electrophysiological study of parthenogenetic activation in mammalian oocytes. *Dev Biol*, 96(2): 386-395.
100. Fair T (2003) Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*, 78: 203–216.
101. Fan HY y Sun QY (2004) Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod*, 70(3): 535-547.
102. Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA y Navarro PA (2009) Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71(5): 836-848.
103. Finkel T (1998) Oxygen radicals and signalling. *Curr Opin Cell Biol*, 10: 248-253.
104. Fleming WN y Saacke RG (1972) Fine structure of the bovine oocyte from the mature graafian follicle. *J Reprod Fertil*, 29(2): 203-213.
105. Foerder CA, Klebanoff SJ y Shapiro BM (1978) Hydrogen peroxide production, chemiluminescence, and the respiratory burst of fertilization: interrelated events in early sea urchin development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75(7): 3183-3187.

106. Foerder CA y Shapiro BM (1977) Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine crosslinks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(10): 4214-4218.
107. Forman J y Torres M (2002) Reactive oxygen species and cell signalling: respiratory burst in macrophages signalling. *Am J Respir Crit Care Med*, 166: S4-S8.
108. Forsberg H, Borg LA, Cagliero E y Eriksson UJ (1996) Altered levels of scavenging enzymes in embryos subjected to a diabetic environment. *Free Radical Research*, 24: 451-459.
109. Fridovich I (1970) Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem*, 245(16): 4053-4057.
110. Funahashi H (2005) Effect of beta-mercaptoethanol during in vitro fertilization procedures on sperm penetration into porcine oocytes and the early development in vitro. *Reproduction*, 130(6): 889-898.
111. Funahashi H, Cantley T, Stumpf T, Terlouw S y Day B (1994) Use of low-salt culture medium for in vitro maturation of porcine oocyte is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in vitro fertilization. *Biol Reprod*, 51: 633-639.
112. Funato Y, Micchiue T, Asashima M y Miki H (2006) The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt-beta-catenin signalling through disheveled. *Nature Cell Biology*, 8: 501-508.
113. Gandolfi TA y Gandolfi F (2001) The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*, 55(6): 1255-1276.
114. Gardiner CS y Reed DJ (1995) Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. *Arch Biochem Biophys*, 318: 30-36.
115. Gardner D (1998) Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*, 49: 83-102.
116. Gardner PR (1997) Superoxide-driven aconitase FE-S center cycling. *Biosci Rep*, 17(1): 33-42.

117. Gary DS (2001) In vitro maturation of oocytes. *Curr Women's Health Rep*, 1: 143-151.
118. Ghafourifar P y Cadenas E (2005) Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci*, 26(4): 190-195.
119. Gilchrist RB, Ritter LJ y Armstrong DT (2004) Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci*, 82: 431-446.
120. Gilchrist RB y Thompson JG (2007) Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology*, 67: 6-15.
121. Gomez E, Rodriguez A, Goyache F, *et al.* (2004) Retinoid-dependent mRNA expression and poly-(A) contents in bovine oocytes meiotically arrested and/or matured in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 69: 101-108.
122. Gonçalves FS, Barretto LSS, Arruda RP, Perri SHV y Mingoti GZ (2010) Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. *Reprod Dom Anim*, 45(1): 129-135.
123. Gordon I (1994) In vitro fertilization. En: *Laboratory production of cattle embryos*, 171-226 (CAB International: Wallingford, UK).
124. Gouge RC, Marshburn P, Gordon BE, Nunley W, y Huet-Hudson YM (1998) Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol Reprod*, 58: 875-879.
125. Graham CF (1970) Parthenogenetic mouse blastocysts. *Nature*, 226(5241): 165-167.
126. Greenwald G y Shyamal R (1994) Follicular development and its control. En: *The physiology of reproduction*. Knobil E, Neill D, eds., Raven Press, Nueva York, 629-724.
127. Greenacre SA e Ischiropoulos H (2001) Tyrosine nitration: localization, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Rad Res*, 34: 541-581.
128. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD y Alexander RW (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 74: 1141-1148.

129. Grupen CG, Mau JC, Mc Ilfatrick SM, Maddocks S y Nottle MB (2002) Effect of 6-dimethylaminopurine on electrically activated in vitro matured porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 62: 387-396.
130. Gutnisky C, Morado S, Dalvit GC, Thompson JG y Cetica PD (2013) Glycolytic pathway activity: effect on IVM and oxidative metabolism of bovine oocytes. *Reproduction Fertility and Development*, 25(7): 1026-1035.
131. Halliwell B y Guteridge JMC (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases: an overview. *Methods Enzymol*, 186: 1-31.
132. Han Z, Vassena R, Chi MMY, Potireddy S, Sutovsky M, Moley KH, Sutovsky P y Latham KE (2008) Role of glucose in cloned mouse embryo development. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 295: E798-E809.
133. Hafez ESE y Hafez B (2002) Fecundación y segmentación. En: *Reproducción e inseminación artificial en animales*, 113-128 (Eds E. S. E. Hafez y B. Hafez). México D.F.: McGraw-Hill.
134. Halliwell B y Gutteridge J (1988) Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. *Hum Toxicol*, 7: 7-13.
135. Hanada A (1985) In vitro fertilization in cattle, with particular reference to sperm capacitation by ionophore A23187. *Jap J Anim prod*, 31: 56-61.
136. Hancock JT, Desikan R y Neill SJ (2001) Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions*, 29: 345-360.
137. Harper KM y Brackett BG (1993) Bovine development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol Reprod*, 48: 409-416.
138. Harvey MB, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, *et al.* (1995) Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture. *Biology of Reproduction*, 53: 532-540.
139. Harvey AJ, Kind KL y Thompson JG (2002) REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction*, 123(4): 479-486.
140. Hashimoto S, Minami N, Yamada M e Imai H (2000) Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental

- competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Mol Reprod Dev*, 56: 520-526.
141. Hattori M y Tabata S (2006) Nitric oxide and ovarian function. *Anim Sci J*, 77: 275-284.
142. Hawkins BJ, Madesh M, Kirkpatrick CJ y Fisher AB (2007) Superoxide flux in endothelial cells via the chloride channel-3 mediates intracellular signaling. *Mol Biol Cell*, 18(6): 2002-2012.
143. Hazeleger NL, Hill DJ, Stubbing RB y Walton JS (1995) Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. *Theriogenology*, 43(2): 509-522.
144. Heales SJ, Davies SE, Bates TE y Clark JB (1995) Depletion of brain glutathione is accompanied by impaired mitochondrial function and decreased N-acetyl aspartate concentration. *Neurochem Res*, 20: 31-38.
145. Heinecke JW y Shapiro BM (1989) Respiratory burst oxidase of fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 1259-1263.
146. Henzler T y Steudle E (2000) Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. *J Exp Bot*, 51(353): 2053-2066.
147. Herrick JR, Brad AM y Krisher RL (2006) Chemical manipulation of glucose metabolism in porcine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation in vitro. *Reproduction*, 131(2): 289-298.
148. Hirao Y, Nagai T, Kubo M, Miyano T, Miyake M y Kato S (1994). In vitro growth and maturation of pig oocytes. *J Reprod Fertil*, 100(2): 333-339.
149. Ho YS, Dey MS, y Crapo JD (1996) Antioxidant enzyme expression in rat lungs during hypoxia. *Am J Physiol*, 270: L810-L818.
150. Holy L (1983) Gametogénesis. Ovogénesis. En: Bases biológicas de la reproducción bovina. Editorial Diana, México DF, 152-174.
151. Hosoe M y Shioya Y (1997) Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. *Zygote*, 5(4): 371-376.
152. Huo LJ, Liang CG, Yu LZ, Zhong ZS, Yang ZM, Fan HY, Chen DY y Sun QY (2005) Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide regulates germinal

- vesicle breakdown and first polar emission in the mouse oocyte. *Reproduction*, 129(4): 403-409.
153. Hsu M, Srinivas B, Kumar J, Subramanian R, y Andersen J (2005) Glutathione depletion resulting in selective mitochondrial complex I inhibition in dopaminergic cells is via an NO-mediated pathway not involving peroxynitrite: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem*, 92: 1091-1103.
154. Hyttel P, Fair T, Callesen H y Greve T (1997) Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47(1): 23-32.
155. Ibanez E, Sanfins A, Combelles CM, *et al.* (2005) Genetic strain variations in the metaphase-II phenotype of mouse oocytes matured in vivo or in vitro. *Reproduction*, 130: 845–855.
156. Ignarro LJ (1999) Nitric oxide: a unique endogenous signalling molecule in vascular biology. *Biosci Rep*, 19: 51-71.
157. Imai S, Johnson FB, Marciniak RA, Mc Vey M, Park PU y Guarente L (2000) Sir2: an NAD-dependent histone deacetylase that connects chromatin silencing, metabolism, and aging. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 65: 297-302.
158. Ingram AJ, James L, Cai L, Thai K, Ly H y Scholey JW (2000) NO inhibits stretch-induced MAPK activity by cytoskeletal disruption. *J Biol Chem*, 275(51): 40301-40306.
159. Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T y Goldschmidt-Clermont PJ (1997) Mitogenic signalling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science*, 275: 1649-1652.
160. Iritani A y Niwa K (1977) Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. *J Reprod Fertil*, 50(1): 119-121.
161. Jablonka-Shariff A, y Olson LM (1998) The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology*, 139: 2944-2954.
162. Jablonka-Shariff A y Olson LM (2000) Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes in vitro. *Mol Reprod Dev*, 55: 412-421.

163. Jiang HS (1991) Studies in the culture of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro. PhD Thesis, National University of Ireland, Dublin.
164. Johnson MH y Nasr-Esfahani MH (1994) Radical solutions and culture problems: could free oxygen-radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? *Bioessays*, 16: 31-38.
165. Josefsberg LB, Galiani D, Dantes A, Amsterdam A y Dekel N (2000) The proteasome is involved in the first metaphase-to-anaphase transition of meiosis in rat oocytes. *Biol Reprod*, 62(5): 1270-1277.
166. Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, Vanbibber MM, Choi SY, De Groat WC y Peterson J (2001) Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 14126-14131.
167. Katoh S, Mitsui Y, Kitani K y Suzuki T (1997) Hyperoxia induces the differentiated neuronal phenotype of PC12 cells by producing reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*, 241(2): 347-351.
168. Kańska-Książkiewicz L, Alm H, Torner H, Heleil B, Tuchscherer A y Ryńska B (2011) Mitochondrial aggregation patterns and activity in in vitro cultures bovine oocytes recovered from early antral ovarian follicles. *Theriogenology*, 75(4): 662-670.
169. Kaufman MH (1973) Parthenogenesis in the mouse. *Nature*, 242(5398): 475-476.
170. Kim JH, Niwa K, Lim JM y Okuda K 1993 Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of in vitro-matured, in vitro-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biology of Reproduction*, 48: 1320-1325.
171. Kissner R, Nauser T, Bugnon P, Lye PG y Koppenol WH (1997) Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem Res Toxicol*, 10: 1285-1292.
172. Knapp LT y Klann E (2000) Superoxide-induced stimulation of protein kinase C via thiol modification and modulation of zinc content. *J Biol Chem*, 275(31): 24136-24145.

173. Knowles RG y Moncada S (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 298: 249-258.
174. Kodaman PH y Behrman HR (2001) Endocrine-regulated and protein kinase C-dependent generation of superoxide by rat preovulatory follicles. *Endocrinology*, 142: 687-693.
175. Kriaucionis S y Heintz N (2009) The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*, 324: 929-930.
176. Krisher RL (2004) The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci*, 82: E14-23.
177. Kruij T, Cran D, Beneden T y Dieleman S (1983) Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. *Gamete research*, 8: 29-47.
178. Kuo RC, Baxter GT, Thompson SH, Stricker SA, Patton C, Bonaventura J y Epel D (2000) NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization. *Nature*, 406: 633-636.
179. Lafleur MVM, Hoorweg JJ, Joenje H, Westmijze EJ y Retel J (1994) The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free Rad Res*, 21: 9-17.
180. Lane L, Maybach JM y Gardner DK (2002) Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. *Hum Reprod*, 17: 2686-2693.
181. Le Bel C, Ischiropoulos H y Bondy S (1992) Evaluation of the probe 2',7' - dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*, 5: 227-231.
182. Leclerc P, de Lamirande E y Gagnon C (1997) Regulation of protein tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen species derivatives. *Free Radic Biol Med*, 22: 643-656.
183. Lequarre AS, Feugang JM, Malhomme O, *et al.* (2001) Expression of Cu/Zn and Mn superoxide dismutases during bovine embryo development: influence of in vitro culture. *Molecular Reproduction and Development*, 58: 45-53.

184. Lequarre AS, Traverso JM, Marchandise J y Donnay I (2004) Poly(A) RNA is reduced by half during bovine oocyte maturation but increases when meiotic arrest is maintained with CDK inhibitors. *Biology of Reproduction*, 71: 425–431.
185. Leyens G, Knoop B y Donnay I (2004a) Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 69: 243–251.
186. Leyens G, Verhaeghe B, Landtmeters M, *et al.* (2004b) Peroxiredoxin 6 is upregulated in bovine oocytes and cumulus cells during in-vitro maturation: role of intercellular communication. *Biology of Reproduction*, 71: 1646–1651.
187. Liang CG, Su YQ, Fan HY, Schatten H y Sun QY (2007) Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol*, 21(9): 2037-2055.
188. Li Y, Feng HL, Cao YJ, *et al.* (2006) Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro. *Fertility and Sterility*, 85: 827-832.
189. Li N, y Karin M (1999) Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *FASEB J*, 13: 1137-1143.
190. Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA y Robinson JP (2003) DPI induces mitochondrial superoxide-mediated apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 34: 465-477.
191. Li Y, Zhu H, Stansbury KH y Trush MA (1997) Role of reactive oxygen species in multistage carcinogenesis. En: *Oxygen radicals and the disease process* (Thomas CE, Kalyanaraman B, eds.), Hardwood Academic Publisher, Amsterdam, pp. 237-278.
192. Lim KT, Jang G, Ko KH, Lee WW, Park HJ, Kim JJ, Lee SH, Hwang WS, Lee BC y Kang SK (2007) Improved in vitro bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology*, 67: 293-302.
193. Link EM y Riley PA (1988) Role of hydrogen peroxide in the cytotoxicity of the xanthine/xanthine oxidase system. *Biochem J*, 249(2): 391-399.

194. Lisdero CL, Carreras MC, Meulemans A, Melani M, Aubier M, Boczkowski J y Poderoso JJ (2004) The mitochondrial interplay of ubiquinol and nitric oxide in endotoxemia. *Methods Enzymol*, 382: 67-81.
195. Liu H, Colavitti R, Rovira II y Finkel T (2005) Redox dependent transcriptional regulation. *Circulation Research*, 97: 967-974.
196. Liu L, Ju JC y Yang X (1998) Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. *Mol Reprod Dev*, 49(3): 298-307.
197. Liu Q y Gross SS (1996) Binding sites of nitric oxide synthases. *Methods Enzymol*, 268: 311-324.
198. Lodde V, Modina S, Galbusera C, Franciosi F y Luciano AM (2007) Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. *Mol Reprod Dev*, 74(6): 740-749.
199. Lonergan P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, *et al.* (2003) Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Molecular Reproduction and Development*, 66: 297–305.
200. Lopes AS, Lane M y Thompson JG (2010) Oxygen consumption and ROS production are increased at the time of fertilization and cell cleavage in bovine zygotes. *Human Reproduction*, 25: 2762-2773.
201. Lowenstein CJ, Dinerman J y Snyder SH (1994) Nitric oxide a physiologic messenger. *Ann Intern Med*, 120: 227-237.
202. Luberda Z (2005) The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol*, 5: 5-17.
203. Luciano AM, Goudet G, Perazzoli F, *et al.* (2006) Glutathione content and glutathione peroxidase expression in in-vivo and in-vitro matured equine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 73: 658-666.
204. Luetjens CM, Bui NT, Sengpiel B, Münstermann G, Poppe M, Krohn AJ, Bauerbach E, Krieglstein J y Prehn JH (2000) Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: cytochrome c release and a secondary increase in superoxide production. *J Neurosci*, 20(5): 5715-5723.

205. Lussier JG, Matton P y Dufour JJ (1987) Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil*, 81(2): 301-307.
206. Luvoni G, Keskinetepe L y Brackett B (1996) Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. *Mol Reprod Dev*, 43: 437-443.
207. Madison V, Avery B y Greve T (1992). Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. *Anim Reprod Sci*, 27(1): 1-11.
208. Majima E, Ikawa K, Takeda M, Hashimoto M, Shinohara Y y Terada H (1995) Translocation of loops regulates transport activity of mitochondrial ADP/ATP carrier deduced from formation of a specific intermolecular disulfide bridge catalyzed by copper-o-phenanthroline. *J Biol Chem*, 270: 29548-29554.
209. Marletta MA (1993) Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem*, 268: 12231-12234.
210. Marshall HE, Merchant K y Stamler JS (2000) Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB J*, 14: 1889-1900.
211. Mehlmann LM (2005) Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, 130: 791-799.
212. Meier B, Cross AR, Hancock JT, Kaup FJ y Jones OTG (1991) Identification of superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem J*, 275: 241-245.
213. Meijer L y Pondaven P (1988) Cyclic activation of histone H1 kinase during sea urchin egg mitotic divisions. *Exp Cell Res*, 174(1): 116-129.
214. Meister A (1983) Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220(4596): 472-477.
215. Meyer M, Schreck R y Bauerle PA (1993) H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J*, 12: 2005-2015.
216. Monaghan P (1993) Studies related to the laboratory production of bovine embryos. PhD Thesis, National University of Ireland, Dublin.

217. Morado S, Cetica P, Beconi M y Dalvit G (2009) Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction Fertility and Development*, 21(4): 608-614.
218. Moses RM y Masui Y (1994) Enhancement of mouse egg activation by the kinase inhibitor, 6-dimethylaminopurine (6-DMAP). *J Exp Zool*, 270(2): 211-218.
219. Motlik J, Alberio R, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Kubelka M y Wolf E (2002) The effect of activation of mammalian oocytes on remodeling of donor nuclei after nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, 4(3): 245-252.
220. Motlik J y Fulka J (1986) Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*, 25: 87-96.
221. Mourot M, Dufort I y Gravel C (2006) The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. *Molecular Reproduction and Development*, 73: 1367–1379.
222. Muller FL, Liu Y y Vam Remmen H (2004) Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, 279: 49064-49073.
223. Muzyamba MC, Speake PF y Gibson JS (2000) Oxidants and regulation of K-Cl cotransport in equine red blood cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279: C981-C989.
224. Nagai T (1987) Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes in vitro with ethanol. *Gamete Res*, 16(3): 243-249.
225. Nakamura Y, Yamagata Y, Sugino N, Takayama H y Kato H (2002) Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biology of Reproduction*, 67: 1588-1592.
226. Nakano M, Kikuyama M, Hasegawa T, Ito K, Sakurai K, Hiraishi K, Hashimura E y Adachi M (1995) The first observation of O₂- generating at real time in vivo from non-kupffer sinusoidal cells in perfused rat liver during acute ethanol intoxication. *FEBS Lett*, 372: 140-143.
227. Nasr-Esfahani M y Johnson M (1991) The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured in vitro. *Development*, 113: 551-560.
228. Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, 6: 3051-3064.

229. Neant I y Guerrier P (1988) 6-Dimethylaminopurine blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity. *Exp Cell Res* 176(1): 68-79.
230. Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD y Hancock JT (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1237-1247.
231. Nelson DL y Cox MM (2008) Lehninger, Principios de Bioquímica. Ediciones Omega, Madrid.
232. O'Flaherty CM, Beorlegui N y Beconi MT (1999) Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology*, 52: 289-301.
233. O'Flaherty C, Breininger E, Beorlegui N y Beconi MT (2005) Acrosome reaction in bovine spermatozoa: role of reactive oxygen species and lactate dehydrogenase C4. *Biochim Biophys Acta*, 1726: 96-101.
234. Oh B, Hwang S, McLaughlin J, *et al.* (2000) Timely translation during the mouse oocyte-to-embryo transition. *Development*, 127: 3795–3803.
235. Okitsu O, Yamano S y Aono T (2001) Activation of bovine oocytes matured in vitro by injection of bovine and human spermatozoa or their cytosolic fractions. *Zygote*, 9: 89-95.
236. Osaki S, Matsumura K, Yamamoto K, Miyano T, Miyake M y Kato S (1997) Fertilization of bovine oocytes grown in vitro. *Reprod Fertil Dev*, 9(8): 781-787.
237. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S y Zhivotovsky B (2007) Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12: 913–922.
238. Palma GA y Brem G (2001) Biotecnología de la reproducción. En: *Biotecnología de la Reproducción* (Ed G. A. Palma). Argentina: INTA.
239. Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK, *et al.* (2004) Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertility and Sterility*, 81: 973–976.
240. Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY y McMaster D (1995) Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clinica Chimica Acta*, 236: 173–180.

241. Perreault SD (1990) Regulation of sperm nuclear reactivation during fertilization. En: Bavister, J Cummins, ERS Roldan (eds): "Fertilization in Mammals". Proceeding of the International Symposium on Fertilization in Mammals. Norwel, MA: Serono Symposia, pp 285-296.
242. Peter M, Nakagawa J, Doree M, Labbe JC y Nigg EA (1990). In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell*, 61(4): 591-602.
243. Petr J, Rajmon R, Rozinek J, Sedmíkova M, Jeseta M, Chmelíkova E, Svetskova D y Jílek F (2005) Activation of pig oocytes using nitric oxide donors. *Mol Reprod Dev*, 71: 115-122.
244. Picton H, Briggs D y Gosden R (1998) The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol*, 145: 27–37.
245. Pietraforte D y Minetti M (1997) One electron oxidation pathway of peroxynitrite decomposition in human blood plasma: evidence for the formation of protein tryptophan-centered radicals. *Biochem J*, 321: 743-750.
246. Pincus G y Enzmann EV (1935) The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in Vivo and in Vitro: I. The Activation of Ovarian Eggs. *J Exp Med*, 62(5): 665-675.
247. Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero CL, Riobó NA, Schöpfer F y Boveris A (1996) Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys*, 328: 85-92.
248. Presicce GA y Yang X (1994) Parthenogenetic development of bovine oocytes matures in vitro for 24 hr and activated by ethanol and cycloheximide. *Mol Reprod Dev*, 38(4): 380-385.
249. Pryor WA y Squadrito GL (1996) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol*, 268: L699-L722.
250. Radi R (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(12): 4003-4008.
251. Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C y Castro L (2002) Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med*, 33(11): 1451-1464.

252. Rahman I, Marwick J y Kirkham P (2004) Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression. *Biochemical Pharmacology*, 68: 1255-1267.
253. Rhee SG, Yang KS, Kang SW, *et al.* (2005) Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxidants and Redox Signaling*, 7: 619–626.
254. Richard FJ (2007) Regulation of meiotic maturation. *J Anim Sci*, 85(13): E4-E6.
255. Richards JS (1994) Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev*, 15(6): 725-751.
256. Riley JC, y Behrman HR (1991) Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med*, 198: 781-791.
257. Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Etkovitz N y Breitbart H (2004) Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction*, 70: 518-522.
258. Romar R y Funahashi H (2006) In-vitro maturation and fertilization of porcine oocytes after a 48 h culture in roscovitine, an inhibitor of p34cdc2/cyclin B kinase. *Animal Reproduction Science*, 92: 321–333.
259. Rubbo H, Radi R, Trijillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M y Freeman BA (1994) Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*, 269: 26066-26075.
260. Ruddock NT, Machaty Z y Prather RS (2000) Intracellular pH increase accompanies parthenogenetic activation of porcine, bovine and murine oocytes. *Reprod Fertil Dev* 12: 201-207.
261. Ruggeri RR, Watanabe Y, Meirelles F, Bressan FF, Frantz N y Bos-Mikich A (2012) The use of parthenotegenetic and IVF bovine blastocysts as a model for the creation of human embryonic stem cells under defined conditions. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29: 1039-1043.

262. Sabatini L, Wilson C, Lower A, *et al.* (1999) Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in-vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 72: 1027–1034.
263. Sanders SA, Eisenthal R y Harrison R (1997) NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase-generation of superoxide anion. *Eur J Biochem*, 245(3): 541-548.
264. Sanfins A, Lee GY, Plancha CE, *et al.* (2003) Distinctions in meiotic spindle structure and assembly during in-vitro and in-vivo maturation of mouse oocytes. *Biology of Reproduction*, 69: 2059–2067.
265. Sanfins A, Plancha CE, Overstrom EW y Albertini DF (2004) Meiotic spindle morphogenesis in in-vivo and in-vitro matured mouse oocytes: insights into the relationship between nuclear and cytoplasmic quality. *Human Reproduction*, 19: 2889–2899.
266. Schreck R, Rieber P y Bauerle PA (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J*, 10: 2247-2258.
267. Schomer B y Epel D (1998) Redox changes during fertilization and maturation of marine invertebrae eggs. *Developmental Biology*, 203: 1-11.
268. Sengoku K, Takuma N, Horikawa M, Tsuchiya K, Komoro H, Sharifa D, Tamate K, e Ishikawa M (2001) Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro. *Mol Reprod Dev*, 58: 262-268.
269. Seyfried J, Soldner F, Schulz JB, Klockgether T, Kovar KA y Wülner U (1999) Differential effects of L-buthionine sulfoximine and ethacrynic acid on glutathione levels and mitochondrial function in PC12 cells. *Neurosci Lett*, 264: 1-4.
270. Shimada M, Mihara T, Kawashima I y Okazaki T (2012) Anti-bacterial factors secreted from cumulus cells of ovulated COCs enhance sperm capacitation during in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol*, 69(2): 168-179.
271. Shiotani M, Noda Y, Narimoto K, Imai K, Mori T, Fujimoto K y Ogawa K (1991) Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the human ovary. *Hum Reprod*, 6(10): 1349-1353.

272. Shirazi A, Nazari H, Ahmadi E, Heidari B y Shams-Esfandabadi N (2009) Effect of culture system on survival rate of vitrified bovine embryos produced in vitro. *Cryobiology*, 59: 285–290.
273. Sies H y Arteel GE (2000) Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics. *Free Radic Biol Med*, 28:1451-1455.
274. Sikka SC (2001) Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current Medicinal Chemistry*, 8: 851-862.
275. Sirard MA (2011) Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. *J Assist Reprod Genet*, 28(6): 483-488.
276. Sirard M y Bilodeau S (1990) Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes in vitro. *Biol Reprod*, 43: 777-783.
277. Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML y First NL (1989) Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod*, 40: 1257-1263.
278. Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML y First NL (1988) The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol Reprod*, 39(3): 546-552.
279. Sirard MA y Coenen K (2006) In vitro maturation and embryo production in cattle. *Methods Mol Biol*, 348: 35-42.
280. Solc P, Schultz RM y Motlik J (2010) Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes: comparison of resumption of meiosis and recovery from G2-arrest in somatic cells. *Mol Hum Reprod*, 16(9): 654-664.
281. Sorensen RA y Wassarman PM (1976). Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol*, 50(2): 531-536.
282. Steinhardt RA, Epel D, Carroll EJ y Yanagimachi R (1974) Is calcium ionophore a universal activator for unfertilized eggs? *Nature*, 252(5478): 41-43.
283. Stice SL, Keefer CL y Matthews L (1994) Bovine nuclear transfer embryos: oocyte activation prior to blastomere fusion. *Mol Reprod Dev*, 38(1): 61-68.
284. Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB y Wolf E (2001) Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation:

- correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod*, 64(3): 904-909.
285. Stuehr DJ, Fasehun OA, Kwon NS, Gross SS, Gonzalez JA, Levi R y Nathan CF (1991) Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. *FASEB J*, 5(1): 98-103.
286. Stuehr DJ y Griffith OW (1992) Mammalian nitric oxide synthase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 65:287-346.
287. Sun QY, Miao YL y Schatten H (2009) Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. *Cell Cycle*, 8(17): 2741-2747.
288. Susko-Parrish JL, Leibfried-Ruthledge ML, Northey DL, Schutzkus V y First NL (1994) Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev Biol*, 166(2): 729-739.
289. Süss U y Stranzinger G (1987). Characterization of in vitro matured and fertilized bovine oocytes. 11-14 Symposium on biotechnology in animal breeding, Japanese Centre, Berlin.
290. Suss U, Wuthrich K y Stranzinger G (1988) Ultrastructure of the intercellular coupling of cumulus cells before and after in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology (Abst)*, 29: 314.
291. Sutton ML, Cetica PD, Beconi MT, Kind KL, Gilchrist RB y Thompson JG (2003) Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction*, 126: 27-34.
292. Szabó C, Ischiropoulos H y Radi R (2007) Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6: 662-680.
293. Szöllösi MS, Borsuk E y Szöllösi D (1994) Relationship between sperm nucleus remodeling and cell cycle progression of fragments of mouse parthenogenotes. *Mol Reprod Dev*, 37(2): 146-156.
294. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L y Rao A (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 324: 930-935.

295. Takahashi M (2012) Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *J Reprod Dev*, 58(1): 1-9.
296. Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N y Okano A (1993) Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol Reprod*, 49: 228-232.
297. Takahashi Y y First NL (1992) In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 37: 963-978.
298. Takami M, Preston SL, Toyloy VA y Behrman HR (1999) Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. *Am J Physiol*, 276: 684-688.
299. Tamassia M, Nuttnick F, May-Panloup P, Reynier P, Heyman Y, Charpigny G, Stojkovic M, Hiendleder S, Renard JP y Chastant-Maillard S (2004) In vitro embryo production efficiency in cattle and its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA, and mitochondrial DNA haplogroup. *Biol Reprod*, 71(2): 697-704.
300. Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Matsuoka A, Yamagata Y, Shimamura K, Morioka H, Ishikawa H, Reiter RJ y Sugino N (2008) Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res*, 44(3): 280-287.
301. Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, *et al.* (2002) Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 61: 414-424.
302. Tao Y, Fu Z, Zhang M, Xia G, Yang J y Xie H (2004) Immunohistochemical localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in porcine ovaries and effects of NO on antrum formation and oocyte meiotic maturation. *Mol Cell Endocrinol*, 222(1-2): 93-103.
303. Tarkowski AK (1966) An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics*, 5: 394-400.
304. Tarkowski AK, Witkowska A y Nowicka J (1970) Experimental parthenogenesis in the mouse. *Nature*, 226(5241): 162-165.

305. Tarazona AM, Rodríguez JI, Restrepo LF y Olivera-Angel M (2006) Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Reprod Dom Anim*, 41: 5-11.
306. Tatemoto H, Ootaki K, Shigeta K y Muto N (2001) Enhancement of developmental competence after in vitro fertilization of porcine oocytes after treatment with ascorbic acid 2-o-alpha glucoside during in vitro maturation. *Biology of Reproduction*, 65: 1800-1806.
307. Tew DG (1993) Inhibition of cytochrome P450 reductase by diphenyliodonium cation. Kinetic analysis and covalent modifications. *Biochemistry*, 32(38): 10209-10215.
308. Thibault C, Szöllösi D y Gerard M (1987) Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev*, 27(5): 865-896.
309. Thomas RE, Thompson JG, Armstrong DT y Gilchrist RB (2004). Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. *Biol Reprod*, 71(4): 1142-1149.
310. Thompson JG (2000) In vitro culture and embryos metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. *Anim Reprod Sci*, 61: 263-275.
311. Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Cox CI y Leese HJ (1996) Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 106: 299-306.
312. Thompson JG, McNaughton C, Gasparinni B, McGowan LT y Tervit HR (2000) Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos. *J Reprod Fertil*, 118: 47-55.
313. Thompson JG (2006) The impact of nutrition of the cumulus oocyte complex and embryo on subsequent development in ruminants. *J Reprod Dev*, 52(1): 169-175.
314. Tilly JL y Tilly KI (1995) Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology*, 136: 242-252.

315. Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, Smith PJ y Keefe DL (2000) Oxidative phosphorylation-dependent and independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod*, 62: 1866- 1874.
316. Trounson A, Anderiesz C y Jones G (2001) Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction*, 121: 51–75.
317. Tsai-Turton M, Nakamura BN y Luderer U (2007) Induction of apoptosis by 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene in cultured preovulatory rat follicles is preceded by a rise in reactive oxygen species and is prevented by glutathione. *Biology of Reproduction*, 77: 442–451.
318. Turrens JF y Boveris A (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J*, 191(1): 421-427.
319. Upreti GC, Jensen K, Munday R, Duganzich DM, Vishwanath R y Smith JF (1998) Studies on aromatic amino acid oxidase activity in rat spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Animal Reproduction Science*, 51: 275-287.
320. Van Blerkom J, Davis P y Alexander S (2000) Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organisation, ATP content and competence. *Hum Reprod*, 15: 2621–2633.
321. Van Camp W, Capiou K, Van Montagu M, Inzé D y Slooten L (1996) Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiol*, 112(4): 1703-1714.
322. Van de Velde A, Liu L, Bols PE, Ysebaert MT y Yang X (1999) Cell allocation and chromosomal complement of parthenogenetic and IVF bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, 54(1): 57-62.
323. Van der Vliet (2008) NADPH oxidases in lung biology and pathology: host defense enzymes, and more. *Free Radic Biol Med*, 44(6): 938-955.
324. Veal EA, Day AM y Morgan BA (2007) Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell*, 26:1–14.
325. Vesce S, Jekabsons MB, Johnson-Caldwell LI y Nicholls DG (2005) Acute glutathione depletion restricts mitochondrial ATP export in cerebellar granule neurons. *J Biol Chem*, 280: 38720-38728.

326. Wang YX, Zheng YM, Abdullaev I y Kotlikoff M (2003) Metabolic inhibition with cyanide induces calcium release in pulmonary artery myocytes and *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284: C378-C388.
327. Wang T y Lessman CA (2002) Isoforms of soluble alpha-tubulin in oocytes and brain of the frog (genus *Rana*): changes during oocyte maturation. *Cell Mol Life Sci* 59, 2216–2223.
328. Ware CB, Barnes FL, Maiki-Laurila M y First NL (1989) Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Res*, 22(3): 265-275.
329. Wassarman P y Albertini D (1994a) The mammalian ovum. En: *The physiology of reproduction*. Knobil E, Neill D, eds., Raven Press, Nueva York, 79-122.
330. Wassarman P y Albertini D (1994b) The mammalian ovum. En: *The physiology of reproduction*. Knobil E, Neill D, eds., Raven Press, Nueva York, 254-261.
331. Wells D, Micika P y Tervit H (1999) Production of clone calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 60: 996-1005.
332. White CR, Patel RP y Darley-Usmar V (1999) Nitric oxide donor generation from reactions of peroxynitrite. *Methods Enzymol*, 301: 288-298.
333. Wiener-Megnazi Z, Vardi L, Lissak A, *et al.* (2004) Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in in-vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 82: 3/1171–3/1176.
334. Wilding M, Dale B, Marino M, di Matteo L, Alviggi C, Pistauro ML, Lombardi L y De Placido G (2001) Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod*, 16(5): 909-917.
335. Wilson DF, Erecinska M y Dutton PL (1974) Thermodynamic relationships in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Annu Rev Biophys Bioeng*, 3: 203-230.
336. Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, Marques CK, Zakhartchenko V, Boiani M, Arand J, Nakano T, Reik W y Walter J (2011) 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nature Communications*, 2: 241.

337. Yamamoto K, Otoi T, Koyama N, Horikita N, Tachikawa S y Miyano T (1999). Development to live young from bovine small oocytes after growth, maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology*, 52(1): 81-89.
338. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW y Oh KS (1998) Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod*, 13: 998-1002.
339. Yu Y, Dumollard R, Rossbach A, Lai FA y Swann K (2010) Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. *J Cell Physiol*, 224(3): 672-680.
340. Zhang Q, Piston DW y Goodman RH (2002) Regulation of corepressor function by nuclear NADH. *Science*, 295: 1895-1897.
341. Zuelke KA, Jones DP y Perreault SD (1997) Glutathione oxidation is associated with altered microtubule function and disrupted fertilization in mature hamster oocytes. *Biol. Reprod*, 57: 1413-1419.

Producción científica de la presente tesis

Artículos originales

"Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro". S. Morado, P. Cetica, M. Beconi and G. Dalvit. *Reproduction, Fertility and Development*, 2009, ISSN 1031-3613, Vol.21, N°4, pág. 608-614.

"Reactive oxygen species production and redox state in parthenogenetic and sperm mediated bovine oocyte activation". S. Morado, P. Cetica, M. Beconi, J. Thompson and G. Dalvit. *Reproduction*, 2013, ISSN 1470-1626, 145, 471-478.

"Reactive oxygen species and redox state during in vitro fertilization". S. Morado. *Austin Journal of In Vitro Fertilization*, 2015, 2(1), 1011-1012. (Editorial)

Resúmenes publicados

"Reactive oxygen species in bovine oocyte in vitro maturation". S. Morado, P. Cetica, M. Beconi and G. Dalvit. *Biocell*, 2006, Vol. 30, Nro. 1, pág. 241.

"Differential reactive oxygen species generation during bovine oocyte in vitro maturation". S. Morado, P. Cetica, M. Beconi and G. Dalvit. *Free Radical Research*, 2006, Vol. 40, Nro. 1, P5-13.

"Reactive oxygen species are required during bovine oocyte in vitro maturation". S. Morado, P. Cetica, M. Beconi and G. Dalvit. *Biocell*, 2007, Vol. 31, Nro. 2, pág. 336.

"Nitric oxide influences reactive oxygen species production and bovine oocyte in vitro maturation". S. Morado, P. Cetica, M. Beconi and G. Dalvit. *Biocell*, 2008, Vol. 32, Nro. 1, pág. 128.

“Effect of Hydrogen Peroxide on bovine oocyte in vitro maturation”. S. Morado, P. Cetica, M. Beconi and G. Dalvit. InVet, 2010, Vol. 12, Nro. 2, pág. 286.

“Relation between bovine oocyte in vitro maturation and modulation of nitric oxide production”. S. Morado, P. Cetica, D. Montagna, M. Beconi and G. Dalvit. Biocell, 2012, Vol. 35, Nro. 3, A298.

“Reactive oxygen species and redox state participation in bovine oocyte activation in vitro”. S. Morado, P. Cetica, D., M. Beconi, J.G. Thompson and G. Dalvit. Invet, 2012, Vol. 14, Nro. 2, pág. 43.

Presentación en reuniones científicas

“Especies reactivas del oxígeno en la maduración de ovocitos bovinos in vitro”. S. Morado, P. Cetica, M. Beconi y G. Dalvit. Póster presentado en: VII Jornadas Multidisciplinarias de la Sociedad Argentina de Biología. Buenos Aires (Argentina), del 14 al 16 de diciembre de 2005.

“Differential reactive oxygen species generation during bovine oocyte in vitro maturation”. S. Morado, P. Cetica, M. Beconi and G. Dalvit. Póster presentado en: 13th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International, Society for Free Radical Research International. Davos (Suiza), del 15 al 19 de agosto de 2006.

“Nitric oxide and reactive oxygen species during bovine oocyte in vitro maturation”. S. Morado, P. Cetica, M. Beconi and G. Dalvit. Póster presentado en: XXXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica, Sociedad Argentina de Biofísica. Rosario (Argentina), del 8 al 10 de noviembre de 2006.

“Las especies reactivas del oxígeno son requeridas en la maduración de ovocitos bovinos in vitro”. S. Morado, P. Cetica, M. Beconi y G. Dalvit. Póster presentado en: VIII Jornadas

Multidisciplinarias de la Sociedad Argentina de Biología. Buenos Aires (Argentina), del 29 de noviembre al 1 de diciembre de 2006.

“El óxido nítrico influye en la producción de especies reactivas del oxígeno y la maduración de ovocitos bovinos in vitro”. S. Morado, P. Cetica, M. Beconi y G. Dalvit. Póster presentado en: I Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. Huerta Grande (Argentina), del 17 al 19 de agosto de 2007.

“Nitric oxide in bovine oocyte in vitro maturation”. S. Morado, P. Cetica, M. Beconi and G. Dalvit. Póster presentado en: V Meeting of The Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, Society for Free Radical Biology and Medicine – South American Group. Montevideo (Uruguay), del 2 al 6 de septiembre de 2007.

“Producción de especies reactivas del oxígeno durante la maduración de ovocitos bovinos in vitro”. S. Morado, P. Cetica, M. Beconi y G. Dalvit. Comunicación breve presentada en: Jornada de Becarios 2010, organizada por la Subsecretaría de Ciencia y Técnica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, 16 de junio de 2010.

“Efecto del peróxido de hidrógeno en la maduración de ovocitos bovinos in vitro”. S. Morado, P. Cetica, M. Beconi and G. Dalvit. Póster presentado en: II Jornadas internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal. Buenos Aires (Argentina), 25 y 26 de noviembre de 2010.

“Efecto del Óxido Nítrico en la Producción de Especies Reactivas del Oxígeno y la maduración in vitro de ovocitos bovinos”. S. Morado y G. Dalvit. Comunicación breve presentada en: Jornada de Investigadores Jóvenes en Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, 17 de junio de 2011.

“Relación entre la maduración in vitro de ovocitos bovinos y la modulación de la producción de óxido nítrico”. S. Morado, P. Cetica, D. Montagna, M. Beconi y G. Dalvit.

Poster presentado en: II Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. San Juan (Argentina), del 17 al 19 de agosto de 2011.

“Participación del óxido nítrico en la producción de especies reactivas del oxígeno durante la maduración in vitro de ovocitos bovinos”. S. Morado, P. Cetica, M. Beconi, G. Dalvit. Poster presentado en: XII Jornadas de Divulgación Técnico Científicas en Ciencias Veterinarias, organizadas por las Facultades de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario, Universidad Nacional del Litoral. Esperanza (Argentina) 16 de septiembre de 2011.

“Reactive oxygen species and redox state during bovine oocyte fertilization in vitro”. S. Morado, P. Cetica, M. Beconi, J. Thompson, G. Dalvit. Poster presentado en: Ovarian Club Meeting. The oocyte: from basic research to clinical practice. Barcelona (España), del 3 al 6 de noviembre de 2011.

“Participación de las especies reactivas del oxígeno y el estado redox en la activación de ovocitos bovinos in vitro”. Morado S., Cetica P.D., Beconi M.T., Thompson J.G., Dalvit G. III Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, 16 de noviembre de 2012.

“Participación del peróxido de hidrógeno y el anión superóxido en la maduración de ovocitos bovinos in vitro”. Morado S., Dalvit, G. III Jornadas de Jóvenes Investigadores en Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, 14 de junio de 2013.

“Hydrogen peroxide and superoxide anion participation in bovine oocyte maturation in vitro”. Morado S., Cetica P., Beconi M., Dalvit G. Ovarian Club III. The inverse pyramid: regulating follicle number and oocyte quality. París (Francia), del 14 al 16 de noviembre de 2013.

“Participación del Glutatión en la producción de especies reactivas del oxígeno durante la maduración de ovocitos bovinos in vitro”. Morado S., Cetica P., Steidel P., Beconi M., Dalvit G. XV Jornadas de la Sociedad Argentina de Biología. Chascomús (Argentina), del 4 al 6 de diciembre de 2013.

Conferencias dictadas

“Generación de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) en la maduración de ovocitos bovinos in vitro y efecto de diferentes moduladores”. Presentación oral en: Seminarios de actualización en investigación, organizados por la Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, 11 de junio de 2008.

“Producción de Especies Reactivas del Oxígeno en la maduración in vitro de ovocitos bovinos”. S. Morado, P. Cetica, M. Beconi y G. Dalvit. Presentación oral en: Seminario cerrado del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, 26 de mayo de 2011.

Premios obtenidos

Accesit al Premio Estímulo a la Investigación Científica en la Categoría Alumnos, otorgado por la Facultad de Ciencias Veterinarias (UBA), Resolución (CD) N° 94/06. Título del trabajo: “Producción de especies reactivas del oxígeno durante la maduración de ovocitos bovinos in vitro”. S. Morado, P. Cetica, M. Beconi y G. Dalvit, correspondiente al año 2005.

Otra producción científica del tesista

Artículos originales

“Glycolytic pathway activity: effect on in vitro maturation and oxidative metabolism of bovine oocyte”. C. Gutnisky, S. Morado, G. Dalvit, J. Thompson and P. Cetica. *Reproduction, Fertility and Development*, 2012, ISSN 1031-3613. doi: 10.1071/RD12193.

“The control of reactive oxygen species influences porcine oocyte in vitro maturation”. G. Alvarez, S. Morado, M. Soto, G. Dalvit and P. Cetica. *Reproduction in Domestic Animals*, 2014. doi: 10.1111/RDA. 12469.

“Study of sperm evaluation parameters to estimate cryopreserved bovine semen fertility”. S. Morado, V. Pereyra, E. Breininger, R. Sara and P. Cetica. *Austin Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, 2015, 2(1), 1005-1009.

Resúmenes publicados

“Effect of AMP on the oxidative metabolism of the bovine oocyte during in vitro maturation”. C. Gutnisky, S. Morado, G. Dalvit, J.G. Thompson and P. Cetica. *Invet*, 2012, Vol. 14, Nro. 2, pág. 37.

Presentación en reuniones científicas

“Influence of gonadotrophins and cysteine on reactive oxygen species production in porcine oocyte maturation in vitro”. S. Morado, G. Álvarez, G. Dalvit and P. Cetica. Póster presentado en: VI Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM). Santiago (Chile), del 27 al 30 de septiembre de 2009.

“Parámetros de Evaluación Espermática para estimar la fertilidad del semen bovino criopreservado. Reporte de caso”. V. Pereyra, S. Morado, E. Breininger, R. Sara y P. Cetica. Poster presentado en: Jornada de Investigadores Jóvenes en Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, 17 de junio de 2011.

“Efecto de factores de crecimiento hematopoyéticos en la maduración in vitro de ovocitos bovinos”. S. Morado, P. Conde, J. Smitz, P. Cetica, T. Gentile. Poster presentado en: II Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina, Sociedad de Biología de Córdoba, Sociedad Argentina de Biología (SAB), Sociedad de Biología de Cuyo, Sociedad de Biología de Rosario, Sociedad de Biología de Tucumán. San Juan (Argentina), del 17 al 19 de agosto de 2011.

“Influence of erythropoietin and Kit ligand on IVM and early embryo development post-IVF in bovine”. P. Conde, S. Morado, J. Smitz, T. Gentile, P. Cetica. Poster presentado en: Ovarian Club Meeting. The oocyte: from basic research to clinical practice. Barcelona (España), del 3 al 6 de noviembre de 2011.

“Cytoplasmic and oxidative activity consequences of glycolysis stimulation in bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation”. C. Gutnisky, S. Morado, G. Dalvit, J. Thompson, P. Cetica. Presentación oral en: “V International Campus course on Diagnostic, Therapeutic and Preservation Techniques in Reproduction”, organizado por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y la Universidad Libre de Bruselas. Lima (Perú), del 30 de enero al 1 de febrero de 2012.

Actividad docente del tesista

Alumno concurrente. Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. Desde 9 de marzo de 2003 hasta 9 de septiembre de 2003.

Ayudante de 2da. "ad honorem". Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. Desde 9 de septiembre de 2003 hasta 12 de octubre de 2004. Resolución (CD) N° 969/03.

Ayudante de 2da. Interino Dedicación Parcial. Desde 12 de octubre de 2004 hasta el 14 de octubre de 2008. Resolución (CD) N° 1655/04. Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

Ayudante de 2da. Regular Dedicación Parcial. Desde 15 de octubre de 2008 hasta el 31 de julio de 2011. Resolución (CD) N° 1723/08. Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

Ayudante de 1ra. Interino Dedicación Semiexclusiva. Desde 1 de agosto de 2011 hasta el 18 de marzo de 2014. Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

Ayudante de 1ra. Por Concurso Dedicación Semiexclusiva. Desde 18 de marzo de 2014 hasta el 1 de abril de 2014. Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

Ayudante de 1ra. Interino Dedicación Exclusiva. Desde 1 de abril de 2014 a la fecha. Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

Actividades de Transferencia y Extensión Universitaria

Proyecto de Voluntariado Universitario del Ministerio de Educación de la Nación: "Acompañamiento de FCV-UBA a alumnos de escuelas secundarias de la zona de influencia de la facultad". Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias. Directoras: Lic. Fabiana Grinsztajn, Dra. Mariana Córdoba.

Capacitación para el laboratorio EMBRYO-GEN, dirigido por el Vet. Álvaro Fernández, Montevideo, Uruguay, del 8 al 12 de noviembre de 2010.

Tareas realizadas: relevamiento y asesoramiento sobre las condiciones generales del laboratorio, preparación de medios de maduración in vitro, técnica de punción y recolección de ovocitos bovinos, preparación de pipetas de recolección y desnudación, maduración in vitro de los ovocitos y evaluación de la maduración por la técnica de Tarkowski.

Proyecto de Voluntariado Universitario: "Integración de conocimientos veterinarios y ampliación del entorno educativo agropecuario con Tecnologías del Aprendizaje y el Conocimiento (TAC)". Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias. Directoras: Lic. Fabiana Grinsztajn, Dra. Mariana Córdoba.

Otro títulos de posgrado obtenidos

Especialista en Docencia Universitaria para Ciencias Veterinarias y Biológicas. Tesina aprobada en febrero de 2015. (Título en trámite)