



UBA BICENTENARIO  
**1810**2010  
DE LA REVOLUCIÓN DE MAYO



Facultad de Ciencias  
**VETERINARIAS**  
Universidad de Buenos Aires

*Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Instituto de Investigación y Tecnología en  
Reproducción Animal (INITRA)  
Cátedra de Química Biológica*

*Reproducción Animal*

**“Estudio del perfil metabólico de los  
complejos ovocito-cumulus porcinos en  
la maduración *in vitro*”**

Autor: Vet. Gabriel Martín Alvarez

Director: Dr. Pablo Daniel Cetica

Año 2010

*A mi familia*

Quisiera expresar mi agradecimiento:

Al Dr. Pablo Cetica, por darme la oportunidad de descubrirme como investigador, por alentarme y fomentar mi desarrollo personal, por su dedicación y paciencia al guiarme en el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Gabriel Dalvit, por la generosidad en la transmisión de sus conocimientos del trabajo de laboratorio y por contribuir con mi formación en el manejo de ovocitos.

A la Dra. María Verónica Achi, por su colaboración en el desarrollo de la fecundación *in vitro* y las sugerencias sobre el trabajo realizado.

A la Lic. Laura Pintos, por su ayuda con las determinaciones experimentales.

Al personal docente y no docente de la Cátedra de Química Biológica, Dra. Martha Beconi, Dra. Mariana Córdoba, Dra. Elizabeth Breininger, Vet. Cynthia Gutnisky, Vet. Sergio Morado, Vet. Matías Tellado, Vet. Sol Perez Aguirreburualde, Vet. Pablo Rodríguez, Vet. Mercedes Satorre, Carolina Vazquez y Hugo Chavez, por la colaboración dentro y fuera del laboratorio.

A la Dra. Carmen Matás Parra, por haberme recibido en su laboratorio del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia para ayudarme con el desarrollo de la fecundación *in vitro*.

Al Vet. Daniel Vazquez y al Frigorífico Porkind, por la desinteresada colaboración para la obtención de los ovarios porcinos.

Al Vet. Manuel Urquiza y al Sr. Claudio García, por su colaboración con el manejo del verraco.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias, por el apoyo académico y material.

A mi familia, por su apoyo incondicional en esta empresa y todas las otras.

## Contenido

|  |    |
|--|----|
| Abreviaturas .....   | 8  |
| Resumen .....  | 10 |
| Summary .....  | 15 |
| Introducción general.....  | 19 |
| La especie porcina y la biotecnología de la reproducción .....   | 20 |
| El ovocito .....   | 22 |
| Ovogénesis .....   | 25 |
| Foliculogénesis .....  | 29 |
| Crecimiento del ovocito .....  | 32 |
| Maduración del ovocito.....  | 34 |
| Gonadotrofinas y maduración del ovocito .....  | 42 |
| Metabolismo .....  | 47 |
| Metabolismo de hidratos de carbono .....   | 49 |
| Metabolismo de aminoácidos .....   | 51 |
| Metabolismo de lípidos .....   | 52 |
| Oxidaciones biológicas y producción de especies reactivas del oxígeno .....                                | 53 |
| Hipótesis.....   | 56 |
| Objetivos.....   | 59 |
| Materiales y métodos generales .....   | 61 |
| Materiales .....   | 62 |
| Recolección y clasificación de los COCs inmaduros .....  | 62 |
| Denudación de los ovocitos .....   | 62 |
| Maduración de los ovocitos <i>in vitro</i> .....   | 63 |
| Fecundación <i>in vitro</i> .....  | 63 |
| Evaluación de la maduración meiótica.....  | 64 |
| Evaluación de la maduración citoplasmática .....   | 64 |
| Análisis estadístico.....  | 65 |
| Capítulo 1 .....   | 66 |
| Evaluación de la calidad de los ovocitos inmaduros y su competencia de maduración <i>in vitro</i><br>..... | 66 |
| Introducción .....   | 67 |
| Materiales y métodos .....   | 68 |
| Evaluación de la vitalidad de los ovocitos inmaduros .....   | 68 |

|  |         |
|--|---------|
| Evaluación del estadio nuclear de los ovocitos inmaduros .....   | 69      |
| Maduración de los ovocitos in vitro .....  | 69      |
| Evaluación de la maduración in vitro .....   | 70      |
| Determinación del número de células del cumulus .....  | 71      |
| Diseño de experimentos y análisis estadístico .....  | 71      |
| Resultados.....  | 74      |
| Recuperación de las distintas clases de COCs inmaduros.....  | 74      |
| Calidad de los ovocitos inmaduros recuperados.....   | 76      |
| Evaluación de la vitalidad de los ovocitos inmaduros en las distintas clases de COCs .....                                 | 76      |
| Evaluación del estadio nuclear de los ovocitos inmaduros en las distintas clases de COCs .....                             | 78      |
| Evaluación simultánea de la vitalidad y el estadio nuclear de los ovocitos inmaduros en las distintas clases de COCs ..... | 79      |
| Competencia de maduración de los ovocitos in vitro .....   | 81      |
| Competencia de maduración nuclear de los ovocitos in vitro.....  | 81      |
| Relación entre la calidad del ovocito inmaduro y la competencia de maduración nuclear in vitro.....                        | 83      |
| Competencia de maduración citoplasmática de los ovocitos in vitro .....  | 84      |
| Relación entre la expansión del cumulus y la maduración de los ovocitos in vitro .....                                     | 86      |
| Tipos de expansión del cumulus.....  | 86      |
| Expansión del cumulus y maduración nuclear de los ovocitos.....  | 87      |
| Expansión del cumulus y maduración citoplasmática de los ovocitos .....  | 88      |
| Efecto de las gonadotrofinas sobre la maduración de los ovocitos in vitro.....   | 89      |
| Efecto de las gonadotrofinas sobre la maduración nuclear de los ovocitos in vitro .....                                    | 89      |
| Efecto de las gonadotrofinas sobre la maduración citoplasmática de los ovocitos in vitro ..                                | 90      |
| Número de células del cumulus en las distintas clases de COCs .....  | 91      |
| Discusión .....  | 92      |
| <br>Capítulo 2 .....   | <br>100 |
| Metabolismo de hidratos de carbono en los complejos ovocito-cumulus durante la maduración in vitro .....                   | 100     |
| Introducción .....   | 101     |
| Materiales y métodos .....   | 103     |
| Maduración de los ovocitos in vitro .....  | 103     |
| Consumo de glucosa y producción de lactato.....  | 104     |
| Evaluación de la vitalidad de los COCs madurados in vitro .....  | 105     |
| Diseño de experimentos y análisis estadístico.....   | 105     |
| Resultados.....  | 108     |
| Influencia de las características del cumulus que rodea al ovocito y de las gonadotrofinas en la vía glucolítica .....     | 108     |
| Consumo de glucosa .....   | 108     |
| Producción de lactato.....   | 109     |
| Correlación entre consumo de glucosa y producción de lactato .....   | 110     |
| Consumo de glucosa y producción de lactato en ovocitos desnudos .....  | 111     |

|  |     |
|--|-----|
| Influencia de reguladores negativos (NaF, ATP) y positivos (AMP) de la vía glucolítica.....                                      | 112 |
| Regulación de la glucólisis con NaF.....   | 112 |
| Consumo de glucosa con NaF.....  | 112 |
| Producción de lactato con NaF.....   | 113 |
| Maduración nuclear con NaF.....  | 114 |
| Vitalidad de los COCs con NaF.....   | 114 |
| Regulación de la glucólisis con ATP.....   | 115 |
| Consumo de glucosa con ATP.....  | 115 |
| Producción de lactato con ATP.....   | 116 |
| Maduración nuclear con ATP.....  | 116 |
| Vitalidad de los COCs con ATP.....   | 117 |
| Regulación de la glucólisis con AMP.....   | 118 |
| Consumo de glucosa con AMP.....  | 118 |
| Producción de lactato con AMP.....   | 118 |
| Maduración nuclear con AMP.....  | 119 |
| Consumo de glucosa con AMP (sin adición de gonadotrofinas).....  | 120 |
| Producción de lactato con AMP (sin adición de gonadotrofinas).....   | 120 |
| Maduración nuclear con AMP (sin adición de gonadotrofinas).....  | 121 |
| Vitalidad de los COCs con AMP (sin adición de gonadotrofinas).....   | 122 |
| Discusión.....   | 123 |
| <br>   |     |
| Capítulo 3.....  | 132 |
| Metabolismo de aminoácidos en los complejos ovocito-cumulus durante la maduración in vitro.....                                  | 132 |
| Introducción.....  | 133 |
| Materiales y métodos.....  | 136 |
| Maduración de los ovocitos in vitro.....   | 136 |
| Producción de amoníaco y determinación de proteínas totales.....   | 136 |
| Correlación entre el número de células del cumulus y el contenido de proteínas del COC.....                                      | 137 |
| Diseño de experimentos y análisis estadístico.....   | 138 |
| Resultados.....  | 140 |
| Influencia de las características del cumulus que rodea al ovocito y de las gonadotrofinas en el metabolismo de aminoácidos..... | 140 |
| Variación en el contenido de proteínas del COC durante la maduración in vitro.....   | 140 |
| Producción de amoníaco durante la maduración in vitro.....   | 141 |
| Correlación entre contenido de proteínas del COC y producción de amoníaco.....   | 142 |
| Variación en el contenido de proteínas y producción de amoníaco por el ovocito denudado durante la maduración in vitro.....      | 143 |
| Correlación entre el número de células del cumulus y el contenido de proteínas del COC.....                                      | 144 |
| Discusión.....   | 145 |
| <br>   |     |
| Capítulo 4.....  | 151 |

|  |         |
|--|---------|
| Metabolismo de los lípidos en los complejos ovocito-cumulus durante la maduración in vitro                                       | 151     |
| Introducción .....   | 152     |
| Materiales y métodos .....   | 154     |
| Maduración de los ovocitos in vitro .....  | 154     |
| Determinación del contenido de lípidos del ovocito .....   | 154     |
| Diseño de experimentos y análisis estadístico .....  | 155     |
| Resultados.....  | 155     |
| Influencia de las características del cumulus que rodea al ovocito y de las gonadotrofinas en el metabolismo de los lípidos..... | 155     |
| Variación en el contenido de lípidos en los ovocitos durante la maduración in vitro .....  | 156     |
| Apreciación del contenido relativo de lípidos del ovocito y el cumulus mediante el fluorocromo Rojo Nilo. ....                   | 157     |
| Discusión .....  | 157     |
| <br>Capítulo 5 .....   | <br>162 |
| Producción de especies reactivas del oxígeno durante la maduración in vitro de los complejos ovocito-cumulus.....                | 162     |
| Introducción .....   | 163     |
| Materiales y métodos .....   | 166     |
| Maduración de los ovocitos in vitro .....  | 166     |
| Producción de ROS .....  | 167     |
| Diseño de experimentos y análisis estadístico.....   | 168     |
| Resultados.....  | 168     |
| Producción de ROS en el ovocito durante la maduración in vitro .....   | 169     |
| Influencia de las características del cumulus y de las gonadotrofinas en la producción de ROS en el ovocito .....                | 169     |
| Efecto de la cisteína sobre la producción de ROS en el ovocito .....   | 170     |
| Efecto de la cisteína sobre la maduración nuclear de los ovocitos in vitro .....   | 171     |
| Efecto de la cisteína sobre la maduración citoplasmática de los ovocitos in vitro .....  | 172     |
| Discusión .....  | 173     |
| <br>Conclusiones generales .....   | <br>178 |
| <br>Consideraciones finales .....  | <br>182 |
| <br>Referencias bibliográficas .....   | <br>189 |
| <br>Anexo 1 .....  | <br>221 |

## Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADP: adenosina difosfato

AMP: adenosina monofosfato

AMPK: proteinquinasa dependiente de AMP lineal

ANOVA: análisis de varianza

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenosina trifosfato

BSA: albúmina sérica bovina

cAMP: adenosina monofosfato cíclico

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

COC: complejo ovocito-cumulus

dbcAMP: dibutilil AMP cíclico

DCHFDA: diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína

DIC: contraste interferencial-diferencial

e<sup>-</sup>: electrón

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGF: factor de crecimiento epidérmico

FAD: flavina adenina dinucleótido (forma oxidada)

FDA: diacetato de fluoresceína

FSH: hormona folículo estimulante

GSH: glutatión (forma reducida)

GSSG: glutatión (forma oxidada)

H<sup>+</sup>: protón

H<sub>2</sub>O: agua

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno

HO<sup>-</sup>: hidroxilo

HO•: radical hidroxilo

LH: hormona luteinizante

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos

MAS: esteroides activadores de la meiosis

MPF: factor promotor de la maduración

mTBM: medio buffer tris modificado

NAD: nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)

NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)

NaF: fluoruro de sodio

NH<sub>3</sub>: amoníaco

NO•: óxido nítrico

O<sub>2</sub>: oxígeno

O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>: anión superóxido

OMI: inhibidor de la maduración del ovocito

PBS: solución buffer de fosfatos

Pi: fósforo inorgánico

PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C

ROS: especies reactivas del oxígeno

Tris: 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol

## **Resumen**

La técnica de producción de embriones porcinos *in vitro* dista de ser óptima. Una de las principales causas es la deficiente maduración del ovocito *in vitro*. El desconocimiento de las variables involucradas en el proceso de maduración incluye al metabolismo del complejo ovocito-cumulus (COC) y a la regulación de su actividad metabólica por acción de las gonadotrofinas. Las características del cumulus que rodea al ovocito inmaduro han demostrado estar relacionadas con la capacidad de maduración del gameto, sin embargo no hay consenso sobre los criterios utilizados para evaluar el cumulus. Además, no se ha considerado la relación de las características del cumulus con la actividad metabólica del COC. El objetivo general del presente trabajo fue estudiar el perfil metabólico de los COCs porcinos durante la maduración *in vitro*. Los objetivos particulares fueron: establecer la calidad de los ovocitos inmaduros, evaluar la maduración *in vitro* en las diferentes categorías de COCs y estudiar el metabolismo de los hidratos de carbono, aminoácidos y lípidos y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) analizando la injerencia del cumulus y de las gonadotrofinas en los patrones metabólicos durante el proceso de maduración.

Los COCs inmaduros fueron clasificados en seis clases dependiendo del tamaño y el aspecto del cumulus que rodea al ovocito (clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C y D). En todas las experiencias realizadas para evaluar la participación del cumulus y de las hormonas en el metabolismo se maduraron COCs pertenecientes a las clases aptas para madurar nuclearmente (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>) en presencia y ausencia de gonadotrofinas. Se determinaron las variaciones en las concentraciones de glucosa, lactato y amoníaco en el medio de maduración del COC, el contenido de proteínas totales del COC, el contenido de lípidos neutros y el nivel de ROS endógenas del ovocito. Además, se evaluó el número de células del cumulus en las diferentes clases y su variación debida al efecto de las gonadotrofinas durante la maduración *in vitro*.

Se observó un mayor porcentaje de ovocitos inmaduros vivos en las clases A, pero igual porcentaje de ovocitos en estadio de vesícula germinal en las clases A, B y C. El porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II luego de la maduración *in vitro* fue similar en las clases A y B, pero el porcentaje de ovocitos con capacidad de madurar citoplasmáticamente resultó superior en la clase A<sub>1</sub>. El número de células que forman el cumulus resultó similar en las clases A, aumentando durante la maduración con gonadotrofinas y disminuyendo al madurar sin estimulación hormonal. En las clases B se halló menor número de células del cumulus y no se apreció variación del mismo durante la maduración independientemente de la presencia de gonadotrofinas. La alta correlación positiva y la relación molar 1:2 entre el consumo de glucosa y la producción de lactato observadas indican que la glucólisis sería el principal destino de la glucosa consumida por el COC porcino durante la maduración *in vitro*. La actividad glucolítica y la producción de amoníaco resultaron mayores en las clases A y se incrementaron por acción de las gonadotrofinas, aunque con mayor intensidad en la clase A<sub>1</sub>. Al analizar de modo simultáneo la actividad de la glucólisis y el estadio nuclear luego del cultivo *in vitro*, no se halló relación entre estos parámetros. La inhibición de la glucólisis con fluoruro de sodio (NaF) y ATP se acompañó con una disminución paralela en el porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II. El AMP no modificó la actividad glucolítica en presencia o ausencia de gonadotrofinas, pero disminuyó el porcentaje de metafase II alcanzado. Se halló mayor contenido de proteínas en los COCs inmaduros de las clases A, el cual no se modificó luego de la maduración sin gonadotrofinas pero se incrementó al suplementar el medio con hormonas. Las clases de COCs evaluadas demostraron tener igual contenido de lípidos y nivel de ROS en el ovocito inmaduro, produciéndose una disminución similar de ambos parámetros en todas las clases luego de la maduración en ausencia o presencia de gonadotrofinas. Además, la adición de cisteína al medio de cultivo ocasionó una mayor disminución en el nivel de ROS de los ovocitos en todas las clases de COCs estudiadas.

Si bien la vitalidad del ovocito inmaduro estaría relacionada con las características del cumulus, el estadio de vesícula germinal sería el factor principalmente vinculado con la maduración nuclear. La maduración meiótica podría completarse independientemente de las características del cumulus en las clases A y B, sin embargo la maduración citoplasmática tendría una dependencia mayor con las características del cumulus que rodea al gameto. La glucólisis y el metabolismo de aminoácidos se desarrollarían principalmente en las células del cumulus. El mayor número de células del cumulus explicaría en parte el mayor contenido de proteínas de los COCs inmaduros pertenecientes a las clases A y les permitiría responder al estímulo gonadotrófico durante la maduración *in vitro* incrementando la intensidad de la vía glucolítica, el catabolismo de aminoácidos y la síntesis de proteínas, sin embargo las particularidades del cumulus clase A<sub>1</sub> conferirían una mayor capacidad de respuesta metabólica a las hormonas. El desarrollo de la actividad glucolítica en las células del cumulus sería independiente del progreso meiótico del ovocito, sin embargo la actividad de la vía sería necesaria para que los ovocitos puedan completar la maduración. El contenido de lípidos y el nivel de ROS del ovocito inmaduro no estarían asociados con el tipo cumulus que rodea al gameto. El consumo de lípidos endógenos y la disminución del nivel de ROS en los ovocitos durante la maduración serían independientes de las características del cumulus y de la estimulación gonadotrófica, por lo tanto el metabolismo del ovocito sería responsable de la regulación de estos aspectos metabólicos sin la participación de las células del cumulus. La adición de cisteína al medio de maduración contribuiría al control de la producción de ROS de los ovocitos durante el cultivo *in vitro* sin estar influido por el tipo de cumulus que rodea al gameto.

En conclusión, los ovocitos rodeados por un cumulus íntegro y oscuro tendrían la mayor competencia de maduración *in vitro*. Las gonadotrofinas mejorarían la maduración de los ovocitos al modular el metabolismo de los hidratos de carbono y de

los aminoácidos en las células del cumulus. La lipólisis y la producción de ROS en el ovocito serían independientes de las características del cumulus que lo rodea y no estarían reguladas hormonalmente.

## **Summary**

The *in vitro* porcine embryo production technique needs to be improved. Inefficient oocyte *in vitro* maturation is one of the main causes of the embryo production failure. The cumulus-oocyte complex (COC) metabolism and its regulation by gonadotropins are relevant aspects that remain unclear. Although immature cumulus features are related to oocyte maturation ability, those features lack clearly defined evaluation criteria. In addition, the relation between cumulus characteristics and COC metabolic activity has not been considered. The main purpose of this work was to evaluate the metabolic profile of porcine COC during *in vitro* maturation. The specific aims were: to establish immature oocyte quality, to evaluate oocyte *in vitro* maturation in each COC class and to study the influence of cumulus and gonadotropins on carbohydrates, amino acids and lipid metabolism and reactive oxygen species (ROS) production during *in vitro* maturation.

Immature COCs were allotted into six different classes (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C and D) according to their size and morphological criteria. COCs able to complete nuclear maturation (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>) were matured with and without gonadotropins to evaluate cumulus and hormonal influence on metabolism. Variations of glucose, lactate and ammonia concentrations in maturation media, amounts of COC protein and oocyte neutral lipid and endogenous ROS levels were measured. In addition, the number of cumulus cells of each COC class and its variation due to the influence of gonadotropins during *in vitro* maturation were evaluated.

Although a higher rate of live immature oocytes was observed in A classes, the percentages of oocytes at germinal vesicle stage were similar between A, B and C classes. The nuclear maturation rates after *in vitro* culture were the same in classes A and B, but cytoplasmic maturation was higher in class A<sub>1</sub>. The number of cumulus cell was the same in both A classes, raising with gonadotropic stimulation during maturation and decreasing during culture without hormones. The cumulus cell number

observed in B classes was lower and showed no variation during culture with or without gonadotropins. Glycolysis would be the main fate of glucose consumption showed by porcine COC during *in vitro* maturation, as suggested by the high positive correlation and molar rate 1:2 observed between glucose consumption and lactate production. Glycolysis and ammonia production were higher in A classes. Both pathways showed increased activity during gonadotropic stimulation and the hormonal effect was more intense in class A<sub>1</sub> COCs. No association was found between the glycolytic activity and the nuclear maturation of oocytes when both aspects were evaluated simultaneously. Sodium fluoride (NaF) and ATP induced glycolysis and nuclear maturation inhibition. AMP showed no effect on glycolytic activity in the presence or absence of gonadotropins, but it diminished metaphase II rate. Protein content of immature COC was higher in A classes. After maturation without gonadotropins no modification was observed, but hormonal stimulation induced a similar raise in the amount of proteins present in both A classes. Equal neutral lipid content and ROS levels were observed in immature oocytes from classes A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. Both parameters showed the same decrease after maturation in the presence or absence of gonadotropins. In addition, culture media supplementation with cysteine induced a greater decrease in ROS levels in oocytes belonging to all evaluated classes.

Immature oocyte vitality would be associated with cumulus features, but germinal vesicle stage seems to be the main factor affecting nuclear maturation. Oocytes from classes A and B could reach metaphase II stage regardless of cumulus characteristics. However cytoplasmic maturation would be closely associated to the surrounding cumulus. Glycolysis and amino acid metabolism mainly take place in cumulus cells. The higher protein content in immature class A COCs could be partly due to their greater cumulus cell number. The increase of glycolysis, amino acid catabolism and protein synthesis in response to gonadotropins would be partly mediated by the higher number of cumulus cells. However class A<sub>1</sub> particularities would

allow a greater metabolic response to hormones. Glycolysis in cumulus cells seems not to be associated with oocyte nuclear progress, but the activity of this pathway would be required for oocytes during *in vitro* maturation to reach metaphase II stage. Lipid content and ROS levels of immature oocytes would not be associated with cumulus features. The lipid consumption and the decrease in ROS levels during *in vitro* oocyte maturation seem to be independent of the surrounding cumulus and gonadotropic stimulation. Thus, oocyte metabolism itself would regulate those aspects without cumulus participation. Cysteine supplementation to culture medium would contribute to diminish ROS production in oocytes during *in vitro* maturation without cumulus influence.

In conclusion, oocytes surrounded by a complete and dense cumulus would be more competent for *in vitro* maturation. Gonadotropic stimulation of carbohydrates and amino acid metabolism in cumulus cells would improve oocyte maturation. Oocyte lipolysis and ROS production would be independent of the surrounding cumulus and gonadotropic regulation.

## **Introducción general**

## La especie porcina y la biotecnología de la reproducción

Respecto a sus características reproductivas la hembra porcina es clasificada como poliéstrica anual o continua (presenta ciclos estrales regulares durante todo el año, con una duración de  $21 \pm 2$  días), politoca (gestación múltiple, de hasta 12 – 14 fetos en cada preñez, con una duración de  $114 \pm 2$  días) y de ovulación espontánea de carácter múltiple (10 – 20 ovocitos en cada ciclo) (Claver y col., 1987; Dantzer y Björkman, 1994; Fuster, 1995; López, 1995; Mazuecos, 1995; Hunter, 2000; Anderson, 2002; Jainudeen y Hafez, 2002). Esta especie es de gran importancia en la producción pecuaria de nuestro país, sin embargo debido al elevado número de crías obtenidas por año naturalmente, la aplicación de biotecnologías de la reproducción para la producción ganadera está limitada a unas pocas prácticas que se caracterizan por su bajo costo económico.

La biotecnología de la reproducción comprende las técnicas que permiten aumentar la eficiencia reproductiva de los animales (Palma y Brem, 2001), abarcando entre otras a la inseminación artificial, refrigeración y congelación de semen, sincronización de celo e inducción de la ovulación, superovulación, transferencia de embriones, congelación de ovocitos y embriones, micromanipulación de embriones para producir mellizos homocigotos y quimeras, selección del sexo de espermatozoides, determinación del sexo de embriones, producción *in vitro* de embriones, inyección intracitoplasmática de espermatozoides y clonado por transferencia nuclear (Niemann y Rath, 2001; Niemann y col., 2003; Palma y Brem, 2001). El estado de desarrollo y particularmente el costo de algunas de estas biotecnologías (producción *in vitro* de embriones, clonado, conservación de embriones) ocasiona que su uso esté restringido en la mayoría de los casos a una reducida población de animales de alto valor genético, con aplicación predominante en países industrializados. A modo de ejemplo, en lo referido a la transferencia de

embriones su mayor aplicación es en la especie bovina, en la cual los costos y el rendimiento lo justifican. En el año 2000 se superó el medio millón de embriones bovinos transferidos en el mundo, mientras que en la especie porcina sólo se llegó a unos pocos miles (Palma y Brem, 2001).

La inseminación artificial es la técnica reproductiva de más amplia aplicación en la especie porcina en países desarrollados. Prácticamente la totalidad de las inseminaciones se realizan con semen refrigerado, quedando el uso de semen congelado limitado a casos muy específicos como la introducción de nuevo material genético en las explotaciones o a tareas de investigación (Johnson y col., 2000). Se ha producido un incremento en la implementación de la inseminación artificial en cerdos debido a las mejoras alcanzadas en las técnicas, principalmente el desarrollo de diluyentes para el almacenamiento a corto o largo plazo de los espermatozoides (Martínez y col., 2005).

A pesar de la intensa investigación en el tema, la producción *in vitro* de embriones porcinos está muy retrasada respecto a la especie bovina, en la cual esta tecnología es utilizada comercialmente (Niemann y Rath, 2001). Además, la transferencia de embriones requiere en el porcino de un procedimiento quirúrgico, por lo que si bien está disponible, no es habitualmente utilizada. En años recientes se ha progresado a nivel mundial en la producción de embriones porcinos *in vitro*, desarrollando las rutinas de maduración y fecundación del ovocito y el cultivo embrionario temprano (Niemann y Rath, 2001; Niemann y col., 2003; Nagai y col., 2006; Kikuchi y col., 2008). Los folículos antrales de ovarios provenientes de cerdas faenadas son la fuente de ovocitos más utilizada para estas técnicas. Estos ovocitos son recuperados como complejos ovocito-cumulus (COCs) inmaduros, los que deben ser madurados *in vitro* mediante el cultivo durante 42 – 48 hs. a 38,5 – 39 °C en medios tales como el 199, NCSU 37 o 23, suplementados con diferentes hormonas (LH, FSH, hCG, PMSG) y/o factores de crecimiento (por ejemplo EGF), fluido folicular, etc. (Niemann y Rath, 2001; Rath, 2001). Incluso se ha conseguido el desarrollo fetal y

nacimientos exitosos luego de implantar los embriones producidos *in vitro* en hembras receptoras (Yoshida y col., 1993b; Machaty y col., 1998; Kikuchi y col., 1999; Kikuchi y col., 2002b; Kikuchi, 2004; Akaki y col., 2009). Sin embargo, las condiciones para la producción de embriones porcinos *in vitro* distan aún de ser óptimas y por lo tanto los resultados obtenidos son difícilmente reproducibles. Los principales problemas a resolver radican en la deficiente maduración del ovocito, la alta proporción de polispermia producida durante la fecundación y el número y calidad de los embriones obtenidos (Abeydeera, 2001; Niemann y Rath, 2001; Abeydeera, 2002).

La investigación sobre la producción de embriones porcinos *in vitro* resulta también de interés fuera del ámbito de la producción pecuaria. El avance de la ingeniería genética ha dado como resultado el desarrollo de tecnologías que permiten realizar modificaciones a nivel del genoma celular. La combinación de la biotecnología de la reproducción y la ingeniería genética tiene la finalidad de obtener animales con órganos potencialmente útiles para la realización de xenotransplantes en medicina humana, sin embargo en este aspecto también es necesario mejorar las técnicas antes de su aplicación en el tratamiento de pacientes (Niemann y Rath, 2001; Niemann y col., 2003; Palma y Brem, 2001).

## **El ovocito**

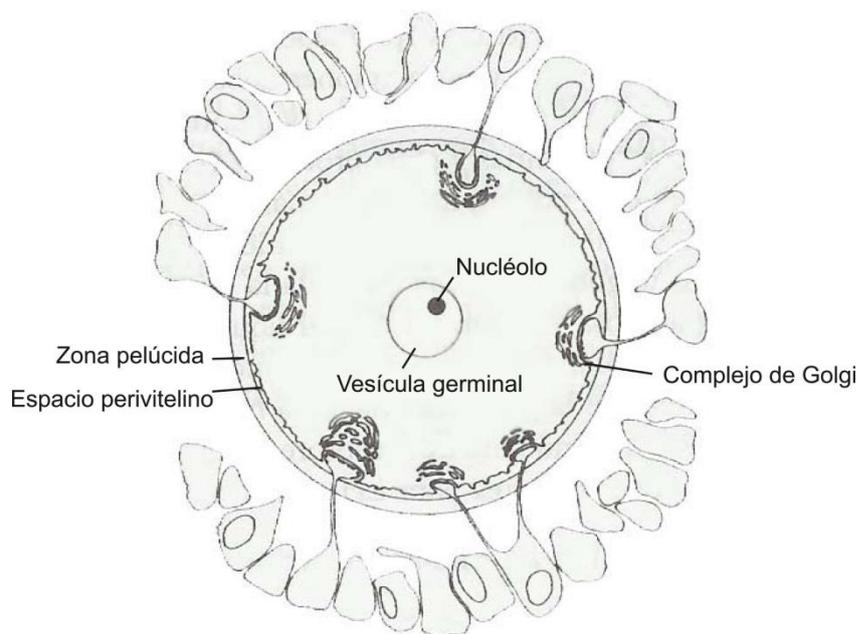
Los gametos son las células encargadas de dar origen a la siguiente generación de organismos con reproducción sexual. Luego de la fusión de los gametos femenino (ovocito) y masculino (espermatozoide) se constituye un nuevo individuo cuya carga genética es única y está formada por mitades provenientes de cada uno de los progenitores. El proceso de fusión de los gametos es conocido como

fecundación, dando como resultado una sola célula llamada cigoto, que se dividirá por sucesivas mitosis en las posteriores etapas embrionaria y fetal (Hafez y Hafez, 2002a).

El ovocito es una de las células de mayor tamaño en los mamíferos, alcanzando en la cerda los 120  $\mu\text{m}$  de diámetro cuando ha completado su crecimiento. La membrana plasmática de los ovocitos de mamíferos está rodeada por una cobertura extracelular especializada llamada zona pelúcida, con un espesor aproximado de 8,6  $\mu\text{m}$  en la especie porcina (Anderson, 2002). Su presencia es esencial para la ovogénesis, la fecundación y el desarrollo embrionario previo a la implantación (Wassarman y Listcher, 2008). Al igual que en otras especies, las glicoproteínas que forman la zona pelúcida del porcino determinan la interacción especie específica entre el ovocito y el espermatozoide en el proceso de fecundación (Yonezawa y col, 2007). La separación existente entre la membrana plasmática del ovocito, u oolema, y la zona pelúcida conforma el denominado espacio perivitelino. El núcleo del ovocito inmaduro, o vesícula germinal, presenta generalmente en el porcino un nucléolo y la cromatina se localiza alrededor de este último en forma de herradura o anillo, aunque más raramente puede disponerse en una conformación filamentosa distribuida en toda el área de la vesícula germinal (Moltik y Fulka, 1976; Funahashi y col., 1997) (**Figura 1**).

Las mitocondrias son una de las organelas más abundantes en los ovocitos, de morfología ovalada o esférica, con matriz densa y pocas crestas (Cran, 1985; Bielanska-Osuchowska, 2006). El retículo endoplasmático liso del ovocito se presenta con dos posibles conformaciones, una vesicular y otra tubular (Bielanska-Osuchowska, 2006). El complejo de Golgi participa activamente en las síntesis de los gránulos corticales del ovocito durante la etapa de crecimiento. Los gránulos corticales son organelas esféricas pequeñas, limitadas por una membrana bien definida, similares a los lisosomas, que se encuentran en la región cortical de los ovocitos que no han sido fecundados. En los mamíferos tienen un diámetro que varía de 0,2  $\mu\text{m}$  a 0,6  $\mu\text{m}$  y particularmente en la especie porcina su diámetro aproximado es de 0,16  $\mu\text{m}$  (Wang y

col., 1997). Estos gránulos se fusionan a la membrana plasmática al momento de la fecundación y liberan su contenido al espacio perivitelino, lo que modifica las propiedades de la zona pelúcida, evitando que la misma sea penetrada por espermatozoides adicionales (proceso denominado “reacción de zona”) (Wassarman, 1988; Yanagimachi, 1988). El citoplasma del ovocito porcino tiene un aspecto oscuro característico debido al alto contenido de lípidos (McEvoy y col., 2000). Estos compuestos forman gotas de un diámetro que oscila entre 1  $\mu\text{m}$  y 4  $\mu\text{m}$  (Cran, 1985; Sturme y col., 2006).



**Figura 1:** Esquema del ovocito inmaduro y su relación histológica con las células foliculares circundantes. Adaptado de Hafez y Hafez, 2002b.

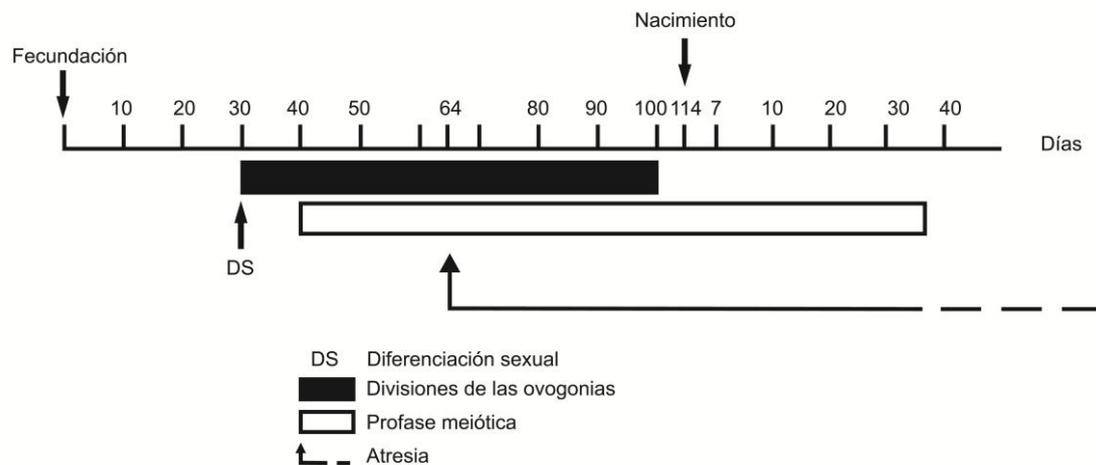
Las diferencias morfológicas y funcionales de los gametos femenino y masculino se deberían a la división fisiológica de la labor entre ambos sexos. Si bien ambos comparten la función de aportar el material genético de los organismos parentales, el cigoto recibe del ovocito una importante reserva de macromoléculas y organelas que soportan los requerimientos nutricionales, sintéticos, energéticos y

regulatorios de las etapas tempranas del desarrollo embrionario. Para ello el ovocito debe prepararse en etapas previas con un marcado crecimiento, acumulación de compuestos y modificación del material genético. Tales condiciones dan origen al concepto que la embriogénesis comienza durante la ovogénesis (Wassarman, 1988).

## **Ovogénesis**

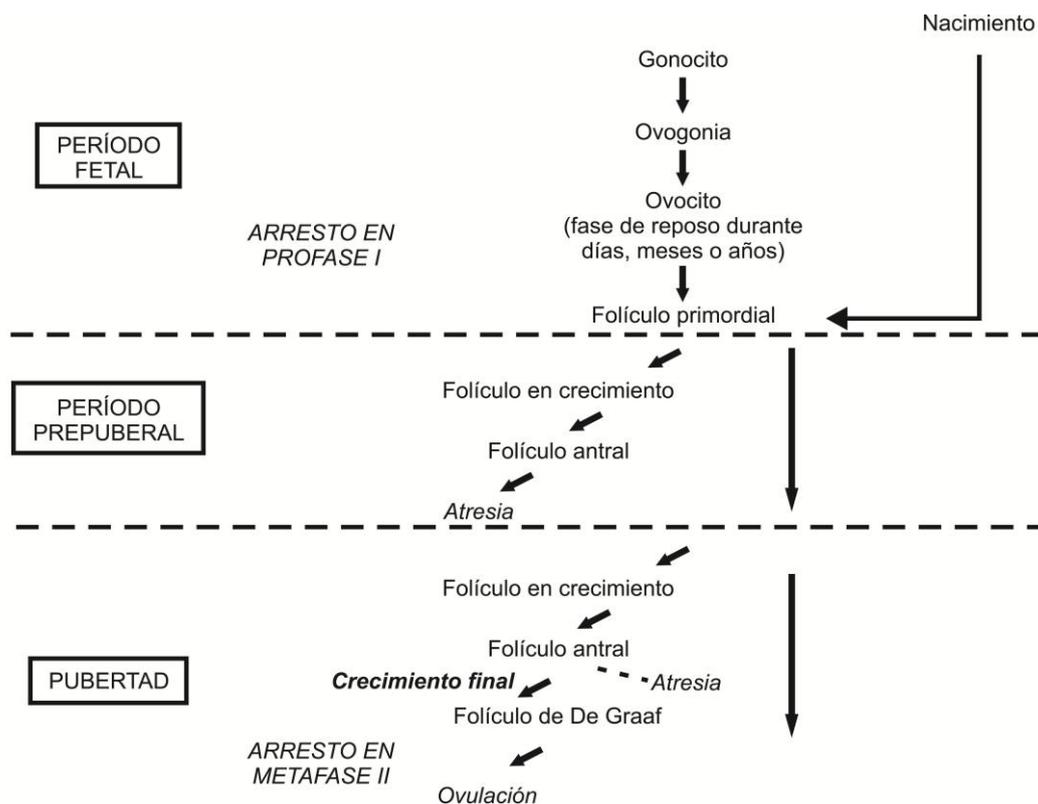
La ovogénesis en mamíferos comienza relativamente temprano en la vida fetal y se prolonga meses o años para finalizar en la etapa de madurez sexual durante la vida adulta del individuo. Las células germinales primordiales se originan a partir de la capa endodérmica de la pared dorsal del saco vitelino en el momento en que se inicia la segmentación somítica. Tales eventos ocurren aproximadamente en el día 14 del desarrollo en la especie porcina (Noden y Lahunta, 1990b). Desde esta posición las células germinales primordiales migrarán para colonizar los cordones sexuales de las crestas gonadales mesentéricas, con origen en el epitelio celómico (Davidson y Stabenfeldt, 1999), multiplicándose a su vez por sucesivas mitosis y aumentando de aproximadamente 5.000 en el día 20 hasta un máximo de 1.100.000 en el día 50 de gestación en la cerda (Hunter, 2000; Anderson, 2002). Las células germinales primordiales se van diferenciando en ovogonias, las que también se multiplican por división mitótica, ocupando su lugar definitivo en la corteza del ovario en formación. En la cerda hacia el día 100 del desarrollo fetal se ha completado la multiplicación de las ovogonias (Anderson, 2002). Durante la gestación se producen muchas más ovogonias que las que han de sobrevivir, pasando desde aproximadamente 1.100.000 ovogonias a los 50 días hasta 500.000 al término de la gestación en la especie porcina (Noden y Lahunta, 1990b; Hunter, 2000). La síntesis de ADN en la etapa de preleptotene en preparación para la meiosis señala la transformación de ovogonias en ovocitos. En la cerda la meiosis comienza alrededor del día 40 del desarrollo fetal, sin

embargo la transformación de ovogonias en ovocitos puede continuar por lo menos hasta el día 35 de vida posnatal (Hunter, 2000; Anderson, 2002) (**Figura 2**).



**Figura 2:** Relación temporal en los patrones de ovogénesis en la cerda. Adaptado de Hafez y Hafez, 2002c.

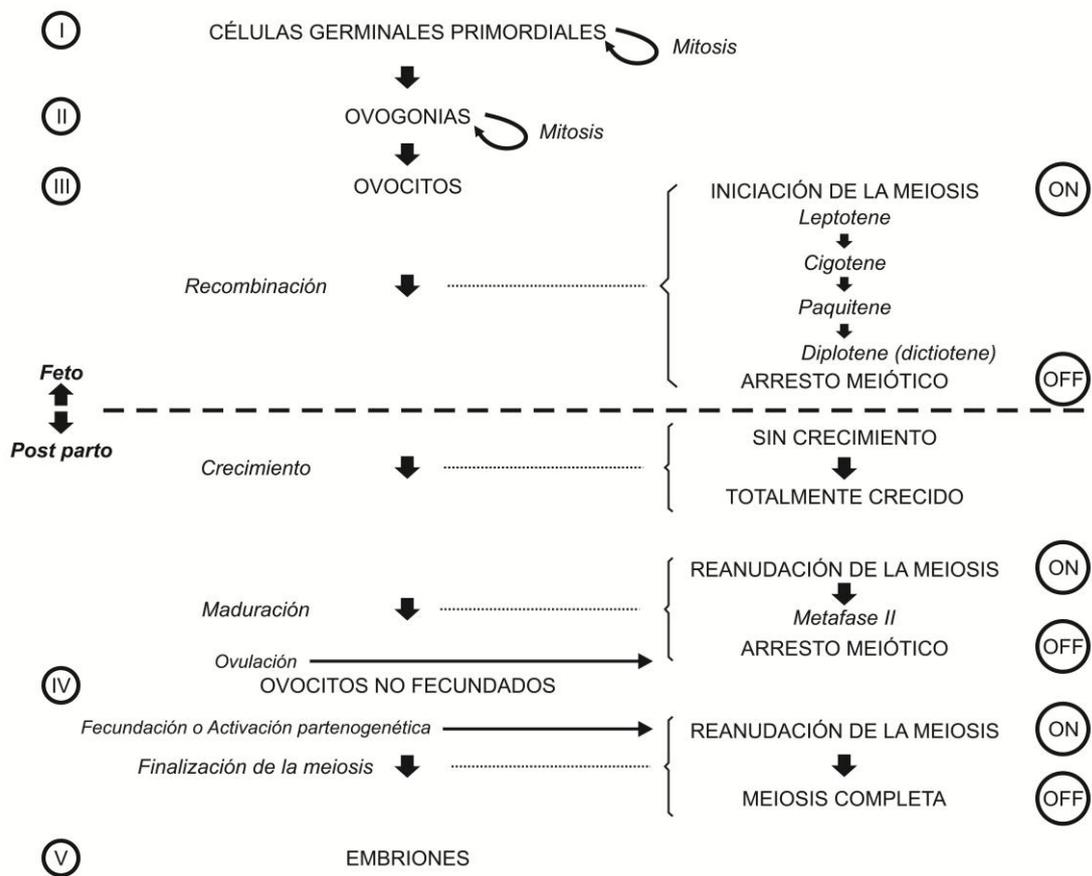
Los ovocitos progresan en la división meiótica hasta detenerse en la etapa de diplotene de la profase I, también denominada dictiotene. Mientras se encuentren en la primera división meiótica se denominarán ovocitos primarios y particularmente durante el período en que mantienen su núcleo arrestado en dictiotene son llamados ovocitos inmaduros. El núcleo de los ovocitos, llamado vesícula germinal, permanece arrestado en este estadio hasta ser estimulado para reanudar la meiosis unas pocas horas antes de la ovulación. Cada ovocito está contenido dentro de una estructura tisular, el folículo. En éste el gameto está rodeado por una capa de células foliculares por fuera de las cuales se organiza una membrana basal. Cuando un folículo primordial es reclutado de la reserva folicular comienza a crecer junto con el ovocito. Al alcanzar la pubertad, los ovocitos totalmente crecidos pueden completar la primera división meiótica dentro de los folículos de De Graaf. En los animales domésticos este evento se produce poco tiempo antes de la ovulación, a excepción de la perra en la que sucede posteriormente (**Figura 3**).



**Figura 3:** Gametogénesis y desarrollo folicular desde la vida fetal hasta la vida sexual activa en la cerda. Adaptado de Hafez y Hafez, 2002c.

Los ovocitos avanzan desde el estadio de dictiotene de la profase I (contenido de ADN  $4c\ 2n$ ) hasta la metafase II (contenido de ADN  $2c\ n$ ) (Wassarman, 1988; Noden y Lahunta, 1990a). El progreso desde la profase I hasta la metafase II es conocido como maduración del ovocito, *in vivo* se produce en los folículos preovulatorios porcinos aproximadamente 36 – 40 hs. luego del pico de gonadotrofinas (Hunter, 2000). Durante la misma se produce la ruptura de la vesícula germinal, la condensación de la cromatina, la separación de los cromosomas homólogos, la citocinesis asimétrica con la emisión del primer corpúsculo polar y el arresto meiótico con los cromosomas en metafase II. Mientras los gametos se encuentren en la segunda división meiótica se denominarán ovocitos secundarios. Particularmente al culminar el proceso de maduración y arrestar el núcleo en metafase II se los llama ovocitos maduros. En esta instancia se producirán en el folículo una serie de cambios

bioquímicos y morfológicos que culminan con la ruptura de la pared folicular y la consiguiente liberación del ovocito, evento denominado ovulación, luego del cual el gameto será recogido por el infundíbulo del oviducto. Los ovocitos permanecerán arrestados en metafase II en el oviducto o en cultivo hasta ser estimulados para completar la meiosis por el espermatozoide en el momento de la fecundación o por activación partenogenética (**Figura 4**). Al momento de completar la meiosis se producirá la separación de las cromátides hermanas y la emisión del segundo corpúsculo polar (contenido de ADN c n) (Wassarman, 1988; Gigli y col., 2006).

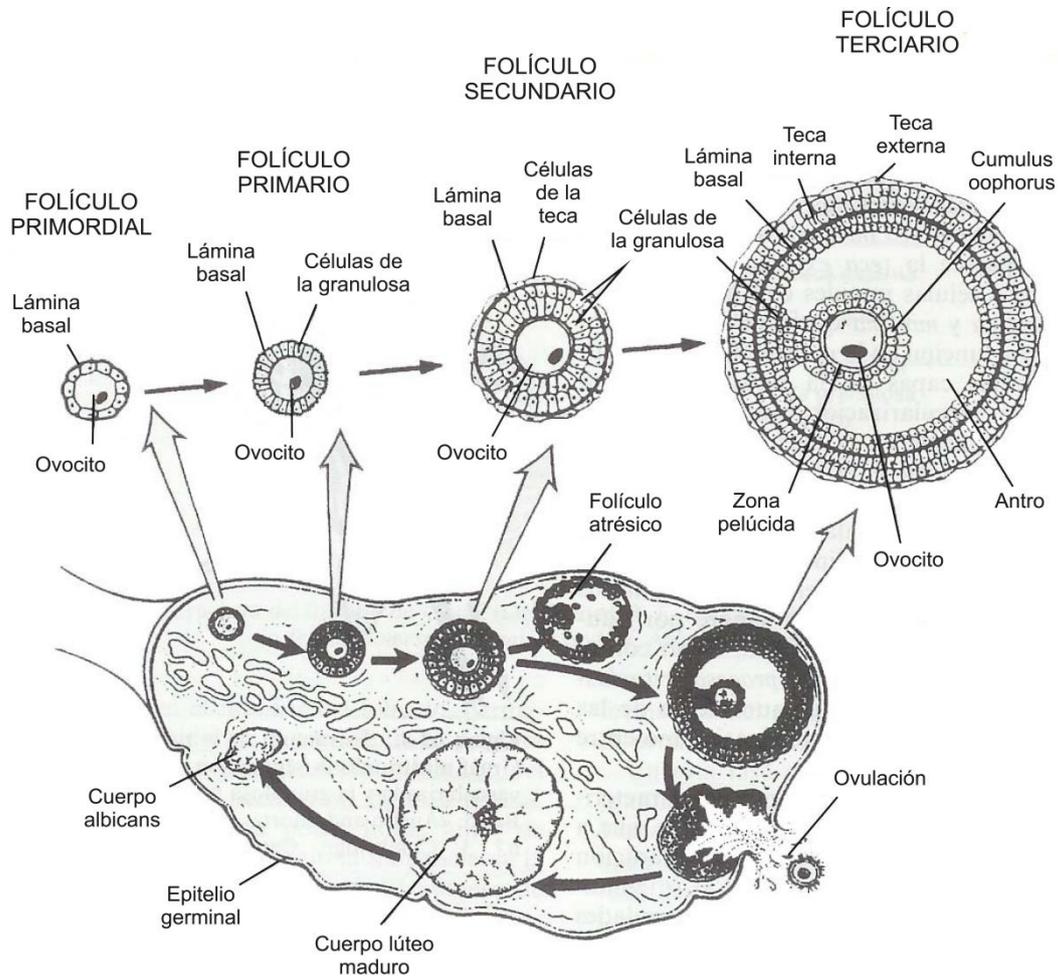


**Figura 4:** Progresión de la ovogénesis y la meiosis en la vida fetal y en la vida sexual activa. Adaptado de Wassarman y Albertini, 1994.

## **Foliculogénesis**

Los folículos se constituyen durante el desarrollo fetal al situarse las ovogonias en las gónadas en formación y rodearse de células foliculares. La foliculogénesis permite obtener un folículo de De Graaf a partir de folículos primordiales. En el momento del nacimiento el ovario posee una gran cantidad de folículos pequeños, de los cuales se calcula que sólo el 1 % llegará a ovular (Claver y col., 1987). En el ovario de la hembra adulta pueden observarse folículos en diversas fases de desarrollo. El folículo primordial se compone de un ovocito (de 27  $\mu\text{m}$  de diámetro aproximadamente) y una capa circundante de células epiteliales planas. La mayor parte de los folículos ováricos son de este tipo y están incluidos en la corteza del ovario, con un diámetro aproximado de 40  $\mu\text{m}$ . En la cerda la población de folículos primordiales alcanza los 500.000 al momento del nacimiento y para la pubertad ese número desciende hasta 420.000 (Hunter, 2000). Cuando el folículo primordial comienza su crecimiento se transforma en folículo primario y se desplaza hacia la profundidad de la corteza ovárica. El ovocito se hace más grande y las células foliculares crecen en altura volviéndose cúbicas. Se comienza a formar la capa glicoproteica que rodea al ovocito, la zona pelúcida, por secreción de ambos tipos de células. En el folículo secundario continúa el crecimiento del ovocito, la zona pelúcida está desarrollada y las células que rodean al gameto proliferan para formar un epitelio de varias capas (células de la granulosa). Además las células del estroma circundante, separadas por la membrana basal, se ordenan en una capa concéntrica para formar la teca folicular. En el folículo terciario el ovocito prácticamente ha completado su crecimiento, la capa celular de la granulosa sigue con su proliferación y se forman pequeñas zonas llenas de líquido folicular. Estas zonas aumentan de tamaño y se unen formando un espacio único, el antro folicular. El ovocito adquiere gradualmente una disposición excéntrica quedando rodeado por células de la granulosa que forman el *cumulus oophorus* (las células que rodean inmediatamente al ovocito presentan una

disposición radial, denominándose *corona radiata*). La teca folicular se diferencia en una teca interna y otra externa (**Figura 5**).

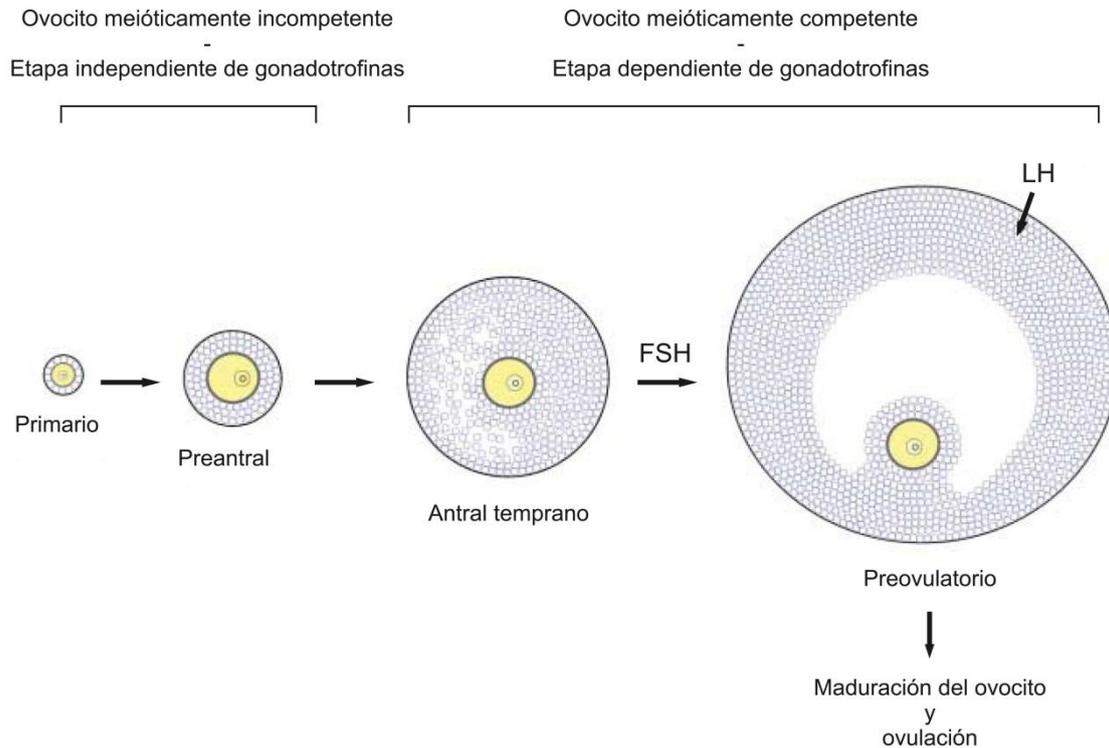


**Figura 5:** Esquema de la estructura del ovario y las diferentes fases en el desarrollo del folículo, cuerpo lúteo y cuerpo albicans. Adaptado de Mazuecos, 1995.

El folículo de De Graaf tiene características estructurales muy similares al folículo terciario pero con mayor volumen de fluido folicular, alcanzando en la cerva el tamaño preovulatorio de 8 – 11 mm de diámetro (Geneser, 1990; Priedkalns, 1994; Davidson y Stabenfeldt, 1999; Anderson, 2002). En el folículo de De Graaf el ovocito experimenta el proceso de maduración poco tiempo antes la ovulación. El período desde el inicio del crecimiento del folículo primordial hasta alcanzar el estadio de

folículo preovulatorio demora tres meses en el porcino (Miyano, 2003). Más precisamente, se ha estimado que el tiempo requerido en la cerda para desarrollar desde folículo primordial hasta folículo antral es de 84 días, y que son requeridos 19 días adicionales para alcanzar el estadio preovulatorio (Hunter, 2000).

En la etapa perinatal todos los ovocitos se encuentran arrestados en dictiotene, debido a que las ovogonias y los ovocitos que no llegaron a este estadio desaparecen por la atresia prediploténica que ocurre en los mamíferos generalmente antes del nacimiento o hasta poco tiempo luego del mismo (Baker, 1986). No se conoce con certeza el motivo por el cual algunos folículos primordiales son reclutados y comienzan el desarrollo folicular y el crecimiento del ovocito primario. Sin embargo, ha sido sugerido que los folículos primordiales de ratón no requerirían de ningún factor para iniciar su desarrollo. Por el contrario, los folículos primordiales y primarios bovinos requerirían de la estimulación con algún factor externo para iniciar el crecimiento, mientras que los folículos secundarios podrían desarrollarse hasta el estadio antral sin ninguna estimulación (Miyano, 2003). Cuando estos procesos se producen en la etapa fetal y prepuberal en los mamíferos, los folículos reclutados se atresian. El crecimiento del folículo hasta la etapa de formación temprana del antro no depende de gonadotrofinas. Por otro lado, el desarrollo del antro y el crecimiento final dependen de FSH y LH (Hafez y Hafez, 2002b) (**Figura 6**). A partir de la pubertad, cuando se produce un aumento significativo en la concentración de gonadotrofinas, sólo una porción de los folículos reclutados desarrollan hasta folículos de De Graaf y los restantes se atresian.



**Figura 6:** Desarrollo del folículo ovárico en mamíferos. Los ovocitos en los folículos primario y preantral son meióticamente incompetentes y no pueden madurar espontáneamente al ser removidos del folículo. En el estadio antral temprano, los ovocitos adquieren la competencia meiótica y pueden madurar al ser aislados del folículo. En este estadio los folículos son reclutados para el crecimiento por la FSH. El pico de LH estimula la reanudación de la meiosis en el ovocito y la posterior ovulación. Adaptado de Mehlmann, 2005.

## Crecimiento del ovocito

El crecimiento de los ovocitos en mamíferos se produce en dos fases diferentes. En la primera, el desarrollo del folículo y del ovocito son conjuntos y se correlacionan de forma positiva y lineal. En la segunda, el tamaño del ovocito se mantiene casi constante a pesar de continuar el incremento del diámetro folicular de modo substancial. El ovocito no adquiere la capacidad de completar la primera división meiótica hasta estar su crecimiento casi completo. Los ovocitos porcinos crecen desde un tamaño inicial de 30  $\mu\text{m}$  (sin incluir la zona pelúcida) hasta un tamaño final de 120 – 125  $\mu\text{m}$  (Miyano, 2003), estando casi completo el crecimiento del gameto (115  $\mu\text{m}$ ) en los folículos de 1,8 mm de diámetro (Hunter, 2000) (**Figura 7**).



**Figura 7:** Crecimiento del ovocito y del folículo y adquisición de la competencia meiótica en cerdos. Hunter, 2000.

Durante la etapa de crecimiento el tamaño del ovocito se incrementa, indicando que se trata de un período con intensa actividad metabólica. Se observa la aparición de nuevas estructuras como la zona pelúcida y los gránulos corticales. La vesícula germinal del ovocito aumenta su volumen, el nucléolo también incrementa su tamaño y se acompaña de cambios en su estructura. El contenido de ARN y los niveles de ARN polimerasa se elevan considerablemente durante el crecimiento de los ovocitos. El elevado contenido de ARN mensajero del gameto puede atribuirse tanto a la intensa síntesis como a la inusual estabilidad conferida por la poliadenilación. La síntesis de proteínas aumenta drásticamente, abarcando en el proceso proteínas estructurales, con funciones regulatorias y diversas enzimas. Sin embargo, el nivel de síntesis proteica no se corresponde con la abundancia de ARN mensajero, por lo que la regulación postranscripcional sería determinante en los ovocitos. Si bien la síntesis de proteínas se incrementa en esta etapa, el aumento de tamaño del gameto es comparativamente mayor. Durante el período de crecimiento las mitocondrias se encuentran íntimamente asociadas al retículo endoplasmático liso, su número aumenta y además se producen cambios en la ultraestructura de las mismas. Las membranas del complejo de Golgi se vuelven más activas en las etapas tempranas del crecimiento del ovocito. Se observan cambios indicativos de la participación del

complejo de Golgi en el procesamiento de productos de secreción (como las glicoproteínas de la zona pelúcida) y la formación de los gránulos corticales. El material que forma la zona pelúcida aparece inicialmente como parches entre el ovocito y las células foliculares. Al progresar el crecimiento del ovocito la zona pelúcida se vuelve más densa y cubre al gameto completamente, separándolo de las células foliculares que lo rodean. Sin embargo el contacto entre el ovocito y las células foliculares se mantiene gracias a prolongaciones citoplasmáticas de éstas últimas que atraviesan la zona pelúcida y contactan al oolema mediante uniones comunicantes de tipo GAP (**Figura 1**). Cuando la etapa de crecimiento ha finalizado, los ovocitos primarios arrestados en dictiotene son capaces de reanudar la meiosis previo a la ovulación en cada ciclo estral (Wassarman, 1988).

### ***Maduración del ovocito***

Durante la maduración del ovocito en mamíferos ocurren profundos cambios que preparan al gameto femenino para la fecundación y el posterior desarrollo embrionario. La maduración del ovocito *in vivo* se produce en respuesta al aumento preovulatorio de gonadotrofinas (FSH y LH) en aquellos gametos que han completado su crecimiento. Por otra parte, los ovocitos son capaces de continuar la maduración meiótica durante el cultivo *in vitro* al ser retirados del entorno del folículo, incluso en ausencia de gonadotrofinas. El ovocito debe ser competente en primer lugar para poder madurar y en segundo lugar para poder sostener el desarrollo temprano del embrión. El proceso de maduración implica eventos nucleares y citoplasmáticos. Se supone que la incompetencia en la maduración del ovocito depende tanto de la inmadurez nuclear como de la citoplasmática (Motlik y col., 1984; Moor y col., 1990). La maduración nuclear involucra el progreso de la meiosis desde el estadio de dictiotene hasta metafase II, completando la primera división meiótica con la emisión

del primer corpúsculo polar (Wassarman, 1988). La maduración citoplasmática involucra diversos procesos que confieren al ovocito la capacidad de sustentar adecuadamente el proceso de fecundación y las primeras etapas del desarrollo embrionario (Eppig, 1996; Abeydeera, 2002). Un ovocito se considera competente para el desarrollo cuando es capaz de alcanzar el estadio de blastocisto. El desarrollo embrionario depende en gran medida de eventos que ocurren durante la maduración; esto se debe a que el ovocito no sólo aporta el material genético para el futuro embrión, sino que su citoplasma suministra organelas y macromoléculas comprometidas en la fecundación y en los primeros estadios de la embriogénesis (Wassarman y Albertini, 1994; Krisher y Bavister, 1998). Si bien los ovocitos que han alcanzado el estadio de metafase II son considerados maduros, sólo aquellos que hayan completado también la maduración citoplasmática pueden mantener el desarrollo luego de la fecundación (Eppig, 1996; Abeydeera, 2002).

Durante el crecimiento del ovocito se adquiere la competencia meiótica, o sea la capacidad de completar la meiosis I o reduccional. La adquisición de tal competencia se produce en dos etapas, en la primera los ovocitos en crecimiento son capaces de romper la envoltura nuclear y avanzar hasta la metafase I, y en la segunda se vuelven capaces de avanzar desde la metafase I hasta la metafase II. Los folículos antrales tempranos bovinos y porcinos (1,0 – 1,5 mm de diámetro) contienen ovocitos de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, los que han adquirido parcialmente la competencia meiótica. Éstos pueden sufrir la ruptura de la vesícula germinal y alcanzar la metafase I, pero no pueden completar la maduración hasta la metafase II (Miyano, 2003). La ruptura de la vesícula germinal se produce luego de algunas horas de cultivo; en el ovocito porcino ocurre entre las 17 y las 26 hs. aproximadamente. Comienza con la formación de ondulaciones en la membrana que luego se disgrega para unirse al retículo endoplasmático, lo que se acompaña con la desaparición del nucléolo al contactar con el contenido citoplasmático. La condensación de los cromosomas se produce en asociación con el lado interno de la envoltura nuclear al

tiempo que ésta se ondula. Al alcanzar el estado de condensación máxima, los cromosomas se separan de la membrana nuclear fraccionada y se agrupan en forma circular en el centro del ovocito, para luego alinearse en el ecuador con los husos meióticos en la metafase I. Este evento se concreta entre las 26 y las 31 hs. de cultivo en el porcino. Al progresar la anafase I, entre las 31 y las 33 hs. de maduración *in vitro*, los cromosomas homólogos se desplazan hacia los extremos opuestos del huso meiótico. La separación de los cromosomas se produce con una división asimétrica del citoplasma del ovocito en la telofase I tardía, dando como resultado la emisión del primer corpúsculo polar con la mitad del complemento cromosómico original y algunas pocas organelas, aproximadamente entre las 33 y las 34 hs. de cultivo. Si bien unos pocos ovocitos pueden encontrarse en estadio de metafase II a partir de las 34 hs., la mayoría lo hacen entre las 44 y las 48 hs. de maduración (Wassarman, 1988; Ocampo y col., 1991). Los cromosomas del corpúsculo polar en general comienzan a degenerar en la telofase I tardía, y aunque en algunas ocasiones el corpúsculo polar completa la segunda división meiótica, finalmente degenera (Claver y col., 1987; Curtis y Barnes, 2000a).

En forma paralela a la maduración nuclear, se desarrolla en el ovocito la maduración citoplasmática. Durante la misma se produce una redistribución de las distintas organelas del gameto, como las mitocondrias y los gránulos corticales. En el proceso de maduración las mitocondrias migran hacia una posición más interna en el ovocito porcino (Sturmey y col., 2006; Brevini y col., 2007). Por otro lado, se produce la migración centrífuga de los gránulos corticales alineándose por debajo de la membrana plasmática, formando una monocapa en los primeros 4  $\mu\text{m}$  del citoplasma cortical (Cran, 1985; Yoshida y col., 1993a). Las gotas de lípidos distribuidas en el citoplasma del ovocito varían en estructura y diámetro al progresar la maduración del gameto (Cran, 1985; Sturmey y col., 2006). Luego de la ruptura de la vesícula germinal la síntesis de ARN es muy escasa. Al combinarse el material nuclear con el citoplasmático se produce la interrupción de la síntesis de ARN ribosomal. Además la

mitad del ARN poliadenilado acumulado durante el crecimiento del ovocito es degradado o desadenilado. La síntesis total de proteínas en los ovocitos también disminuye en comparación a la etapa de crecimiento, acompañando los cambios en la síntesis de ARN (Wassarman, 1988). Sin embargo, se produce una reprogramación de la síntesis proteica, ocurriendo la transcripción de parte del ARN mensajero almacenado durante la fase de crecimiento del ovocito. Se sintetizan proteínas esenciales para la progresión de la meiosis, la descondensación de la cabeza del espermatozoide, la formación del pronúcleo masculino (factor de crecimiento del pronúcleo masculino) (Moor y col., 1990) y el desarrollo embrionario luego de la fecundación (Eppig, 1996). Se produce también el aumento en el contenido de glutatión del ovocito, el cual estaría relacionado con la capacidad de formación de pronúcleos y la adquisición de la competencia de desarrollo (Sawai y col., 1997; Yamahuchi y Nagai, 1999; Maedomari y col., 2007).

Los cambios en el compartimiento citoplasmático durante la maduración incluyen variaciones en el contenido de ATP junto a la relocalización de las mitocondrias, lo que podría estar relacionado con la adecuada distribución de la energía en el ooplasma. Las modificaciones en la red citoplasmática de microtúbulos que se producen durante la maduración actuarían dirigiendo esta relocalización, permitiendo el transporte y anclaje de los componentes celulares a sitios específicos (Brevini y col., 2007). Las vías metabólicas utilizadas por el ovocito para obtener energía y diversos productos necesarios para la regulación de la maduración varían durante la misma, siendo crucial la actividad apropiada de las diferentes vías para completar la maduración citoplasmática (Krisher y col., 2007).

Durante el proceso de maduración del ovocito ocurre también la expansión del cumulus y su separación del gameto. La hormona FSH y los factores de crecimiento estimularían la síntesis de ácido hialurónico, glicosaminoglicanos y glicoproteínas por las células del cumulus con su consecuente dispersión, produciéndose además una compleja reorganización del citoesqueleto de estas células y del citoplasma cortical del

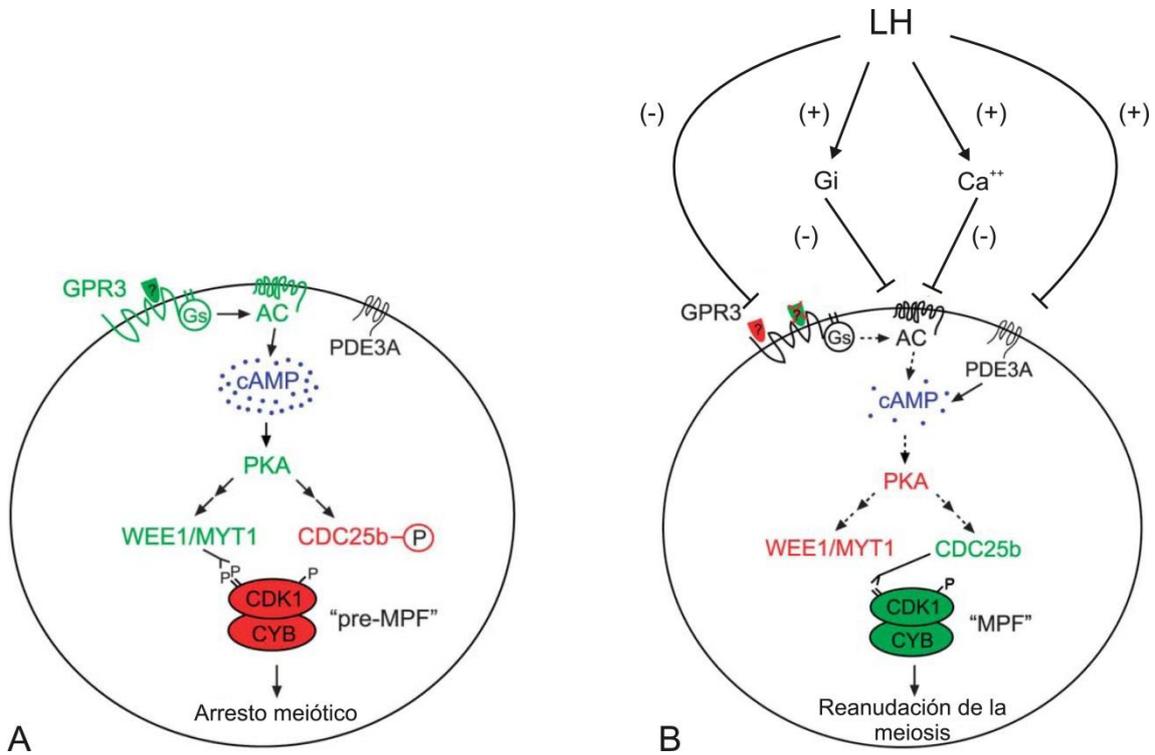
ovocito (Allworth y Albertini, 1992; 1993; Sutovsky y col., 1993). Aunque se evidencia la separación de las células del cumulus entre sí, se mantiene la interconexión entre ellas. En el bovino la expansión del cumulus se observa a partir de las 9 – 12 hs. y es total a las 24 hs., mientras que en el porcino resulta claramente distinguible a partir de las 22 – 30 hs. (Algriany y col., 2004; Somfai y col., 2004). Durante la expansión se va produciendo una paulatina pérdida de las uniones tipo GAP entre el ovocito y las células del cumulus. Si bien esta pérdida fue correlacionada con la reanudación de la meiosis en roedores (Larsen y col., 1986), en el bovino las uniones comienzan a desaparecer paulatinamente entre las 6 – 9 hs. y permanecen funcionales hasta el estadio de metafase II. Se postula que este contacto prolongado durante la maduración es necesario para mantener el adecuado acoplamiento eléctrico, el transporte de moléculas reguladoras y/o el aporte de nutrientes al ovocito bovino (Sutovsky y col., 1993), observándose mayor porcentaje de maduración en los COCs que mantienen el acoplamiento ovocito-corona y demostrando la importancia de las células del cumulus en esta etapa (de Loos y col., 1989; 1991; Laurincik y col., 1992).

La maduración meiótica *in vitro* puede ser inhibida por múltiples compuestos. La ruptura de la vesícula germinal es inhibida por dibutilil adenosina monofosfato cíclico (dbcAMP) y por agentes que aumenten los niveles intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), ya sea por inhibición de la fosfodiesterasa o por activación de la adenilatociclasa. Se ha identificado una adenilatociclasa de membrana en el ovocito y se ha demostrado su regulación por calmodulina. Tanto *in vivo* como *in vitro* la concentración de cAMP en los ovocitos disminuye previo a la ruptura de la vesícula germinal, actuando como señal para continuar con el progreso de la meiosis. Este compuesto regula la actividad de la proteína quinasa A (PKA), tetrámero formado por dos subunidades regulatorias (con capacidad de unir cAMP) y dos subunidades catalíticas (con actividad quinasa). Al unir cAMP las subunidades regulatorias, son liberadas las subunidades catalíticas para poder fosforilar diversas proteínas involucradas en el mantenimiento del arresto meiótico. El aumento en la concentración

de calcio del ovocito actúa en conjunto con la disminución del cAMP para señalar la continuación del progreso de la meiosis. Las uniones tipo GAP median la comunicación intercelular al permitir el pasaje de moléculas pequeñas entre las células. Una extensa red de uniones tipo GAP conecta a las células de la granulosa con las células del cumulus y a éstas últimas con el ovocito (Wassarman y Albertini, 1994). En respuesta al pico preovulatorio de LH *in vivo*, se produce una importante disminución en el número de este tipo de uniones y consecuentemente la comunicación intercelular disminuye (Gilula y col., 1978). Esto lleva a una disminución en el flujo de AMPc desde las células del cumulus hacia el ovocito, por debajo del nivel necesario para la inhibición del factor promotor de la maduración (MPF), permitiendo de este modo que se active el MPF con la consecuente reanudación de la meiosis en el gameto (Dekel, 1999). Luego de la ovulación, el ovocito y las células del cumulus ya no están conectados debido a la expansión del cumulus y la retracción de las prolongaciones celulares que atravesaban la zona pelúcida para contactar la membrana del ovocito (Wassarman y Albertini, 1994).

Ha sido propuesto que el receptor GPR3, presente en el oolema, participa en el mantenimiento del arresto meiótico en el ovocito. El mismo tiene una alta actividad constitutiva, aunque podría también ser estimulado mediante un ligando producido por las células foliculares. Este receptor se acopla a una proteína Gs, estimulando a la enzima adenilato ciclasa en la membrana del ovocito con la consecuente producción de cAMP. El nivel constante de cAMP activa a la PKA, la cual indirectamente produce la fosforilación e inactivación del MPF. Al momento de reanudar la meiosis el MPF debe ser desfosforilado. Para ello participa una fosfatasa al mismo tiempo que se bloquea el sistema de fosforilación. La acción de la LH podría modificar el ligando del receptor GPR3. A su vez, la adenilato ciclasa del oolema se inactivaría por una proteína Gi o por un incremento del calcio, consecuencia de la estimulación por la LH. También se ha propuesto la intervención de la fosfodiesterasa PDE3A para degradar

el cAMP, cuya actividad ha sido identificada en los COCs de ratón en respuesta a la LH (Melhmann, 2005) (**Figura 8**).



**Figura 8:**

**A** – Señalización celular que permite el mantenimiento del arresto meiótico. GPR3, activado constitutivamente o por un ligando desconocido, activa Gs, la cual estimula AC con el consecuente aumento del cAMP. cAMP activa a PKA, la cual en forma indirecta fosforila e inactiva al complejo regulador del ciclo celular CDK1/ciclina B (CYB). Directa o indirectamente PKA fosforila e inactiva a la fosfatasa CDC25b, de igual modo PKA activa la quinasa WEE1/MYT1 encargada de fosforilar y mantener inactiva a CDK1, previniendo de este modo la reanudación de la meiosis.

**B** – Blancos potenciales en los que podría actuar la LH para estimular la reanudación de la meiosis. La disminución del nivel de cAMP produciría la inactivación de la PKA, lo que permitiría la actividad de la fosfatasa CDC25b que desfosforilaría y activaría al complejo CDK1/CYB, llevando a la reanudación de la meiosis. Adaptado de Melhmann, 2005.

Ha sido demostrado que la maduración meiótica en ovocitos de mamíferos es regulada por moléculas conocidas por controlar el ciclo celular, tales como la Cdc2 quinasa y MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos). La Cdc2 quinasa está compuesta por una subunidad regulatoria ciclina B y una subunidad catalítica p34<sup>cdc2</sup>, las cuales regulan la transición G2/M en la mitosis y también en la meiosis del ovocito.

La ciclina B-p34cdc2 también ha sido denominada MPF. Este factor se activa al inicio de la maduración y alcanza los picos de actividad en la metafase I y II. Se trata de una serina - treonina quinasa cuya activación inicia una serie de eventos que conducen finalmente a la ruptura de la vesícula germinal, condensación de los cromosomas y formación de los husos meióticos (Hunter, 2000). Por otro lado, ha sido demostrada la fosforilación de la MAPK durante la maduración en ovocitos murinos, porcinos y bovinos, la cual tiene la capacidad de fosforilar la lámina nuclear y diversas proteínas del citoesqueleto (Hunter, 2000). Incluso se ha comprobado en ovocitos porcinos que, durante la fase de crecimiento, se desarrolla primero la capacidad de activar al MPF y luego la capacidad de activar a la MAPK (Miyano, 2003). El sistema de MAPK es también una serina - treonina quinasa y funciona en forma paralela e interactuando con el MPF para dirigir el progreso de la meiosis en los ovocitos. El momento de activación de la MAPK durante la maduración es variable entre especies de mamíferos. En ovocitos porcinos su actividad es baja durante el estadio de vesícula germinal, aumenta moderadamente con la ruptura de la vesícula germinal y se incrementa abruptamente en el estadio de metafase I. Se le han atribuido funciones en la organización de los husos meióticos, transición de metafase I a metafase II, activación del MPF y participación en el mantenimiento del arresto meiótico en metafase II. Por lo tanto, su activación se considera de importancia en instancias posteriores a la ruptura de la vesícula germinal (Fan y Sun, 2004; Liang y col., 2007).

También ha sido sugerido que el arresto meiótico de los ovocitos en el estadio de dictiotene es mantenido por un producto de las células de la granulosa de bajo peso molecular presente en el fluido folicular, el inhibidor de la maduración del ovocito (OMI). Este compuesto ejercería su acción a través de las células del cumulus y sería lo suficientemente pequeño para atravesar las uniones tipo GAP entre estas células y el ovocito. La actividad del OMI sería potenciada por el AMPc, solapándose algunos efectos de ambos compuestos en los COCs. Sin embargo, ante la falta de evidencia bioquímica que corrobore la existencia del OMI, se ha propuesto que la hipoxantina y/o

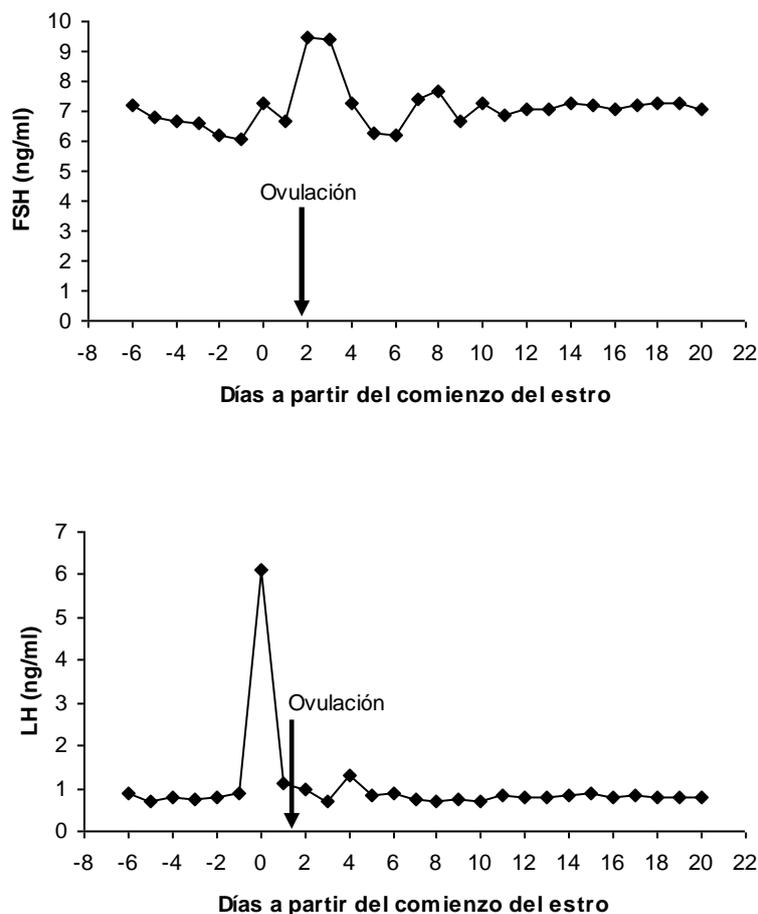
la adenosina son en realidad los componentes de bajo peso molecular del fluido folicular que previenen la maduración espontánea de los ovocitos *in vitro* (Wassarman y Albertini, 1994). El pico de LH *in vivo* llevaría a la eliminación de una o más sustancias con acción inhibitoria en el folículo, como el OMI, permitiendo así la activación de ciclinas, fosfatasas y quinasas requeridas para el progreso de la meiosis (Hunter, 2000).

La participación de los esteroides en el proceso de maduración fue contemplada en varias especies de mamíferos. Aunque la LH induce tanto la maduración de los ovocitos como la síntesis de progesterona en los folículos, la estimulación de la maduración por la LH no sería mediada por la progesterona. Incluso se ha demostrado que la maduración meiótica es inhibida por altas concentraciones de progesterona, testosterona, pregnenolona y otros esteroides (Wassarman y Albertini, 1994). Por otro lado, se han identificado un grupo de esteroides activadores de la meiosis (MAS), con capacidad para inducir la reanudación de la meiosis en los ovocitos, inclusive sin la participación de las células del cumulus. Aunque se ha sugerido que los ovocitos tendrían receptores para MAS, el mismo no fue identificado aún. Los COCs de ratón son capaces de sintetizar MAS al estimularse la maduración con FSH. Los MAS están presentes en el fluido folicular de mujer, yegua y cerda, y si bien se ha observado la acumulación de estos compuestos en respuesta a las gonadotropinas, no se puede asegurar que formen parte del mecanismo de acción de las mismas (Byskov y col., 2002).

### ***Gonadotropinas y maduración del ovocito***

En la adenohipófisis se sintetizan FSH y LH, hormonas de composición glicoproteica conformadas por dos cadenas polipeptídicas  $\alpha$  y  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  es idéntica en las dos hormonas y le confiere la especificidad de especie y la subunidad  $\beta$

difiere y genera la especificidad biológica. La FSH es la responsable del proceso de esteroidogénesis ovárica y del crecimiento folicular. La LH interviene en el proceso de esteroidogénesis ovárica, la inducción de la maduración del ovocito en el folículo preovulatorio, la iniciación de los eventos que desencadenan la ovulación y la formación del cuerpo lúteo y su mantenimiento (Priedkalns, 1994; Davidson y Stabenfeldt, 1999; Callejas, 2001; Hafez y col., 2002) (**Figura 9**).



**Figura 9:** Concentraciones de FSH y LH en el plasma sanguíneo periférico durante en ciclo estral de la cerda. Adaptado de Anderson, 2002.

Tanto las células de la teca y de la granulosa de los folículos secundarios terminales como de los folículos terciarios iniciales responden a las hormonas gonadotróficas. Si bien inicialmente las células de la granulosa expresan receptores

para la FSH y las de la teca expresan receptores para la LH, en los folículos terciarios las células de la granulosa son inducidas por la FSH a expresar también receptores para la LH. Incluso en las células del cumulus se han identificado receptores para esta última hormona (Tanghe y col., 2002). En las células de la teca interna de los folículos terciarios la LH estimula la producción de andrógenos y pequeñas cantidades de estradiol. Los andrógenos o bien son secretados a los capilares o bien atraviesan la membrana basal para alcanzar la capa de células de la granulosa. Los receptores de las células de la granulosa interaccionan con la FSH para activar el sistema de la enzima aromatasa, que convierte los andrógenos tecales (testosterona, androstenediona) en estrógenos (17  $\beta$  estradiol, estrona), que son secretados al fluido folicular y los capilares. La concentración antral de 17  $\beta$  estradiol es 1000 veces mayor que la detectada en la circulación sanguínea. La alta concentración local de estrógenos mantiene un ambiente favorable para la maduración folicular. Las acciones de la FSH y de la LH están mediadas por un incremento en la producción de cAMP, que actúa como segundo mensajero intracelular (Priedkalns, 1994; Davidson y Stabenfeldt, 1999).

La participación de las gonadotrofinas en la reanudación de la meiosis de los ovocitos estaría mediada, al menos en parte, por el incremento en la producción de cAMP en las células del cumulus y la consecuente activación de la MAPK. En sistemas *in vitro* se comprobó la activación de la MAPK en células del cumulus y de la granulosa porcinas y murinas luego de la estimulación con FSH y LH. Además la inducción de la maduración por gonadotrofinas en los COCs fue impedida al inhibir la actividad de dicha enzima. Por lo tanto, ha sido sugerido que la inducción de la maduración por FSH y LH en los COCs de cerdo y ratón estaría mediada por el sistema MAPK. Además, se ha sugerido que la proteína quinasa C (PKC) sería la conexión entre la estimulación por FSH y la activación de MAPK. Por su parte, la PKA también mediaría la activación de MAPK en respuesta a las gonadotrofinas en células del cumulus y de la granulosa. Asimismo, se ha propuesto la intervención de

compuestos de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en la activación de la MAPK en respuesta a la FSH y a la LH (Fan y Sun, 2004; Liang y col., 2007; Yamashita y col., 2009; Zhang y col., 2009).

Las células somáticas al ser estimuladas por la LH podrían utilizar dos mecanismos diferentes para enviar un segundo mensajero al ovocito. La LH actuaría indirectamente en las células de la teca y/o granulosa induciendo la secreción de un segundo mensajero al fluido folicular o directamente sobre las células del cumulus (Mehlmann, 2005; Mattioli y Barboni, 2000). Ante la estimulación por la LH, las células del cumulus reaccionan con un incremento inmediato en el nivel de calcio intracelular, el cual difunde al ovocito a través de las uniones tipo GAP (Mattioli y col., 1998; Mattioli y Barboni, 2000). Luego del pico de LH, dentro del ovocito se observa un incremento transitorio en el nivel de cAMP. Este segundo mensajero podría ser producido en las células somáticas y difundir al ovocito a través de las uniones tipo GAP, o bien podría ser sintetizado por la adenilato ciclasa presente en el oolema en respuesta a un factor producido por las células de la granulosa estimuladas por la LH. La función del cAMP como regulador del progreso meiótico sigue siendo controversial. El cAMP no puede ser considerado como un inhibidor general de la maduración, ya que su acción es de mayor complejidad dependiendo su función de los niveles alcanzados en las células del cumulus y en el ovocito, las que a su vez son reguladas de diferente modo. Unas pocas horas luego de la exposición a la LH, las células del cumulus sufren una despolarización gradual de su potencial de membrana. Debido al acoplamiento eléctrico con estas células el ovocito también se despolariza, pudiendo este cambio en el potencial de membrana participar en la estimulación de la maduración. Debido a la presencia de canales de calcio dependientes de voltaje en el oolema, se produce un segundo incremento en el nivel de calcio del ovocito aproximadamente a mitad de la maduración (Mattioli y Barboni, 2000). Las diferentes isoformas de adenilato ciclasa halladas en los ovocitos de roedores pueden ser

inactivadas por calcio. Posiblemente el incremento de calcio luego de la estimulación por la LH sea el mecanismo de inactivación de la enzima (Mehlmann, 2005).

Las células de la granulosa sintetizan proteínas de la familia del EGF en respuesta a la LH. Estas proteínas son capaces de inducir la maduración de los COCs tan efectivamente como la LH, incluso sin la participación de la hormona. Sin embargo la vía de señalización entre las células del cumulus y el ovocito es aún desconocida para estos compuestos (Mehlmann, 2005).

Los efectos de las gonadotropinas en la maduración de ovocitos porcinos *in vitro* han sido ampliamente estudiados, sin embargo no se ha profundizado en los efectos metabólicos mediados por dichas hormonas en los COCs durante este proceso. La suplementación del medio de cultivo con FSH y LH, individualmente o en combinación, estimula la expansión del cumulus y mejora la maduración nuclear de los ovocitos. Si bien las gonadotropinas no son indispensables para la reanudación de la meiosis *in vitro*, aceleran la ruptura de la vesícula germinal incrementando la proporción de ovocitos que alcanzan el estadio de metafase II (Mattioli y col., 1991; Marchal y col., 2001; Sun y col., 2001; Schoevers y col., 2003; Algriany y col., 2004). La adición de FSH y LH al medio de cultivo también mejora la maduración citoplasmática. Se estimula la migración de los gránulos corticales, la actividad de MAPK y se incrementa la habilidad de desarrollo hasta blastocisto (Sun y col., 2001). La adición al medio de cultivo de LH individualmente puede inducir la maduración citoplasmática, hecho que se ve reflejado en una mayor capacidad de los ovocitos de formar pronúcleos (Mattioli y col., 1991). De igual modo, la FSH individualmente tiene efecto estimulador en la maduración citoplasmática de los ovocitos porcinos, aumentando el porcentaje de clivaje y mejorando la competencia de los embriones para desarrollar hasta el estadio de blastocisto (Schoevers y col., 2003).

La información acerca de los requerimientos del ovocito para alcanzar una adecuada maduración *in vitro* y particularmente en lo que se refiere a los cambios metabólicos es insuficiente. El citoplasma del ovocito es el que debe proporcionar la

maquinaria metabólica necesaria para la producción de energía requerida para la función celular durante la maduración y posterior fecundación y desarrollo temprano del embrión. La fisiología del cigoto y del embrión en los primeros estadios de división es considerada como una extensión de la correspondiente al ovocito (Gardner, 1998).

## **Metabolismo**

Las reacciones químicas que tienen lugar en el seno de los tejidos constituyen en conjunto el metabolismo. Se utiliza la denominación metabolismo intermedio para designar las transformaciones químicas que ocurren dentro de las células. El metabolismo intermedio abarca procesos de naturaleza muy variada. Muchos de ellos contribuyen a la degradación de sustancias y llevan, en su mayoría, a la producción final de energía y desechos, mientras que otras reacciones aprovechan esta energía para realizar la síntesis de las estructuras componentes del organismo o de los productos necesarios para su funcionamiento. Los procesos degradativos corresponden al catabolismo y los procesos de biosíntesis al anabolismo. En términos generales, el catabolismo tiene naturaleza oxidativa, mientras que el anabolismo es reductivo. En ambos se utilizan coenzimas como dadores o aceptores de hidrógenos, pero mientras en los procesos catabólicos el NAD es el principal agente de transferencia de equivalentes de reducción, en el anabolismo el NADPH es el proveedor de hidrógenos para la síntesis. El catabolismo comprende reacciones cuya resultante energética final es exergónica, requiere ADP, el cual se fosforila con producción neta de ATP. En cambio, el anabolismo comprende transformaciones endergónicas que utilizan ATP como principal fuente de energía y producen ADP y Pi.

Generalmente las transformaciones metabólicas, tanto de degradación como de síntesis, se realizan a través de series de reacciones catalizadas por enzimas y ordenadas en una secuencia definida. Cada una de esas series de reacciones que llevan a la conversión de un sustrato inicial en un determinado producto final

corresponde a lo que se denomina una vía metabólica. El funcionamiento de las múltiples vías metabólicas existentes en una célula exige una delicada regulación. Como la mayoría de las reacciones químicas en la célula son catalizadas por enzimas, el control de la actividad enzimática puede regular eficazmente los procesos metabólicos. En casi todas las vías metabólicas existe una o más enzimas que actúan como reguladores del flujo de sustratos y productos, ajustándolos a las necesidades de la célula. Estas enzimas reguladoras aumentan o disminuyen su actividad en respuesta a determinadas señales. Por esta razón, en última instancia la regulación es producida modulando la velocidad de reacciones específicas. La velocidad a la cual cursa una determinada reacción depende tanto de la cantidad absoluta de enzima presente, como de la eficiencia catalítica de la misma. La cantidad absoluta de enzima presente en una célula depende de la relación entre la velocidad de su síntesis y de su degradación. Cuando ambos procesos se mantienen más o menos constantes la cantidad de enzima permanece estable, este es el caso de las enzimas constitutivas. En cambio, para las enzimas inducibles, la síntesis se activa o deprime de acuerdo con los requerimientos de la célula. La inducción comprende síntesis *de novo* de la enzima y en general es activada por hormonas. Los mecanismos de regulación de la eficiencia catalítica de las enzimas comprenden fundamentalmente dos mecanismos, la regulación alostérica y la regulación por modificación covalente. En el primer caso, sustancias de bajo peso molecular actúan como efectores que se unen a la enzima en un sitio alostérico, produciendo cambios en la afinidad por el sustrato. Cuando aumentan la afinidad se dice que son efectores positivos, en cambio cuando disminuyen la afinidad se trata de efectores negativos. En el caso de la modificación covalente, se produce la adición o sustracción de grupos unidos covalentemente a la molécula de enzima. En general el grupo fosfato se une al hidroxilo de residuos de serina en la molécula de enzima, lo que promueve o detiene su actividad catalítica (Newshome y Crabtree, 1981; Clarenburg, 1992a; York, 2002; Nelson y Cox, 2005a).

## ***Metabolismo de hidratos de carbono***

Los hidratos de carbono son las moléculas fundamentales de provisión energética en la mayoría de los seres vivos, aunque además forman parte de diversas estructuras de las células. La fuente principal de energía para los mamíferos y otros vertebrados es el monosacárido glucosa, que es la forma en que el azúcar se transporta generalmente en la circulación de los animales (Curtis y Barnes, 2000b). Otros monosacáridos como la fructosa y la galactosa pueden también ser utilizados para obtener energía luego de integrarse al metabolismo de la glucosa (Nelson y Cox, 2005c).

La principal función de la glucosa en el organismo es la de servir como combustible de las células; su oxidación produce energía utilizable para la realización de trabajo. Sin embargo, también puede ser utilizada como materia prima para la síntesis de algunos compuestos. La principal vía del catabolismo de la glucosa es la glucólisis o vía de Embden-Meyerhof. En el curso de esta vía, una molécula de glucosa es desdoblada en dos de piruvato. Las transformaciones químicas de la glucólisis comprenden cambios en la molécula del sustrato original que determinan la producción de metabolitos ricos en energía, utilizables para la síntesis de ATP. Esta capacidad de generar ATP por mecanismos de fosforilación a nivel de sustrato, que no requieren la participación del oxígeno ni de la cadena respiratoria mitocondrial, otorga la importancia fisiológica a la vía. En presencia de oxígeno, el piruvato formado durante la glucólisis sufre un proceso de oxidación total hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , mediante la descarboxilación del piruvato, el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria. En condiciones de anaerobiosis, la enzima lactato deshidrogenasa cataliza la reducción de piruvato a lactato utilizando NADH como coenzima, en una reacción reversible. La importancia funcional de la reacción radica en la reoxidación de la coenzima reducida en la reacción catalizada por la gliceraldehído 3-fostato deshidrogenasa, ya que sin

producción de lactato la glucólisis se detendría una vez que el NAD existente en el citosol se hubiese reducido completamente (Harris, 2002; Nelson y Cox, 2005c).

La enzima fosfofructoquinasa 1 es la principal enzima reguladora de la glucólisis. Su actividad responde a la carga energética de la célula a través de diferentes efectores alostéricos. Es una enzima de síntesis inducible, que tiene como efectores alostéricos positivos al AMP, ADP y fructosa 2,6-bisfosfato y como efectores negativos al citrato y al ATP a altas concentraciones. De su actividad depende en parte la actividad de las otras enzimas reguladoras de la vía como la hexoquinasa y la piruvato quinasa, ya que modula la concentración de sus respectivos efectores. La hexoquinasa tiene alta afinidad por la glucosa, por lo que actúa a velocidad máxima a la concentración presente en los fluidos del organismo (5,5 mM), pero es inhibida por la acumulación de su producto, la glucosa 6-fosfato. Por su parte, la piruvato quinasa responde también a la carga energética de la célula, siendo inhibida por ATP y activada por ADP. Además, la actividad de la piruvato quinasa es deprimida por acetil-CoA y alanina y estimulada por fructosa 1,6-bisfosfato (Schirmer y Evans, 1990; Nelson y Cox, 2005d). El fluoruro de sodio (NaF) es un potente inhibidor la enzima enolasa. Esta enzima participa en la última etapa de la vía glucolítica. El ión fluoruro forma un complejo con el  $Mg^{2+}$  y el Pi, el cual es responsable de la inhibición competitiva de la enzima al interferir con la unión del sustrato (Cimasoni, 1972; Harris, 2002).

Aunque la glucólisis y el ciclo de Krebs son las principales vías catabólicas de la glucosa, existen en las células vías alternativas para producir metabolitos útiles a partir de la hexosa. Una de estas vías, de gran interés por ser la principal fuente de NADPH, es la vía de las pentosas fosfato. El NADPH producido en la vía cede sus hidrógenos para ser utilizados en distintos procesos de síntesis. Algunos ejemplos son la síntesis de ácidos grasos, esteroides, glutatión reducido (GSH) o aminoácidos a través de la glutamato deshidrogenasa. Otra función importante de la vía es la de producir ribosa 5-fosfato, uno de los intermediarios utilizados para la síntesis de

nucleótidos y ácidos nucleicos. La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa regula la velocidad de la vía, es una enzima inducible y su actividad depende de la relación NADPH/NADP en la célula (Wood, 1986; Clarenburg, 1992b; Harris, 2002; Nelson y Cox, 2005c).

Otra alternativa en la que la glucosa puede ser utilizada es la vía de las hexosaminas o aminoazúcares. En el metabolismo de las hexosaminas se forman una variedad de compuestos necesarios para la síntesis de glicosaminoglicanos y proteoglicanos. Estos son componentes predominantes de la matriz extracelular y la superficie de la célula que participan en diversos procesos biológicos como la adhesión y señalización celular. Uno de los glicosaminoglicanos es el ácido hialurónico, el cual está formado por la repetición de un disacárido compuesto por N-acetilglucosamina y ácido glucorónico. (Schwartz, 2002; Mayes y Bender, 2004; Murray y Keeley, 2004).

Ciertos productos derivados de la glucosa pueden servir también para sintetizar lípidos o esqueletos carbonados de aminoácidos, lo que indica la íntima relación existente entre los diversos procesos metabólicos (Schwartz, 2002; Nelson y Cox, 2005c).

## ***Metabolismo de aminoácidos***

A diferencia de los azúcares y las grasas, que sirven principalmente como fuentes de energía y pueden ser almacenados en las células, los compuestos nitrogenados resultan indispensables para la síntesis de estructuras celulares o de compuestos con actividad biológica y no son pasibles de almacenamiento. Si bien los aminoácidos pueden ser utilizados para la producción de energía, esta función suele ser secundaria. En cambio, la participación en la síntesis de componentes celulares, de hormonas y de otras sustancias esenciales es una función insustituible. El destino

más importante de los aminoácidos es su incorporación a cadenas polipeptídicas durante la biosíntesis de proteínas específicas, con un fin plástico o estructural. Las proteínas celulares están en continua renovación, es decir, se produce la completa degradación a aminoácidos y resíntesis de toda la molécula. En segundo lugar, muchos aminoácidos pueden sufrir diversas transformaciones y ser utilizados para la síntesis de compuestos nitrogenados no proteicos con funciones específicas de importancia fisiológica. Finalmente, los aminoácidos en exceso, como no pueden ser almacenados, suelen degradarse para su utilización con fines energéticos. En este caso se produce la pérdida de la función amina, lo cual deja libre el esqueleto carbonado y el grupo nitrogenado se desprende como amoníaco ( $\text{NH}_3$ ). A través de reacciones de transferencia (transaminación) y de separación del grupo amino (desaminación), éste queda libre formando  $\text{NH}_3$ . Las cadenas carbonadas siguen diferentes rutas que las llevan a oxidarse completamente hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  y producir energía en el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria, o alternativamente dichas cadenas pueden ser derivadas a diferentes vías de síntesis (Coomes, 2002; Nelson y Cox, 2005b; 2005e).

## ***Metabolismo de lípidos***

Los triacilglicéridos constituyen la mayor parte de los lípidos que se almacenan como depósitos grasos en el organismo y representan el principal material de reserva energética. Estos compuestos son hidrolizados por lipasas como primer paso de su catabolismo y los ácidos grasos resultantes pueden ser oxidados en las mitocondrias mediante la  $\beta$ -oxidación, ciclo de Krebs y cadena respiratoria para la obtención de energía en forma de ATP. Las lipasas son enzimas bastante inespecíficas y su actividad puede ser regulada por inducción de su síntesis y/o por modificación

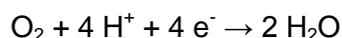
covalente, siendo activadas mediante su fosforilación (Khoo y Steinberg, 1981; Tornqvist y Belfrage, 1981; Clarenburg, 1992c).

Como material de reserva energética las grasas poseen ventajas sobre los hidratos de carbono y las proteínas, ya que su valor calórico es más del doble (9 kcal/g para las grasas y aproximadamente 4 kcal/g para los hidratos de carbono y proteínas).

Los restos acetil-CoA procedentes de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y de la degradación de la glucosa o cadenas carbonadas de algunos aminoácidos, pueden utilizarse para sintetizar nuevos ácidos grasos. Ellos son incorporados al glicerol activo para formar acilgliceroles, los cuales son almacenados en los depósitos grasos (McGarry, 2002; Nelson y Cox, 2005f).

### ***Oxidaciones biológicas y producción de especies reactivas del oxígeno***

La respiración puede ser definida como el proceso por el cual las células aeróbicas obtienen energía, en forma de ATP, a partir de la oxidación de moléculas combustibles por acción del oxígeno (Mayes, 1994). Gran parte de los sustratos que se oxidan en el organismo sufren procesos de deshidrogenación. Los hidrógenos sustraídos al sustrato han de unirse finalmente al oxígeno molecular para formar agua:



Las reacciones de deshidrogenación son catalizadas por deshidrogenasas específicas para cada sustrato; los hidrógenos suelen ser captados por coenzimas que pueden ser un nucleótido de nicotinamida (NAD o NADP) o una flavina (FAD).

Los equivalentes de reducción producidos en el ciclo de Krebs o en otras vías metabólicas son finalmente cedidos a la cadena respiratoria mitocondrial con la consecuente reducción del oxígeno a agua. Este proceso exergónico que transcurre con disminución de energía libre hace que el potencial de transferencia de electrones

sea convertido en potencial de transferencia de fosforilos para la síntesis de ATP (fosforilación oxidativa) (Beattie, 2002; Nelson y Cox, 2005g; 2005h).

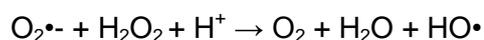
En la cadena respiratoria se produce la reducción de una molécula de oxígeno por la cesión de cuatro electrones ( $O^{2-}$ )<sub>2</sub>. El problema de la convergencia simultánea de cuatro electrones a la molécula de oxígeno es de gran importancia, pues si la reducción del mismo no es completa se forman especies reactivas del oxígeno (ROS). El término ROS incluye a varios compuestos, entre ellos al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y los radicales libres<sup>1</sup> anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ) y óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) (Matés, 2000).

La producción de ROS es un proceso normal que ocurre en las células cuando hay un desvío de electrones al oxígeno durante las reacciones de transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, en otros sistemas de transferencia de electrones mitocondriales y microsomales o por acción de determinadas enzimas como la NADPH-oxidasa, xantinaoxidasa y L-aminoácido oxidasa.

Las ROS son en general consideradas perjudiciales para las células, ya que su naturaleza altamente reactiva les da la propiedad de reaccionar con diversos componentes celulares, como lípidos, proteínas y ADN, alterando su normal funcionamiento. El radical hidroxilo es mucho más reactivo que el  $H_2O_2$  y el  $O_2^{\bullet-}$  y, por lo tanto, más tóxico. Se cree que la toxicidad del  $O_2^{\bullet-}$  y el  $H_2O_2$  se debe a su capacidad de generar radical hidroxilo. El peróxido de hidrógeno, aunque no es un radical libre, puede generar radical hidroxilo en presencia de  $Fe^{2+}$  u otro metal de transición, por la llamada reacción de Fenton:



La acción tóxica principal del anión superóxido probablemente sea ejercida a través del radical hidroxilo formado en la reacción de Haber-Weiss:



---

<sup>1</sup> *Radical libre*: ion o grupo neutro de átomos que posee uno más electrones no apareados.

Para prevenir tal efecto deletéreo existen en las células sistemas enzimáticos y no enzimáticos encargados de remover las ROS (Matés, 2000; Cadenas y Davies, 2000; Schrader y Fahimi, 2004). El anión superóxido es eliminado en una reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa, la cesión de un electrón de un anión superóxido a otro corresponde a las llamadas reacciones de dismutación. La descomposición del peróxido de hidrógeno es catalizada por la enzima catalasa. La glutatión peroxidasa es una enzima que cataliza la reducción de hidroperóxidos orgánicos y de peróxido de hidrógeno en reacciones en las que participa el GSH. El glutatión oxidado (GSSG) es reducido por acción de la glutatión reductasa, enzima que utiliza NADPH como dador de equivalentes de reducción. Las peroxirredoxinas son una familia de proteínas encargadas de eliminar los peróxidos, con una gran efectividad para eliminar el peróxido de hidrógeno (Cox y col., 2009).

Una importante función protectora contra las ROS es ejercida también por compuestos como  $\alpha$ -tocoferol o vitamina E,  $\beta$ -carotenos o provitaminas A, ácido ascórbico o vitamina C, ubiquinol, GSH, entre otros (Beattie, 2002; Nelson y Cox, 2005g; 2005h, Gruszka y col., 2008).

Al estudiar los efectos nocivos de las ROS, en ciencias biológicas ha sido frecuentemente utilizado el concepto de estrés oxidativo, el cual se define como un aumento de los oxidantes o una disminución de los antioxidantes en las células, generándose una situación en la que las ROS se incrementan superando los valores fisiológicos (Gonzales Flecha y col., 1993; Sikka, 2001). Sin embargo, en los últimos años se ha observado que a concentraciones fisiológicas las ROS participan en mecanismos de señalización intracelular, siendo el  $O_2^{\bullet-}$ , el  $H_2O_2$  y el  $NO^{\bullet}$  consideradas las especies más importantes involucradas en dichos procesos (Lowenstein y col., 1994; Aitken y col., 1995; Kamata y Hirata, 1999; Hancock y col., 2001; Pfeilschifter y col., 2001).

## **Hipótesis**

El resultado subóptimo de la producción de embriones porcinos *in vitro* se debe en gran parte al desconocimiento de las variables involucradas en el control de la maduración del ovocito. Los cambios morfológicos han sido utilizados en forma rutinaria para evaluar el seguimiento de la maduración *in vitro*, sin embargo en la actualidad se ha establecido la importancia de los cambios bioquímicos como marcadores potenciales del proceso.

El estudio del metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos contribuirá a dilucidar el perfil metabólico de los COCs porcinos durante la maduración *in vitro*. La glucólisis es la vía metabólica básica de obtención de energía de las células, la determinación de su actividad en los COCs es fundamental en el estudio de su perfil metabólico. El ovocito porcino presenta gran cantidad de gotas lipídicas en el citoplasma, posiblemente su catabolismo se produzca durante la maduración. Los aminoácidos son utilizados como sustrato tanto de la síntesis proteica como del metabolismo energético, la identificación de su destino es esencial para establecer el patrón metabólico de los COCs.

Se ha demostrado que la maduración meiótica en los ovocitos de conejo y de bovino puede ocurrir *in vitro* en ausencia de gonadotrofinas, sin embargo la falta de estimulación hormonal compromete la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito porcino. Se ha observado en roedores, humanos y bovinos que las gonadotrofinas regulan la actividad metabólica de los COCs, controlando la actividad de diferentes vías involucradas en la maduración del ovocito. Las gonadotrofinas podrían en parte

estar regulando diferentes vías metabólicas implicadas en la maduración de ovocitos en el porcino.

El metabolismo oxidativo implica la potencial producción de ROS. Las altas tensiones de oxígeno de los sistemas *in vitro* podrían incrementar la producción de ROS y alterar el funcionamiento del ovocito durante la maduración. Compuestos antioxidantes han probado ser beneficiosos en mejorar la competencia de maduración y de desarrollo embrionario de los ovocitos porcinos. Sin embargo no hay estudios que hayan determinado si las condiciones de maduración *in vitro* son causa de estrés oxidativo para los COCs. La determinación de la producción de ROS durante la maduración de ovocitos porcinos *in vitro* permitirá establecer la variación de sus niveles y así controlar su producción para optimizar el proceso.

La producción de embriones *in vitro* de cualquier especie necesita protocolos específicos basados en sus requerimientos particulares. La comprensión de los cambios citoplasmáticos involucrados en el metabolismo de los COCs conducirá a establecer condiciones más favorables para la maduración de ovocitos porcinos *in vitro*.

## **Objetivos**

## General

Estudiar el perfil metabólico de los COCs porcinos durante la maduración *in vitro*.

## Particulares

- Establecer la calidad de los ovocitos porcinos inmaduros obtenidos a partir de ovarios de cerdas de faena.
  
- Evaluar la maduración *in vitro* en las diferentes categorías de COCs.
  
- Determinar el perfil metabólico durante la maduración *in vitro* de aquellas categorías de COCs consideradas morfológicamente aptas para madurar, estudiando:
  - El metabolismo de los hidratos de carbono (glucólisis).
  - El metabolismo de aminoácidos.
  - El metabolismo de los lípidos (lipólisis).
  
- Analizar la injerencia de las gonadotrofinas en los patrones metabólicos estudiados.
  
- Evaluar la posible variación en la producción de ROS durante la maduración como indicador de estrés oxidativo.
  
- Correlacionar los patrones metabólicos estudiados con la fecundación *in vitro* como método de evaluación de la maduración citoplasmática.

## **Materiales y métodos generales**

## **Materiales**

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

## **Recolección y clasificación de los COCs inmaduros**

Los ovarios provenientes de cerdas de faena fueron transportados hasta el laboratorio en termos (28 - 33°C) y lavados en solución fisiológica adicionada con penicilina 10.000 UI % (m/v) y estreptomicina 10 mg % (m/v). Los COCs inmaduros se obtuvieron por aspiración de folículos antrales (3 - 8 mm) utilizando una jeringa de 10 ml con aguja 18 g y se clasificaron morfológicamente bajo lupa estereoscópica de acuerdo a las características del cumulus que rodea al ovocito:

Clase A<sub>1</sub>: ovocitos rodeados por un cumulus íntegro y oscuro.

Clase A<sub>2</sub>: ovocitos rodeados por un cumulus íntegro y claro.

Clase B<sub>1</sub>: ovocitos rodeados sólo por la corona radiata.

Clase B<sub>2</sub>: ovocitos parcialmente desnudos con pocas células del cumulus remanentes.

Clase C: ovocitos totalmente desnudos.

Clase D: ovocitos rodeados por un cumulus con células picnóticas.

## **Denudación de los ovocitos**

La denudación de los ovocitos inmaduros fue realizada por agitación con vórtex durante 1 minuto en solución reguladora de fosfatos (PBS) con albúmina sérica bovina

(BSA) 0,3 % (m/v) a 37°C. Luego, los ovocitos fueron separados de las células del cumulus mediante recolección con pipeta Pasteur.

Los COCs madurados se incubaron en hialuronidasa 0,1 % (m/v) en PBS durante 5 minutos a 37°C y luego los ovocitos se desnudaron con pipeta Pasteur fina.

## **Maduración de los ovocitos *in vitro***

Los COCs fueron madurados en medio 199 (sales Earle, L-glutamina, 2,2 mg/l bicarbonato de sodio, GIBCO, Grand Island, NY, USA) con 50 µg/ml de sulfato de gentamicina, 10 % (v/v) de suero fetal bovino (GIBCO), 0,57 mM de cisteína, 0,5 µg/ml de FSH porcina (Folltropin-V, Bioniche, Belleville, Ontario, Canada) y 0,5 µg/ml de LH porcina (Lutropin-V, Bioniche), bajo aceite mineral a 39°C, 5 % CO<sub>2</sub> en aire y 100 % de humedad durante 48 hs. (Abeydeera y col., 2001).

El número de COCs madurados en las diferentes experiencias fue la cantidad mínima suficiente para la sensibilidad de la medición de cada método.

## **Fecundación *in vitro***

La fecundación *in vitro* se realizó utilizando semen fresco de un verraco de raza Yorkshire de probada fertilidad. La fracción rica en espermatozoides del eyaculado fue obtenida por la técnica de mano enguantada (Hancock y Hovell, 1959). Los espermatozoides fueron lavados en medio PBS con 0,3 % (m/v) de seroalbúmina bovina (BSA) dos veces por centrifugación a 400 x g durante 5 minutos y resuspendidos en medio de fecundación Tris-buffer modificado (TBMm). El TBMm consistió en NaCl 113,1 mM, KCl 3 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Tris 20 mM, glucosa 11 mM, piruvato de sodio 5 mM, BSA 0,4 % (m/v), cafeína 2,5 mM y sulfato de gentamicina 50 µg/ml (Abeydeera y Day, 1997). La suspensión de espermatozoides fue filtrada por

gravedad en columna de lana de vidrio (20 mg de lana de vidrio en 10 mm de altura y 4 mm de diámetro) recuperando la fracción rica en espermatozoides vivos (Pereira y col., 2000).

Los COCs madurados fueron desnudados con pipeta Pasteur fina, colocados en el medio de fecundación y luego inseminados a una concentración final de  $5 \times 10^5$  espermatozoides móviles/ml. Los gametos fueron coincubados bajo aceite mineral a 39°C, 5 % de CO<sub>2</sub> en aire y 100 % de humedad durante 18 hs. Para evaluar partenogénesis el 10 % de los ovocitos en cada repetición fueron sometidos al procedimiento de fecundación sin ser expuestos a espermatozoides.

## **Evaluación de la maduración meiótica**

Los ovocitos madurados fueron desnudados, incubados en una solución hipotónica de citrato de sodio 1 % (m/v) durante 15 minutos a 37°C en ambiente humidificado, fijados sobre un portaobjetos con fijador de Carnoy (etanol:ácido acético 3:1) y teñidos con Giemsa (Merck, Darmstadt, Germany) 5 % (v/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La maduración meiótica se determinó evaluando la presencia de la placa cromosómica en metafase II bajo microscopio óptico a 125 x y 400 x (Cetica y col., 1999a).

## **Evaluación de la maduración citoplasmática**

La maduración citoplasmática se evaluó luego de las 18 hs. de coincubación de los gametos. El exceso de espermatozoides fue removido con pipeta Pasteur fina, los ovocitos presuntamente fecundados fueron fijados sobre un portaobjetos con fijador de Carnoy (etanol:ácido acético 3:1) durante al menos 24 hs., teñidos con Hoechst 33342 10 µg/ml en agua destilada durante 15 minutos a temperatura ambiente y finalmente

observados bajo microscopio de epifluorescencia (filtro de 410 nm) a 250 x y 400 x. Se consideraron ovocitos citoplasmáticamente maduros cuando pudo identificarse la presencia de una o más cabezas espermáticas descondensadas y/o pronúcleos.

## **Análisis estadístico**

Los datos no paramétricos se expresaron en porcentajes y los datos paramétricos como media  $\pm$  SEM (error estándar de la media). La prueba utilizada para las comparaciones estadísticas se especificó en cada caso particular en el diseño del experimento. Un  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## **Capítulo 1**

### **Evaluación de la calidad de los ovocitos inmaduros y su competencia de maduración in vitro**

## Introducción

Las técnicas de producción de embriones *in vitro* se han desarrollado durante años en las diferentes especies de animales domésticos, alcanzando embriones viables y hasta nacimientos exitosos (Brackett y col., 1982; Eyestone y First, 1989; Yoshida y col., 1993; Thompson y col., 1995; Machaty y col., 1998; Kikuchi y col., 1999). Sin embargo, los sistemas de producción de embriones *in vitro* han alcanzado mayores porcentajes de blastocistos en las especies bovina y ovina (Sutton-McDowall y col., 2006; Gutnisky y col., 2007; Garcia-Garcia y col., 2007; Zhu y col., 2007) que en la especie porcina (Kikuchi y col., 2002b; Schoevers y col., 2003).

La maduración del ovocito es uno de los pasos cruciales de los sistemas de producción de embriones porcinos *in vitro*. Si bien la maduración de ovocitos porcinos *in vitro* ha sido en gran parte estudiada, la calidad de los ovocitos inmaduros no ha sido suficientemente evaluada. La calidad del ovocito se adquiere progresivamente durante el crecimiento del gameto en el folículo ovárico, repercutiendo en la maduración del ovocito *in vitro*, el desarrollo embrionario *in vitro*, el establecimiento y mantención de la preñez y el desarrollo fetal (Krisher y col., 2007).

El tamaño del ovocito ha sido el factor más utilizado para evaluar la calidad del ovocito inmaduro en los sistemas de maduración *in vitro* en el porcino (Motlik y Fulka, 1986; Homa y col., 1988; Ikeda y Takahashi, 2003). Por otro lado, el diámetro folicular ha sido asociado con la calidad del ovocito, siendo generalmente aceptado que el tamaño folicular se relaciona tanto con la maduración nuclear y citoplasmática como con el potencial de desarrollo embrionario (Motlik y col., 1984; Sun y col., 2001; Marchal y col., 2002). Si bien estos parámetros de evaluación han mostrado buena asociación con la calidad del ovocito inmaduro, no son utilizados en forma rutinaria en los programas de maduración *in vitro* debido a la complejidad práctica que

representan. Contrariamente, la selección de ovocitos inmaduros según las características del cumulus que rodea al ovocito es utilizada habitualmente para la maduración *in vitro* debido a que se realiza fácil y rápidamente.

Para la adquisición de la competencia de desarrollo *in vitro* del ovocito es esencial la asistencia de las células foliculares. Es generalmente aceptado que las células del cumulus sustentan tanto la maduración del ovocito hasta el estadio de metafase II como la maduración citoplasmática requerida para el desarrollo posfecundación del gameto. Si bien los ovocitos rodeados por varias capas de células del cumulus son utilizados de rutina en los protocolos de maduración *in vitro*, los criterios de selección de los COCs varían ampliamente entre autores (Wang y col., 1997; Gandhi y col., 2001; Qian y col., 2003; Algriany y col., 2004; Stokes y col., 2005). Por lo tanto, la asociación entre la calidad del ovocito inmaduro y las características del COC resulta variable según el criterio utilizado.

En el bovino ha sido observado que las características morfológicas del COC están relacionadas con el estadio nuclear de los ovocitos inmaduros y con la competencia de maduración (Cetica y col., 1999a). En este capítulo se presenta la evaluación de la calidad del ovocito porcino inmaduro y su competencia de maduración en relación a las características del cumulus que rodea al ovocito, para luego poder seleccionar los ovocitos más adecuados para ser madurados *in vitro*.

## **Materiales y métodos**

### ***Evaluación de la vitalidad de los ovocitos inmaduros***

Los ovocitos inmaduros fueron desnudados y luego incubados en una solución de Azul Tripán 0,25 % (m/v) y fluorocromo diacetato de fluoresceína (FDA) 0,25 µg%

(m/v) en PBS durante 10 minutos a 37°C en ambiente humidificado. Luego de ser lavados en PBS fueron observados bajo microscopio óptico a 125 x, los ovocitos muertos presentan color azul, a diferencia de los vivos que no adquieren la coloración debido a la integridad de la membrana plasmática (**Foto 2**). Por microscopía de epifluorescencia (filtro de 510 nm) a 125 x, los ovocitos vivos presentan fluorescencia verde debido a la presencia de esterasas intracelulares activas, mientras que los muertos no presentan fluorescencia (Hoppe y Bavister, 1984) (**Foto 2**).

### ***Evaluación del estadio nuclear de los ovocitos inmaduros***

Los ovocitos inmaduros fueron desnudados y centrifugados a 8200 x g durante 30 minutos para polarizar los lípidos. Luego fueron incubados en fluorocromo Hoechst 33342 0,5 mg % (m/v) en PBS durante 30 minutos a 37°C en ambiente humidificado y lavados en PBS. Se evaluó la presencia de vesícula germinal bajo microscopio de epifluorescencia (filtro de 410 nm) (Luttmer y Longo, 1986) y contraste interferencial-diferencial (DIC) según Nomarsky a 125 x, 250 x y 400 x (**Foto 3**).

Para evaluar la asociación entre la vitalidad y el estadio nuclear, los ovocitos desnudados fueron incubados simultáneamente con los fluorocromos diacetato de fluoresceína y Hoechst 33342 durante 30 minutos a 37°C, lavados y evaluados como se describió previamente.

### ***Maduración de los ovocitos in vitro***

Se utilizaron las condiciones de maduración detalladas en la sección general con las particularidades descritas a continuación. Para estudiar la maduración meiótica y citoplasmática se maduraron 50 COCs en hoyos de 500 µl. Para evaluar el número de células del cumulus fue necesario madurar 15 COCs en gotas de 150 µl.

En la experiencia en que se evaluó el efecto de las gonadotrofinas fue utilizado como control el mismo medio de maduración sin el agregado de FSH y LH.

### ***Evaluación de la maduración in vitro***

Para evaluar la maduración *in vitro* de los ovocitos fueron considerados varios parámetros, tales como el grado de expansión del cumulus, la maduración nuclear (extrusión del primer corpúsculo polar y presencia de la placa cromosómica en metafase II) y la maduración citoplasmática (descondensación de cabezas espermáticas y formación de pronúcleos).

El grado de expansión del cumulus en los COCs madurados sólo pudo ser evaluado en las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, se realizó bajo lupa estereoscópica según las características morfológicas del cumulus que rodea al ovocito (**Foto 8**):

- Expansión total: cumulus claro y ampliamente expandido con células separadas por un abundante material intercelular elástico.
- Expansión parcial: cumulus oscuro y compacto con escaso material intercelular.
- Denudación parcial espontánea: ovocitos con pérdida parcial de células del cumulus y con restos de cumulus oscuro y compacto.

Para determinar la relación entre la expansión del cumulus y la maduración de los ovocitos, los COCs fueron separados de acuerdo al tipo de expansión que presentaron y divididos en dos grupos para evaluar la maduración nuclear y citoplasmática.

Para evaluar la extrusión del primer corpúsculo polar los ovocitos madurados fueron denudados y observados bajo lupa estereoscópica a 40 x y microscopio invertido a 400 x determinando la presencia del primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino (**Foto 4**).

La maduración meiótica se confirmó evaluando la presencia de la placa cromosómica en metafase II bajo microscopio óptico a 125 x y 400 x (**Foto 5**).

La maduración citoplasmática se evaluó, luego del procedimiento de fecundación, por la presencia de una o más cabezas espermáticas descondensadas y/o pronúcleos en el ovocito bajo microscopio de epifluorescencia (filtro de 410 nm) a 250 x y 400 x (**Fotos 6 y 7**).

### ***Determinación del número de células del cumulus***

Los COCs inmaduros y madurados *in vitro*, fueron individualmente agitados con vortex a 37°C durante 10 minutos en una solución de hialuronidasa 0,1 % (m/v) y albúmina sérica bovina (BSA) 0,3 % (m/v) en solución reguladora de fosfatos (PBS). Luego la misma solución fue suplementada con tripsina 0,25 % (m/v) y EDTA 0,38 % (m/v) y agitada con vortex a 37°C durante 10 minutos. Finalmente se calculó la concentración de la suspensión de células obtenida realizando conteo en Cámara de Neubauer.

### ***Diseño de experimentos y análisis estadístico***

Experimento 1: Para establecer la distribución de COCs inmaduros obtenidos de ovarios de faena, se determinó la cantidad de COCs inmaduros recuperados de las distintas clases según las características propuestas. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas por la prueba de Kruskal-Wallis.

Experimento 2: Para determinar el porcentaje de ovocitos inmaduros vivos en las distintas clases de COCs, los ovocitos provenientes de las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y D fueron desnudados (los provenientes de la clase C están desnudos al ser recuperados), coloreados con Azul Tripán y fluorocromo FDA y observados bajo microscopio óptico y

de epifluorescencia. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas por la prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado.

Experimento 3: Para evaluar el estadio nuclear de los ovocitos inmaduros en las distintas clases de COCs, los ovocitos provenientes de las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y D fueron desnudados (los provenientes de la clase C están desnudos al ser recuperados), centrifugados para polarizar los lípidos, coloreados con fluorocromo Hoechst 33342 y observados bajo microscopio de epifluorescencia y DIC. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas por la prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado.

Experimento 4: Para analizar la asociación entre la vitalidad y el estadio nuclear de los ovocitos inmaduros en las distintas clases de COCs, los ovocitos provenientes de las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y D fueron desnudados (los provenientes de la clase C están desnudos al ser recuperados), centrifugados para polarizar los lípidos, coloreados simultáneamente con los fluorocromos FDA y Hoechst 33342 y observados bajo microscopio de epifluorescencia y DIC. Las comparaciones estadísticas de los resultados presentados en las figuras 13 y 14 fueron realizadas por las pruebas de independencia y homogeneidad de Chi-cuadrado, respectivamente.

Experimento 5: Para estudiar la competencia de maduración nuclear en las distintas clases de COCs (prueba de homogeneidad) y la asociación entre la presencia del primer corpúsculo polar y la placa cromosómica en metafase II (prueba de independencia), los COCs de las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C y D fueron madurados en forma separada y luego la maduración se evaluó con ambos criterios en el mismo ovocito en forma secuencial. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas por las respectivas pruebas de Chi-cuadrado.

Experimento 6: Para evaluar la relación entre la calidad del ovocito inmaduro y su competencia de maduración *in vitro*, la misma muestra de COCs inmaduros de las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C y D fue dividida en dos alícuotas. A una se le realizó la coloración combinada con los fluorocromos FDA y Hoechst 33342 y se la evaluó como fue descrito anteriormente. La otra alícuota fue madurada y se determinó la

maduración nuclear de los ovocitos. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas por la prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado.

Experimento 7: Para estudiar la competencia de maduración citoplasmática en las distintas clases de COCs, sólo fueron madurados y fecundados en forma separada COCs de las clases que mostraron mayor competencia de maduración nuclear ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$  y  $B_2$ ). Las comparaciones estadísticas fueron realizadas por la prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado.

Experimento 8: Para evaluar la asociación entre la expansión del cumulus y la maduración nuclear, sólo fueron madurados en forma separada COCs de las clases  $A_1$  y  $A_2$  debido a las características del cumulus necesarias para la evaluación. Luego de la maduración los COCs fueron clasificados según los tipos de expansión y utilizados para evaluar la maduración meiótica. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas por la prueba de independencia de Chi-cuadrado.

Experimento 9: Para evaluar la asociación entre la expansión del cumulus y la maduración citoplasmática, sólo fueron madurados en forma separada COCs de las clases  $A_1$  y  $A_2$  debido a las características del cumulus necesarias para la evaluación. Luego de la maduración los COCs fueron clasificados según los tipos de expansión y sometidos al procedimiento de fecundación. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas por la prueba de independencia de Chi-cuadrado.

Experimento 10: Para evaluar la influencia del cumulus y de las gonadotrofinas en la maduración nuclear de los ovocitos, se maduraron COCs de las clases  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$  y  $B_2$  en ausencia y presencia de FSH y LH y luego se determinó la presencia de la placa cromosómica en metafase II. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas por la prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado.

Experimento 11: Para evaluar la influencia del cumulus y de las gonadotrofinas en la maduración citoplasmática, se maduraron COCs de las clases  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$  y  $B_2$  en ausencia y presencia de FSH y LH y luego fueron sometidos al procedimiento de

fecundación. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas por la prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado.

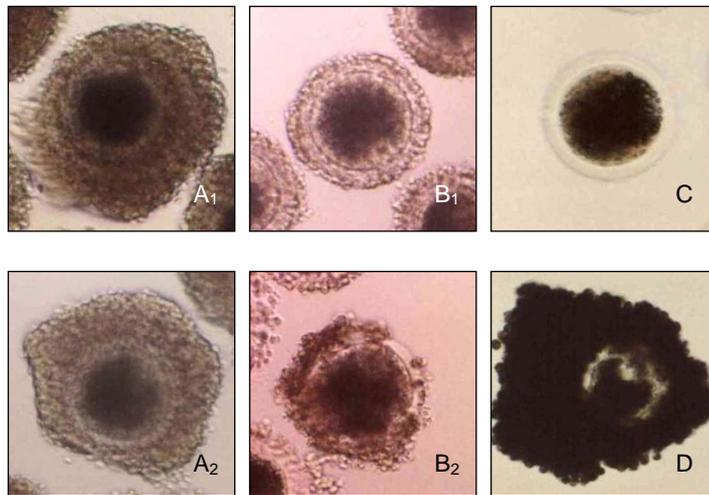
Experimento 12: Para determinar el número de células del cumulus en las distintas clases de COCs inmaduros y su variación durante la maduración en ausencia y presencia de gonadotrofinas, fueron procesados en forma separada COCs pertenecientes a las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> inmaduros y madurados en medio sin y con suplemento de FSH y LH. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas mediante un ensayo factorial 4 x 3.

## Resultados

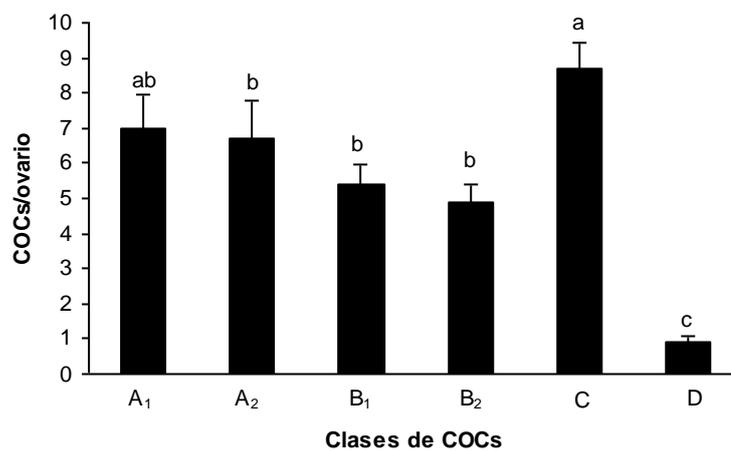
### ***Recuperación de las distintas clases de COCs inmaduros***

Si bien se aspiraron sólo folículos antrales de entre 3 y 8 mm de diámetro con la intención de obtener ovocitos inmaduros totalmente crecidos, la recolección de COCs en el material recuperado dio como resultado una población heterogénea de complejos en relación al cumulus que rodea al ovocito.

En el desarrollo de la técnica de recolección de los COCs porcinos provenientes de ovarios de cerdas faenadas, se recuperaron en promedio  $33,4 \pm 2,4$  COCs inmaduros por ovario y  $0,8 \pm 0$  COCs inmaduros por folículo. Se realizó una adaptación de la clasificación de COCs inmaduros utilizada en la especie bovina de acuerdo a las características propias de la especie porcina (**Foto 1**). La distribución de los COCs recuperados por ovario al ser clasificados morfológicamente, según las clases propuestas, se muestra en la **Figura 10** (Experimento 1).



**Foto 1:** Clasificación morfológica de los COCs inmaduros de acuerdo a las características del cumulus que rodea al ovocito. A<sub>1</sub>: ovocito rodeado por un cumulus íntegro y oscuro. A<sub>2</sub>: ovocito rodeado por un cumulus íntegro y claro. B<sub>1</sub>: ovocito rodeado sólo por la corona radiata. B<sub>2</sub>: ovocito parcialmente desnudo con pocas células del cumulus remanentes. C: ovocito totalmente desnudo. D: ovocito rodeado por un cumulus con células picnóticas (100 x).



**Figura 10:** Número de COCs inmaduros de cada clase recuperados por ovario. <sup>a, b, c</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Experimento 1.  $n = 40$  ovarios.

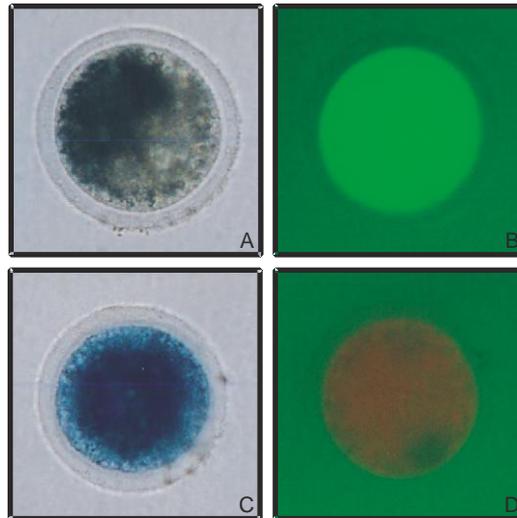
## ***Calidad de los ovocitos inmaduros recuperados***

Como paso previo al desarrollo de la maduración *in vitro* se realizó la evaluación de la calidad del material biológico a utilizar. Para ello fueron considerados dos aspectos de los ovocitos recuperados necesarios para comenzar el proceso de maduración: la vitalidad y el estadio nuclear. Ambos aspectos fueron analizados en relación a las características del cumulus que rodea al ovocito utilizando la clasificación de COCs inmaduros propuesta.

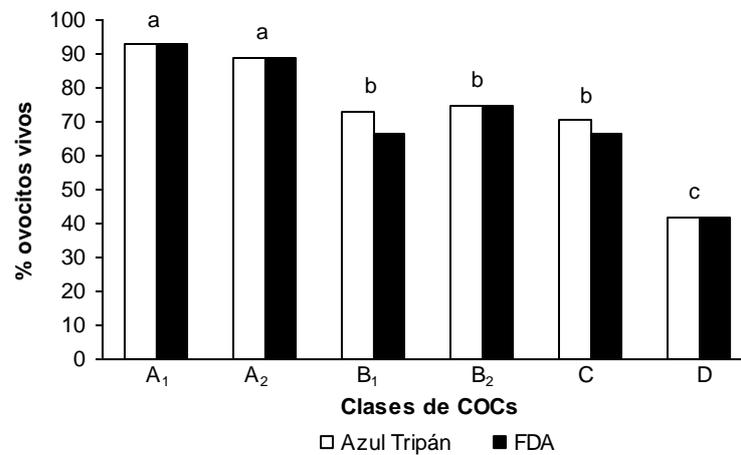
### **Evaluación de la vitalidad de los ovocitos inmaduros en las distintas clases de COCs**

Para establecer la vitalidad de los ovocitos se trabajó con dos técnicas basadas en diferentes propiedades de la célula, la permeabilidad selectiva de la membrana y la actividad enzimática, a fin de verificar la sensibilidad de la evaluación y poder utilizar el criterio más estricto.

Al evaluar la proporción de ovocitos inmaduros vivos con la técnica combinada de Azul Tripán y FDA (**Foto 2**) no se hallaron diferencias significativas entre ambas tinciones. Sin embargo, el FDA revela como muertos algunos ovocitos que no son identificados por el Azul Tripán, sugiriendo una mayor sensibilidad de aquella técnica (**Figura 11**). Al evaluar con ambas tinciones se observaron diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos inmaduros vivos entre clases de COCs, resultando significativamente superiores en aquellos ovocitos rodeados por un cumulus íntegro (clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>) ( $p < 0,05$ , Experimento 2) (**Figura 11**).



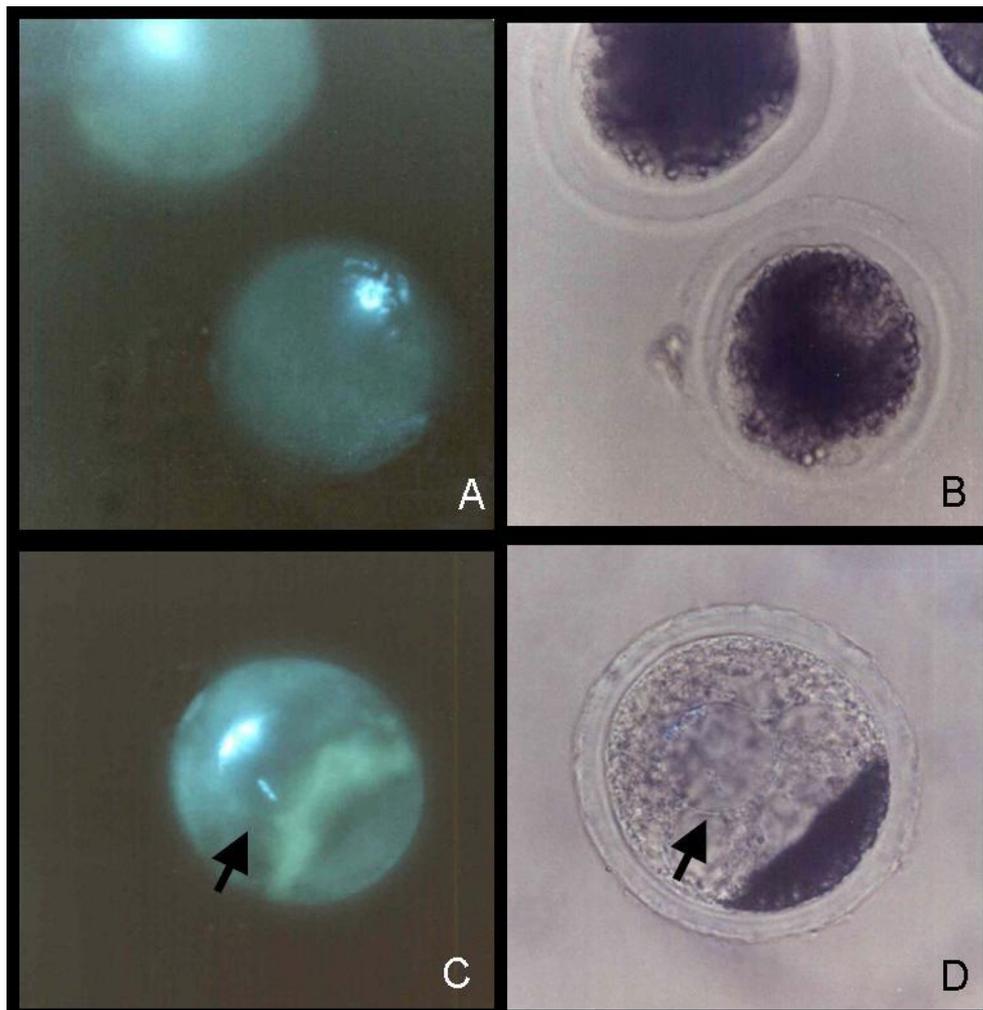
**Foto 2:** Ovocitos desnudos con tinción combinada de Azul Tripán y FDA. A y B, fotos apareadas: A – El ovocito vivo no se tiñe de azul. B – El mismo ovocito presenta fluorescencia de color verde. C y D, fotos apareadas: C – El ovocito muerto se tiñe de color azul. D – El mismo ovocito no presenta fluorescencia (125 x).



**Figura 11:** Porcentaje de ovocitos inmaduros vivos en las distintas clases de COCs. Cada ovocito fue teñido y evaluado con ambas técnicas. <sup>a, b, c</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente entre clases de COCs ( $p < 0,05$ ). No hay diferencia significativa entre Azul Tripán y FDA en la misma clase de COC. Experimento 2.  $n = 80 - 88$  ovocitos para cada clase.

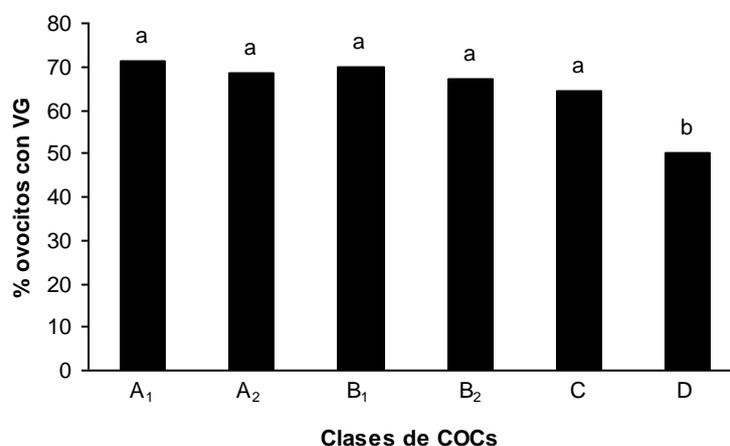
## Evaluación del estadio nuclear de los ovocitos inmaduros en las distintas clases de COCs

El alto contenido lipídico de los ovocitos porcinos no permitió la visualización directa por DIC de la vesícula germinal (**Foto 3B**). Luego de polarizar los lípidos mediante ultracentrifugación (8200 x *g* durante 30 minutos) la vesícula pudo ser identificada (**Foto 3D**). La presencia o ausencia de vesícula germinal observada por DIC presentó 100 % de coincidencia con la presencia o ausencia de material nuclear descondensado fluorescente en la misma ubicación según la coloración de Hoechst 33342 en todas las clases (n = 159), indicando que la observación de material nuclear descondensado fluorescente en el ovocito puede ser considerada como indicador del estadio de vesícula germinal (**Fotos 3A - C**).



**Foto 3:** A y B, fotos apareadas: A – Material nuclear descondensado fluorescente en ovocitos denudados utilizando tinción de Hoechst 33342. B – Ovocitos denudados utilizando DIC. C y D, fotos apareadas: C – Material nuclear descondensado fluorescente en ovocito denudado y centrifugado utilizando tinción de Hoechst 33342. D – Se observa la presencia de la vesícula germinal en ovocito denudado y centrifugado utilizando DIC. La flecha indica la vesícula germinal (250 x).

Al evaluar el estadio nuclear de los ovocitos inmaduros con la tinción de Hoechst 33342 y DIC no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de ovocitos inmaduros en estadio de vesícula germinal en cada clase, a excepción del bajo porcentaje observado en la clase D ( $p < 0,05$ , Experimento 3) (**Figura 12**).

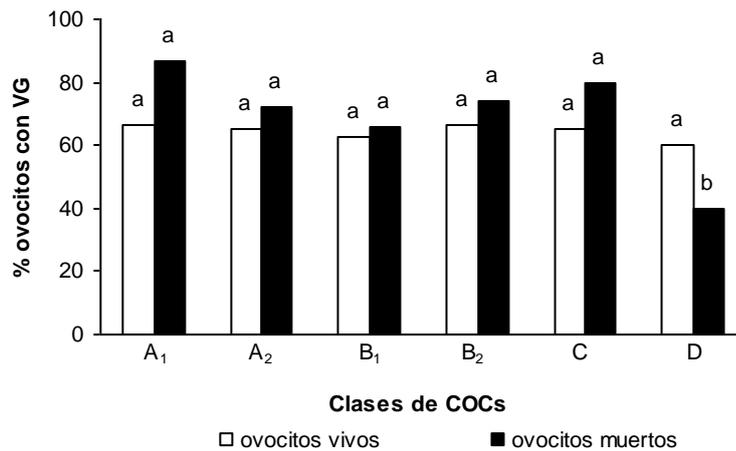


**Figura 12:** Porcentaje de ovocitos inmaduros en estadio de vesícula germinal (VG) en las distintas clases de COCs. <sup>a, b</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente entre clases de COCs ( $p < 0,05$ ). Experimento 3.  $n = 274 - 303$  ovocitos para cada clase.

### Evaluación simultánea de la vitalidad y el estadio nuclear de los ovocitos inmaduros en las distintas clases de COCs

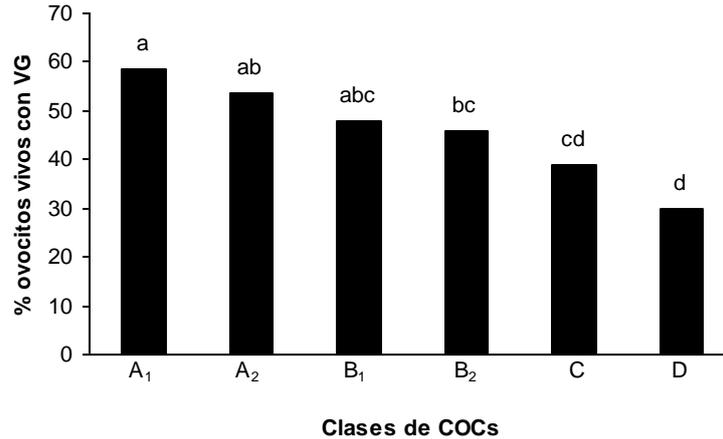
El hallazgo de gametos muertos y en un estadio nuclear inadecuado para los ovocitos inmaduros resultó llamativo. Por ello, se diseñó una experiencia que permitiera analizar ambos parámetros en forma simultánea para determinar si existía relación entre las alteraciones del material biológico recuperado.

Al realizar en forma combinada las tinciones fluorescentes de FDA y Hoechst 33342, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de ovocitos con vesícula germinal entre aquellos recuperados vivos o muertos en las diferentes clases de COCs, a excepción de la clase D ( $p < 0,05$ , Experimento 4) (**Figura 13**), indicando que la vitalidad del ovocito no está asociada al mantenimiento del estadio de vesícula germinal.



**Figura 13:** Porcentaje de ovocitos inmaduros vivos y muertos en estadio de vesícula germinal (VG) en las distintas clases de COCs. <sup>a, b</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente en la misma clase de COC ( $p < 0,05$ ). Experimento 4.  $n = 110 - 147$  ovocitos para cada clase.

Los porcentajes de ovocitos inmaduros recuperados vivos en estadio de vesícula germinal fueron significativamente superiores en las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> respecto de las clases C y D ( $p < 0,05$ , Experimento 4) (**Figura 14**).



**Figura 14:** Porcentaje de ovocitos inmaduros vivos en estadio de vesícula germinal (VG) en las distintas clases de COCs. <sup>a, b, c, d</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Experimento 4.  $n = 110 - 147$  ovocitos para cada clase.

### **Competencia de maduración de los ovocitos *in vitro***

El primer aspecto a ser evaluado del sistema de maduración *in vitro* fue la eficiencia obtenida con la metodología utilizada. Para ello se consideró la competencia de maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos inmaduros en relación a las características del cumulus según la clasificación propuesta.

### **Competencia de maduración nuclear de los ovocitos *in vitro***

Para la evaluación de la competencia de maduración nuclear fueron utilizados dos criterios en forma secuencial sobre el mismo ovocito. En primera instancia se examinó la extrusión del primer corpúsculo polar (**Foto 4**) y luego se verificó la presencia de la placa cromosómica en metafase II (**Foto 5**). El porcentaje de ovocitos en los que se observó presencia del primer corpúsculo polar fue mayor en la clase A<sub>1</sub> de COCs ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, los porcentajes de ovocitos en los que se verificó la

presencia de la placa cromosómica en metafase II fueron similares entre las distintas clases de COCs, a excepción de los bajos porcentajes observados en las clases C y D ( $p < 0,05$ ). Además debe mencionarse que sólo se observó asociación estadística entre ambos criterios de evaluación de la maduración nuclear en la clase A<sub>1</sub> ( $p < 0,05$ , Experimento 5) (**Figura 15**).

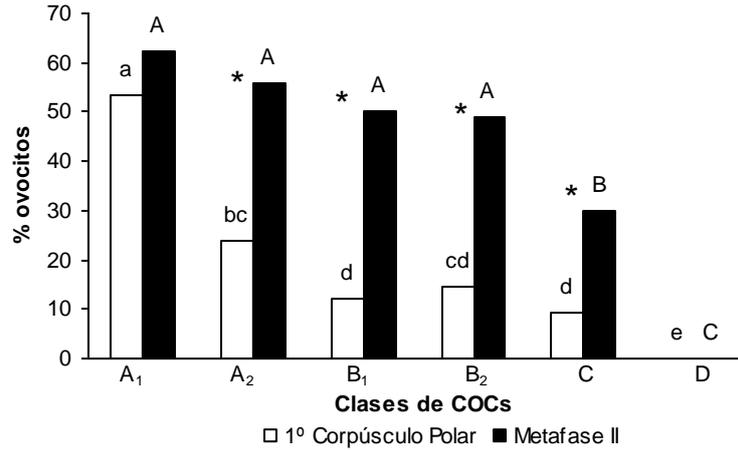
En las pruebas subsiguientes se utilizó la presencia de la placa cromosómica en metafase II para la evaluación de la maduración nuclear, ya que demostró ser el parámetro más adecuado en todas las clases de COCs.



**Foto 4:** Ovocito con 1º corpúsculo polar en el espacio perivitelino (250 x).



**Foto 5:** Placa cromosómica en metafase II de un ovocito con tinción de Giemsa (1000 x).

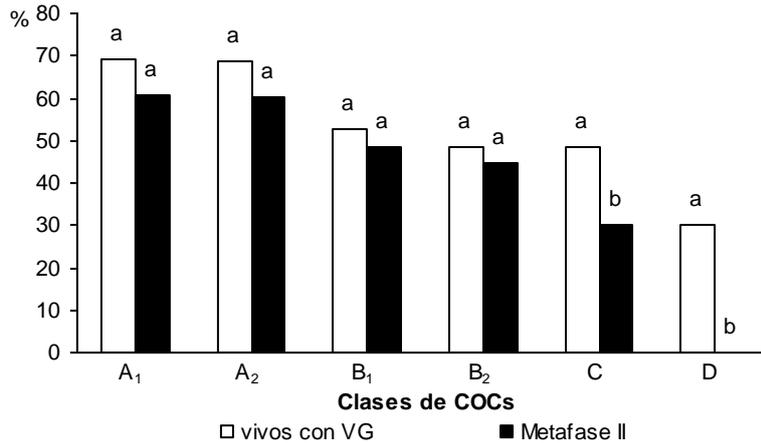


**Figura 15:** Porcentaje de ovocitos nuclearmente maduros en las distintas clases de COCs según los diferentes criterios de evaluación. a, b, c, d, e y A, B, C Barras con diferentes superíndices difieren significativamente entre clases de COCs al evaluar con el mismo criterio ( $p < 0,05$ ). \* Difieren significativamente en la misma clase de COC al evaluar con los diferentes criterios ( $p < 0,05$ ). Experimento 5.  $n = 84 - 100$  ovocitos para cada clase.

## Relación entre la calidad del ovocito inmaduro y la competencia de maduración nuclear *in vitro*

En las experiencias anteriores se puede apreciar que el porcentaje de ovocitos vivos en estadio de vesícula germinal fue similar al porcentaje de ovocitos capaces de alcanzar el estadio de metafase II luego del cultivo *in vitro*, sin embargo, se realizó un diseño de experimento particular para verificar la asociación entre ambos eventos. Para ello, los mencionados parámetros fueron evaluados en las mismas muestras de COCs con la intención de disminuir el posible error debido a la variabilidad del material recuperado en cada muestreo.

No se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de ovocitos inmaduros vivos en estadio de vesícula germinal y la tasa de ovocitos en metafase II luego de la maduración *in vitro* en las clases A y B, indicando que estos parámetros se encuentran asociados en dichas clases. Sin embargo, no se observó tal asociación en las clases C y D ( $p < 0,05$ , Experimento 6) (**Figura 16**).



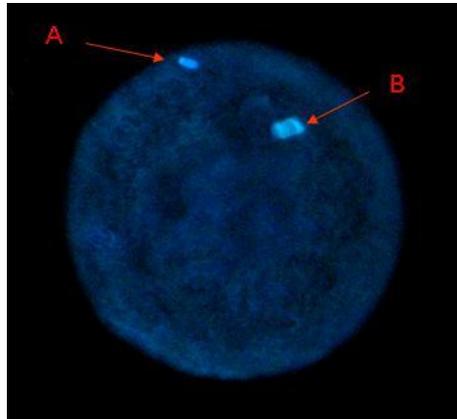
**Figura 16:** Porcentaje de ovocitos inmaduros vivos es estadio de vesícula germinal (VG) y porcentaje de ovocitos en metafase II en las distintas clases de COCs. <sup>a, b</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente en la misma clase de COC ( $p < 0,05$ ). Experimento 6.  $n = 120 - 129$  ovocitos para cada clase.

## Competencia de maduración citoplasmática de los ovocitos in vitro

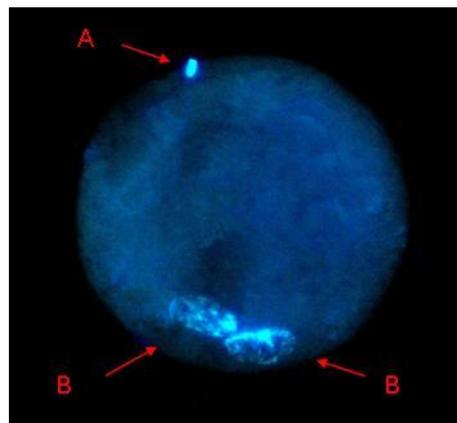
La adecuada maduración de los ovocitos requiere tanto de la maduración nuclear como de la citoplasmática. El éxito de la maduración nuclear puede ser evaluado con relativa facilidad, en cambio la evaluación de la maduración citoplasmática requiere de procedimientos más complejos como la fecundación *in vitro*. Por ello, la competencia de maduración citoplasmática sólo fue evaluada en las clases de COCs en las que se observó el mayor porcentaje de ovocitos en metafase II y que a su vez no presentaron diferencias significativas entre sí (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>).

El mayor porcentaje de maduración citoplasmática fue observado en la clase A<sub>1</sub> ( $p < 0,05$ ) (**Figura 17**). Si bien iguales porcentajes de descondensación de cabezas espermáticas (**Foto 6**) fueron observados entre las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, una mayor tasa de formación de pronúcleos (**Foto 7**) fue observado en la clase A<sub>1</sub> ( $p < 0,05$ , Experimento 7) (**Figura 17**). Los porcentajes de activación partenogenética espontánea en el estadio de pronúcleos (18 hs.) fueron: 0 % clase A<sub>1</sub>, 0 % clase A<sub>2</sub>, 0 % clase B<sub>1</sub> y 5 %

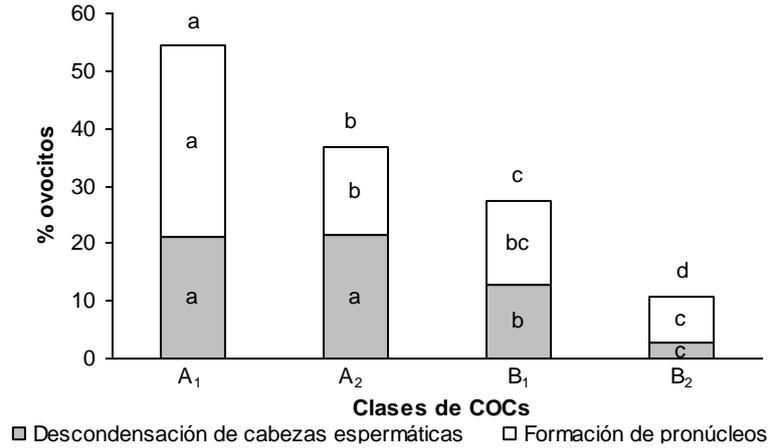
clase B<sub>2</sub> y en el estadio de embriones a las 48 hs. (2 o más blastómeros) fueron: 0% clase A<sub>1</sub>, 0 % clase A<sub>2</sub>, 10,5 % clase B<sub>1</sub> y 5,3 % clase B<sub>2</sub> (n = 18 – 20 para cada valor).



**Foto 6:** Ovocito fecundado con tinción Hoechst 33342 (250 x). A: cabeza espermática sin descondensar, B: cabeza espermática descondensada.



**Foto 7:** Ovocito fecundado con tinción Hoechst 33342 (250 x). A: cabeza espermática sin descondensar, B: pronúcleo.



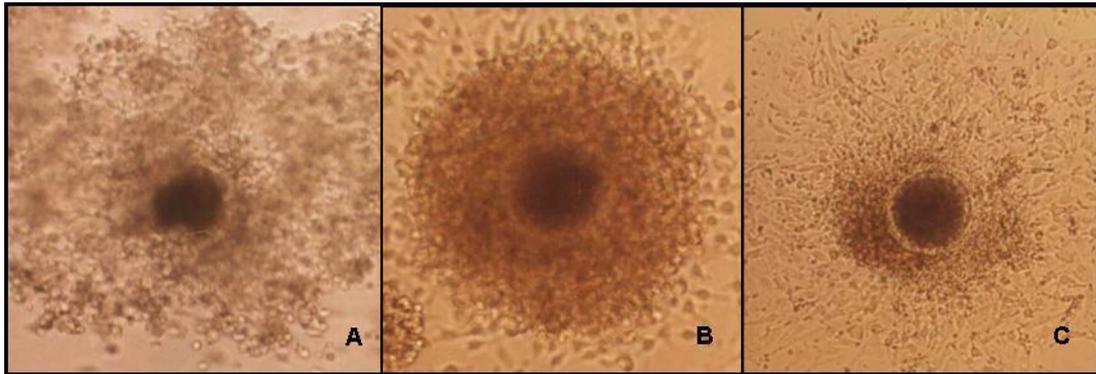
**Figura 17:** Porcentaje de ovocitos citoplasmáticamente maduros en las distintas clases de COCs. La maduración citoplasmática fue evaluada por descondensación de cabezas espermáticas y/o formación de pronúcleos. <sup>a, b, c, d</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente entre clases de COCs al evaluar con el mismo parámetro ( $p < 0,05$ ). Experimento 7.  $n = 176 - 187$  ovocitos para cada clase.

## **Relación entre la expansión del cumulus y la maduración de los ovocitos *in vitro***

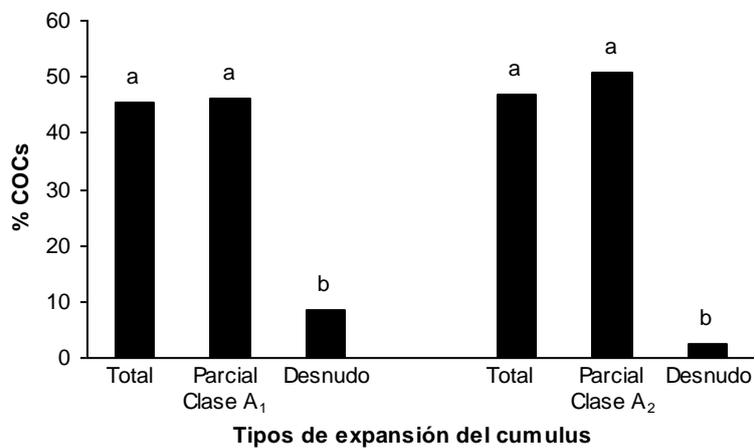
Durante el cultivo *in vitro* de las distintas clases de COCs se observaron diferentes comportamientos del cumulus. Es por eso que se evaluó la posible relación entre el tipo expansión del cumulus durante el cultivo y la maduración de los ovocitos.

### **Tipos de expansión del cumulus**

Debido al escaso cumulus que rodea al ovocito en las clases B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, a la falta de cumulus en la clase C y a las características propias de las células del cumulus en la clase D, la expansión del cumulus durante el cultivo *in vitro* sólo pudo ser evaluada en las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>. Se observaron tres patrones diferentes de expansión del cumulus (**Foto 8**). La distribución observada de los COCs madurados en los tres tipos de expansión del cumulus se muestra en la **Figura 18** (Experimento 8).



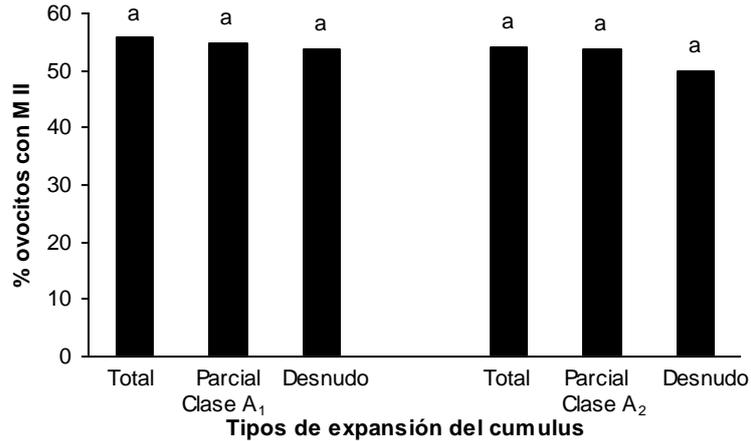
**Foto 8:** Tipos de expansión del cumulus en COCs madurados in vitro. A: expansión total, B: expansión parcial, C: denudación parcial espontánea.



**Figura 18:** Distribución porcentual de los COCs clase A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> madurados en los tres tipos de expansión del cumulus. <sup>a, b</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente en la misma clase de COC ( $p < 0,05$ ). Experimento 8.  $n = 154 - 162$  COCs para cada clase.

## Expansión del cumulus y maduración nuclear de los ovocitos

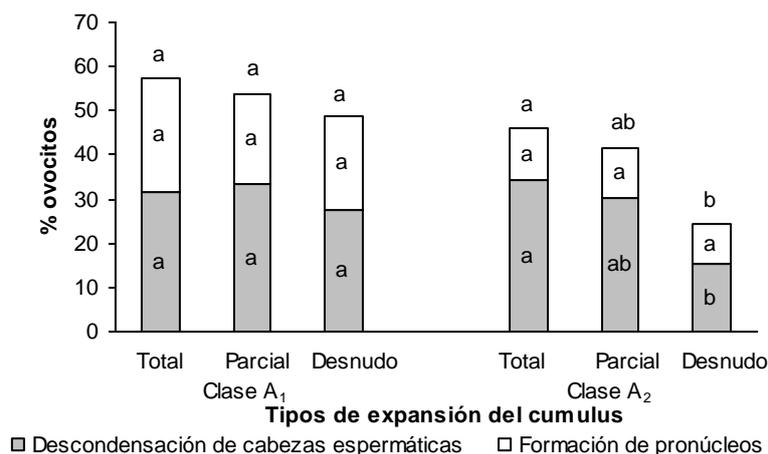
Al evaluar la maduración nuclear de los ovocitos en cada tipo de expansión del cumulus, no se observó diferencia en los porcentajes de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II (Experimento 8) (**Figura 19**).



**Figura 19:** Porcentaje de ovocitos en estadio de metafase II según los tipos de expansión del cumulus en las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> de COCs. <sup>a</sup> Barras con el mismo superíndice no difieren significativamente en la misma clase de COC. Experimento 8. n = 154 – 162 ovocitos para cada clase.

### Expansión del cumulus y maduración citoplasmática de los ovocitos

Al evaluar la maduración citoplasmática en cada tipo de expansión del cumulus, no se observó diferencia en los porcentajes de ovocitos que fueron capaces de descondensar cabezas espermáticas y/o formar pronúcleos, excepto en los ovocitos que mostraron denudación parcial espontánea en la clase A<sub>2</sub> en los que la descondensación de cabezas espermáticas y la maduración citoplasmática fueron menores que en los ovocitos con expansión total del cumulus ( $p < 0,05$ , Experimento 9) (Figura 20).



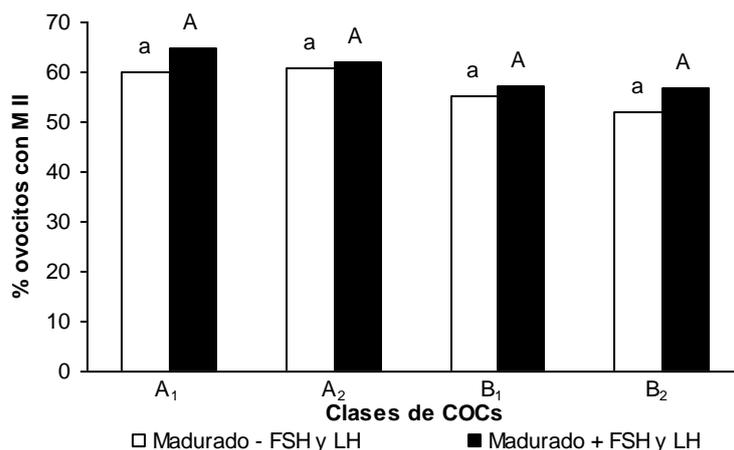
**Figura 20:** Porcentaje de ovocitos citoplasmáticamente maduros según los tipos de expansión del cumulus en las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> de COCs. La maduración citoplasmática fue evaluada por descondensación de cabezas espermáticas y/o formación de pronúcleos. <sup>a, b</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente en la misma clase de COC al evaluar con el mismo parámetro ( $p < 0,05$ ). Experimento 9.  $n = 147 - 176$  ovocitos para cada clase.

### **Efecto de las gonadotrofinas sobre la maduración de los ovocitos *in vitro***

Para realizar la evaluación del sistema de maduración *in vitro* utilizado, se debió determinar la influencia de la adición de gonadotrofinas al medio de cultivo tanto en la maduración nuclear como en la citoplasmática de los ovocitos.

### **Efecto de las gonadotrofinas sobre la maduración nuclear de los ovocitos *in vitro***

No se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II luego de la maduración en ausencia o presencia de gonadotrofinas en ninguna de las clases evaluadas. Además, el porcentaje de maduración nuclear resultó similar entre las distintas clases de COCs (Experimento 10) (**Figura 21**).

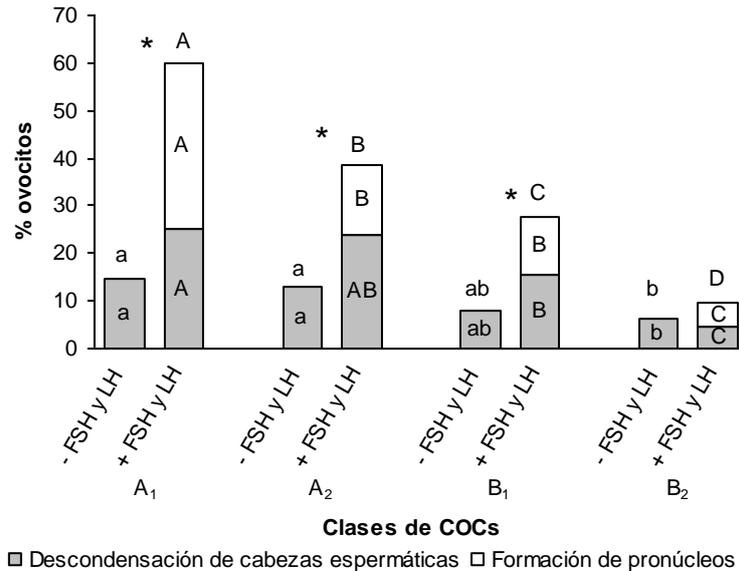


**Figura 21:** Porcentaje de ovocitos en metafase II en las distintas clases de COCs madurados en ausencia y presencia de FSH y LH. <sup>a</sup> y <sup>A</sup> Barras con igual superíndice no difieren significativamente entre clases de COCs. No hay diferencia significativa entre Madurado – FSH y LH vs. Madurado + FSH y LH en la misma clase de COC. Experimento 10. n = 91 – 100 ovocitos para cada valor.

### Efecto de las gonadotrofinas sobre la maduración citoplasmática de los ovocitos in vitro

Los porcentajes de maduración citoplasmática resultaron superiores en todas las clases de COCs en presencia de gonadotrofinas ( $p < 0,05$ ), excepto en la clase B<sub>2</sub>. Los mayores porcentajes de maduración citoplasmática y de formación de pronúcleos fueron observados en la clase A<sub>1</sub> en presencia de gonadotrofinas ( $p < 0,05$ ). No se observó formación de pronúcleos al madurar los COCs en ausencia de gonadotrofinas (Experimento 11) (**Figura 22**).

Los porcentajes de activación partenogenética espontánea en el estadio de pronúcleos (18 hs.) fueron: 0 % clase A<sub>1</sub>, 0 % clase A<sub>2</sub>, 0 % clase B<sub>1</sub> y 0 % clase B<sub>2</sub> en el medio control y 0 % clase A<sub>1</sub>, 0 % clase A<sub>2</sub>, 0 % clase B<sub>1</sub> y 6,7 % clase B<sub>2</sub> en el medio suplementado con gonadotrofinas (n = 10 – 15 para cada valor).



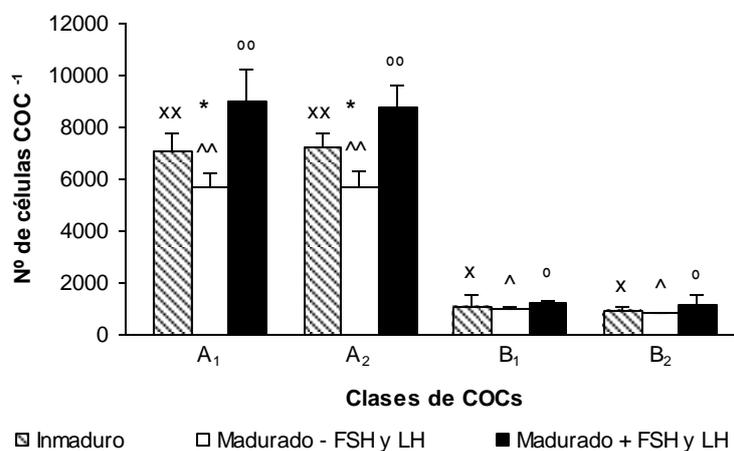
**Figura 22:** Porcentaje de ovocitos citoplasmáticamente maduros en las distintas clases de COCs madurados en ausencia y presencia de FSH y LH. <sup>a, b y A, B, C, D</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente entre clases de COCs al evaluar con el mismo parámetro ( $p < 0,05$ ). \* Difieren significativamente en la misma clase de COC madurado – FSH y LH vs. madurado + FSH y LH ( $p < 0,05$ ). Experimento 11.  $n = 140 - 148$  ovocitos para cada valor.

### Número de células del cumulus en las distintas clases de COCs

Para lograr una mejor descripción de las diferencias morfológicas observadas bajo lupa estereoscópica entre las clases de COCs inmaduros, se evaluó el número de células del cumulus en cada clase. Además, se contempló la posible variación del parámetro en la maduración *in vitro* para ampliar el análisis del comportamiento del cumulus durante el proceso.

Se observó mayor número de células del cumulus en los COCs pertenecientes a las clases A respecto a las clases B ( $p < 0,05$ ), no hallándose diferencia entre A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> ni entre B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, ya sea en COCs inmaduros o madurados en ausencia o presencia de gonadotrofinas. Durante la maduración *in vitro* se detectó aumento en el número de células del cumulus en las clases A en presencia de gonadotrofinas ( $p < 0,05$ ) y disminución en los COCs madurados sin gonadotrofinas ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, en

las clases B no se observó variación en el número de células del cumulus debida a la maduración *in vitro* en ninguna de las condiciones utilizadas (Experimento 12) (**Figura 23**).



**Figura 23:** Número de células del cumulus en las distintas clases de COCs inmaduros y madurados *in vitro*. <sup>xx, yy, zz</sup> <sup>xy, yz, xz</sup> <sup>oo</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente entre clases de COCs ( $p < 0,05$ ). \* Difieren significativamente en la misma clase de COC entre las tres condiciones: Inmaduro, Madurado – FSH y LH, Madurado + FSH y LH ( $p < 0,05$ ). Experimento 12.  $n = 30$  para cada valor.

## Discusión

Los sistemas de producción de embriones *in vitro* en rumiantes han sido ampliamente desarrollados y sus técnicas extrapoladas a otras especies de interés pecuario. Sin embargo, el menor éxito de la maduración de ovocitos *in vitro*, fecundación y producción de embriones en el porcino (Wang y col., 1997; Qian y col., 2003; Algriany y col., 2004) demuestran que tal extrapolación no es recomendable en esta especie. La selección de ovocitos bovinos de acuerdo a la compactación y número de capas de células del cumulus de los COCs ha mostrado un efecto positivo en los porcentajes de maduración *in vitro*, fecundación, clivaje y desarrollo hasta el

estadio de mórula y blastocisto (Shioya y col., 1988; Cetica y col., 1999a; Khurana y Niemann, 2000). Varios reportes sobre maduración y producción de embriones *in vitro* en la especie porcina describen la selección de COCs con al menos dos capas compactas de células del cumulus (Gandhi y col., 2001; Stokes y col., 2005). Sin embargo, una importante proporción de ovocitos inmaduros con cumulus de características diferentes son recuperados habitualmente durante la recolección a partir de ovarios de faena. Por tal motivo, la totalidad de los COCs recuperados fueron clasificados en seis clases de acuerdo a las características del cumulus y se evaluó la calidad del ovocito inmaduro y su relación con la competencia de maduración.

La calidad del ovocito porcino inmaduro fue evaluada en cada clase en términos de ovocitos vivos en estadio de vesícula germinal. Una diferencia importante en la recuperación de ovocitos de folículos ováricos entre bovino y porcino es la proporción de ovocitos muertos en los COCs recolectados. La vitalidad determinada tanto por FDA como por Azul Tripán mostró ovocitos porcinos muertos en todas las clases de COCs, estando el porcentaje de ovocitos vivos asociado con las características del cumulus. Por otro lado, en la especie bovina ha sido observada la supervivencia de todos los ovocitos independientemente de la clase de COC, trabajando con similares condiciones de transporte de los ovarios (Cetica y col., 1999a). Debe considerarse que el bajo porcentaje de maduración alcanzado en la especie porcina no puede ser totalmente atribuido a la presencia de ovocitos muertos. Ya que por ejemplo en la clase A<sub>1</sub> los ovocitos muertos sólo representan el 7,1 % mientras que en la misma clase los porcentajes de falla en la maduración nuclear y citoplasmática alcanzan el 37,8 % y 45,5 %, respectivamente.

Al igual que en el bovino el estadio nuclear de vesícula germinal en el ovocito porcino inmaduro parece estar íntimamente relacionado con la maduración meiótica (Cetica y col., 1999a). El porcentaje de ovocitos inmaduros en estadio de vesícula germinal mostró coincidencia con el porcentaje de ovocitos con metafase II luego del cultivo *in vitro* en las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>. Esto sugiere que, entre los parámetros

considerados, el estadio de vesícula germinal en el ovocito inmaduro sería el factor más relevante para la progresión nuclear hasta metafase II. Basándose en la observación que al remover las células de cumulus durante la maduración de ovocitos porcinos *in vitro* se inicia la progresión meiótica con ruptura de la vesícula germinal, Isobe y col. (1996) sugirieron que una inadecuada función del cumulus podría ser la causa de la maduración nuclear precoz. Un fenómeno similar fue observado en ovocitos de humano, mono y equino obtenidos de folículos atrésicos, los que se sabe que adelantan el reinicio de la maduración nuclear (Gougeon y Testart, 1986; Lefèvre y col., 1987, 1988; Hinrichs y Williams, 1997). De modo similar, la ruptura de la vesícula germinal temprana observada en todos los ovocitos porcinos inmaduros de la clase D podría deberse al reinicio precoz de la meiosis en los ovocitos ováricos determinados a la atresia, como ha sido descrito en ratón, ovino y bovino (Oakberg, 1979; Murdoch, 1992; Assey y col., 1994; Cetica y col., 1999a).

En la primera aproximación para evaluar la competencia de maduración, se observó que un similar porcentaje de ovocitos alcanzaron el estadio de metafase II en las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, mostrando la importancia de ampliar la evaluación en esas clases. La presencia del primer corpúsculo polar es comúnmente utilizada para evaluar la maduración nuclear en roedores, rumiantes, equinos y humanos, en los que su presencia coincide con el estadio de metafase II (Eppig y Koide, 1978; Saeki y col., 1991; Hardarson y col., 2000; Dalvit, 2003; Choi y col., 2004). Resulta llamativo que tal asociación sólo fue observada en los ovocitos porcinos pertenecientes a la clase A<sub>1</sub>. La proporción de maduración similar al evaluar por la presencia del primer corpúsculo polar y por la presencia de la placa cromosómica en metafase II en otras especies posiblemente se debe al corto lapso de tiempo entre ambos eventos. En cambio en el porcino, el mayor número de ovocitos con extrusión del primer corpúsculo polar es observado a las 33 hs. y con metafase II a las 48 hs. de cultivo (Ocampo y col., 1991). La degeneración del primer corpúsculo polar podría ocurrir en algunos ovocitos debido al amplio período de tiempo entre la extrusión del mismo y la aparición de la metafase

II en esta especie. Además los bajos porcentajes de ovocitos con primer corpúsculo polar observados en las clases A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y C, sugieren que dicho evento estaría asociado con las características del cumulus. Una maduración asincrónica entre las clases de COCs porcinos podría ser la explicación para las diferencias observadas entre ambos parámetros utilizados para evaluar la maduración nuclear. Posiblemente un sustento diferente por parte del cumulus en cada clase durante el cultivo *in vitro* esté asociado con tal asincronía.

Aunque la evaluación de la maduración nuclear mediante la metafase II no mostró diferencias entre las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, la aptitud de los ovocitos de la clase A<sub>1</sub> para madurar citoplasmáticamente fue significativamente mayor que en las otras clases. Asimismo la formación de pronúcleos parecería estar involucrada en tal capacidad. Sólo en los COCs clase A<sub>1</sub> madurados *in vitro* la maduración nuclear y citoplasmática alcanzaron porcentajes similares, indicando que habría sincronía entre ambos eventos sólo en los ovocitos rodeados por un cumulus completo y oscuro. Varios autores han observado mayor porcentaje de maduración nuclear que citoplasmática en los ovocitos porcinos (Schoevers y col., 2003; Algriany y col., 2004), probablemente la falta de criterios minuciosos en la selección de COCs inmaduros sea la causa de tal discrepancia.

La maduración citoplasmática es un proceso complejo en comparación con la maduración nuclear. La participación del cumulus de modo diferencial durante el cultivo *in vitro* podría ser una de las explicaciones para las diferencias en los porcentajes de maduración citoplasmática observados entre las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>. La relación entre la expansión del cumulus y la maduración del ovocito ha sido estudiada por varios autores. Algriany y col. (2004) observaron mayor expansión del cumulus y mayor porcentaje de maduración nuclear al suplementar el medio de cultivo con fluido folicular porcino. Los mismos autores atribuyeron la gran variación en el grado de expansión del cumulus entre ovocitos individuales a la heterogeneidad en la población de ovocitos. Del mismo modo, al suplementar el medio de cultivo con fluido

folicular porcino, Qian y col. (2003) propusieron que el área del cumulus expandido podría ser utilizada como un parámetro de predicción del desarrollo de ovocitos porcinos madurados y fecundados *in vitro*, aunque no observaron relación con la maduración nuclear. Somfai y col. (2004) evaluaron la expansión del cumulus en COCs individualmente y sugirieron que el diverso comportamiento de las células del cumulus durante el cultivo *in vitro* afecta la maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos porcinos. Los experimentos planteados en la tesis estuvieron enfocados en la evaluación de la expansión del cumulus en forma individual para cada COC, ya que este podría resultar como un método no invasivo de evaluación de la maduración en las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>. Sin embargo, no se observó relación entre el grado de expansión del cumulus y la maduración nuclear o citoplasmática. La falta de expansión del cumulus en las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> no tuvo influencia en la capacidad de completar la maduración nuclear o citoplasmática de los ovocitos. Por lo tanto, de acuerdo con los resultados presentados, la competencia de maduración de los ovocitos porcinos estaría más estrechamente relacionada con las características del cumulus del COC inmaduro que con el comportamiento del cumulus durante el cultivo *in vitro*.

Ha sido observado anteriormente que, a pesar de la capacidad de los ovocitos porcinos de madurar meióticamente en ausencia de gonadotrofinas, estas hormonas tienen un efecto estimulador sobre la maduración nuclear y citoplasmática durante el cultivo *in vitro* (Mattioli y col., 1991; Sun y col., 2001; Schoevers y col., 2003). Sin embargo, en las experiencias realizadas en el presente trabajo sólo pudo evidenciarse tal efecto sobre la maduración citoplasmática de los ovocitos. Esta discrepancia podría deberse a la composición no definida del medio utilizado debida al suplemento con suero fetal bovino y/o al diferente origen de las hormonas FSH y LH.

Las determinaciones del número de células del cumulus en COCs inmaduros y madurados *in vitro* no mostraron diferencias entre las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, indicando que las diferencias morfológicas observadas no estarían relacionadas con el número de células. Las características del cumulus inmaduro podrían ser afectadas por otros

factores, tales como la cantidad y composición de matriz intercelular, la cantidad y tipos de uniones intercelulares, no quedando claro aún el origen de las diferencias morfológicas observadas. Por lo tanto, la mayor formación de pronúcleos en los ovocitos de la clase A<sub>1</sub> en comparación con los de la clase A<sub>2</sub> no puede ser atribuido al grado de expansión ni al número de células del cumulus. Otras causas como el comportamiento metabólico de los COCs y la asincronía entre la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito podrían ser responsables de dicha diferencia. La disminución en el número de células del cumulus durante la maduración en ausencia de gonadotrofinas observada en las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> sugiere que se produciría pérdida de células si el cumulus no es estimulado hormonalmente durante el cultivo *in vitro*. En células de la granulosa de folículos antrales tempranos y preovulatorios de rata ha sido sugerido que durante el cultivo *in vitro* las gonadotrofinas actuarían como factores de supervivencia previniendo la apoptosis celular, proponiéndose que esta acción ejercida por las gonadotrofinas sería al menos en parte mediada por el factor de crecimiento IGF-I (Chun y col., 1994; 1996). Este efecto podría ocurrir también en las células del cumulus siendo la apoptosis debida a la falta de estímulo hormonal una posible explicación para la disminución del número de células observada. Por otro lado, cuando la maduración se realizó en presencia de FSH y LH se observó aumento en el número de células del cumulus en las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, sugiriendo que la proliferación celular se produce en respuesta al estímulo gonadotrófico. Este efecto de las hormonas ha sido anteriormente demostrado en los COCs bovinos (Gutnisky y col., 2007). En células de la granulosa porcinas se ha descrito el efecto de las gonadotrofinas estimulando la producción de IGF-I (Hsu y Hammond, 1987; Hatey y col., 1992), habiéndose propuesto también el sinergismo de las gonadotrofinas y el IGF-I estimulando la proliferación de células ováricas (Adashi y col., 1985; Hammond y col., 1991). En los COCs con cumulus formado por la corona radiata y en aquellos parcialmente desnudos (clases B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>) no se produjo variación en el número de células del cumulus durante la maduración en ausencia o presencia de gonadotrofinas.

A diferencia de los cumulus íntegros que parecerían necesitar de la estimulación gonadotrófica para evitar el descenso en el número de células, estas clases de COCs serían independientes del estímulo. Las células más cercanas al ovocito podrían recibir estímulos tróficos desde el gameto, siendo así mantenidas durante el cultivo en ausencia de gonadotrofinas. Ha sido ya sugerido anteriormente que factores secretados por el ovocito facilitarían la proliferación de células de la granulosa y regularían el desarrollo folicular (Vanderhyden y col., 1992; Miyano, 2003). Por otro lado, la falta de división celular durante el cultivo en presencia de gonadotrofinas en estas clases de COCs podría deberse a diferencias en la respuesta a la FSH y a la LH respecto a las células de los cumulus íntegros.

Resumiendo, aunque los porcentajes de ovocitos inmaduros vivos estarían relacionados con las características del cumulus, el estadio de vesícula germinal del ovocito inmaduro sería el factor principalmente involucrado en la progresión nuclear hasta metafase II. Los porcentajes similares de metafase II observados en las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> sugieren que la maduración nuclear puede completarse independientemente de las características del cumulus en esas clases. Contrariamente, el mayor porcentaje de formación de pronúcleos obtenido en la clase A<sub>1</sub> indicaría una mayor dependencia de la maduración citoplasmática con las características del cumulus. No se observaron diferencias en los porcentajes de maduración nuclear o citoplasmática al evaluarse en cada tipo de expansión del cumulus. Por lo tanto, la competencia de maduración del ovocito porcino parecería estar más relacionada con las características del cumulus del COC inmaduro que con el comportamiento del cumulus durante el cultivo *in vitro*. Es generalmente aceptado que la calidad del ovocito impacta en las diferentes fases de la producción de embriones *in vitro*. La selección de COCs parece ser crucial para la calidad del ovocito. Sin embargo otros aspectos, como la actividad metabólica de los diferentes tipos de cumulus durante la maduración *in vitro*, podrían cooperar de modo diferencial al proceso de maduración del ovocito. La clasificación morfológica de los COCs

inmaduros propuesta permitiría seleccionar ovocitos con mayor competencia de maduración, debiendo ser dilucidada aún la participación del comportamiento metabólico de los COCs en la competencia de maduración de los ovocitos.

## **Capítulo 2**

### **Metabolismo de hidratos de carbono en los complejos ovocito-cumulus durante la maduración in vitro**

## Introducción

En el porcino, distintas hexosas fueron probadas como sustrato durante la maduración de ovocitos y el cultivo embrionario *in vitro*. La galactosa resultó ser un sustrato inadecuado para ambos eventos. Por el contrario, la presencia tanto de glucosa como de fructosa en el medio de cultivo incrementaron la habilidad de los ovocitos de alcanzar el estadio de metafase II y luego desarrollar hasta el estadio de blastocisto tras la fecundación *in vitro*. Sin embargo, con glucosa en el medio de maduración se obtuvieron los mayores porcentajes de metafase II, por lo que se la consideró el sustrato más adecuado para esta etapa. En cambio, al adicionar fructosa al medio de cultivo de embriones, el número de células de los blastocistos fue mayor y el daño en el ADN resultó menor, por lo que se la consideró el sustrato más adecuado para el desarrollo embrionario (Wongsrikeao y col., 2006).

En el ratón, ha sido demostrada una estrecha relación entre la disponibilidad de glucosa en el medio de maduración y el progreso de la meiosis (Downs, 1995). De igual modo, una adecuada concentración de glucosa presente en el medio de cultivo contribuye al proceso de maduración y posterior desarrollo embrionario en el bovino (Rose-Hellekant y col., 1998; Lim y col., 1999; Khurana y Niemann, 2000). Incluso se ha sugerido en esta especie que la concentración de glucosa en el medio de cultivo actuaría regulando la ruptura de la vesícula germinal (Sutton-McDowall y col., 2005). En el porcino, el agregado de glucosa en el medio de maduración aceleró el progreso de la meiosis (Sato y col., 2007) e incrementó la habilidad de los ovocitos de completar la maduración nuclear (Wongsrikeao y col., 2006; Funahashi y col., 2008). Además, se ha sugerido que el metabolismo de la glucosa estaría involucrado no sólo en mecanismos de control de la maduración nuclear, sino también de la maduración

citoplasmática en el ovocito porcino, favoreciendo el desarrollo embrionario también en esta especie (Krisher y col., 2007).

En roedores, se sugirió que las células del cumulus desempeñan un importante papel como soporte nutricional proveyendo intermediarios glucolíticos al ovocito para su crecimiento y maduración (Biggers y col., 1967; Donahue y Stern, 1968; Leese y Barton, 1984; Buccione y col., 1990). Las células del cumulus serían las encargadas de catabolizar glucosa para obtener energía y además producir piruvato y/o lactato para ser utilizados como sustratos oxidativos para la obtención de energía por el ovocito bovino (Brackett y Zuelke, 1993; Cetica et al, 1999b). También se observó que el ovocito durante la maduración puede utilizar intermediarios del ciclo de Krebs como fuente de energía (Zuelke y Brackett, 1993; Brackett y Zuelke, 1993; Rieger y Loskutoff, 1994; Cetica y col., 2003). En el porcino los datos acerca del perfil metabólico de los COCs en el proceso de maduración son escasos y preliminares (Eroglu, 1993; Sturmey y Leese, 2003).

La conversión de glucosa a lactato en las células generalmente se produce bajo condiciones de anaerobiosis (Claremburg, 1992b). Sin embargo se determinó que el fluido de los folículos antrales tardíos no es anóxico y que la presión parcial de oxígeno es cercana a la detectada en sangre venosa (Shalgi y col., 1972; Gosden y col., 1988). Fue propuesto que en las células somáticas del folículo ovárico se produce el fenómeno denominado "glucólisis aeróbica" que consiste en el consumo de glucosa y la producción de lactato pero en presencia de oxígeno, el cual fue descrito en tumores de rápido crecimiento, células normales con alto potencial proliferativo y embriones (Hume y Weidemann, 1979; Morgan y Faik, 1981; Mandel, 1986; Gardner y Leese, 1990).

Se ha observado que se producen importantes cambios metabólicos en los COCs en respuesta a la estimulación hormonal. Las gonadotrofinas incrementan la producción de lactato en los folículos de rata, ratón y humano aumentando la actividad glucolítica en las células del cumulus y de la granulosa (Billig y col., 1983; Harlow y

col., 1987; Boland y col., 1993; Gull y col., 1999). En el ratón, la reanudación de la meiosis inducida por las gonadotrofinas es dependiente de la presencia de glucosa (Fagbohun y Downs, 1992; Downs y Mastropolo, 1994). También en el ratón la FSH incrementa la actividad de la enzima hexoquinasa, la glucólisis, el consumo de glucosa y la producción de lactato de los COCs (Downs y col., 1996, 1997; Downs y Utecht, 1999). Incluso las células del cumulus aumentan la captación de glucosa mediante la translocación de los transportadores GLUT4 a la membrana celular en respuesta a esta hormona (Roberts y col, 2004). Por otro lado, la presencia de gonadotrofinas durante la maduración *in vitro* incrementa el consumo de glucosa y la actividad de la vía glucolítica en los COCs bovinos (Zuelke y Brackett, 1992; Gutnisky y col., 2007).

Si bien se ha comprobado la importancia de la presencia de glucosa en el medio de cultivo para el progreso de la maduración del ovocito porcino, la influencia de la vía glucolítica y su modulación en el proceso de maduración *in vitro* no ha sido evaluada en profundidad.

## **Materiales y métodos**

### ***Maduración de los ovocitos in vitro***

Se utilizaron las condiciones de maduración detalladas en la sección general con las particularidades descritas a continuación. En las experiencias para la evaluación del efecto de las gonadotrofinas fue utilizado como control el mismo medio de maduración sin el agregado de FSH y LH. Para complementar el estudio de la influencia del cumulus en la vía glucolítica, los ovocitos fueron desnudados y luego madurados en medio suplementado con FSH y LH. En las experiencias realizadas para evaluar la influencia del agregado de reguladores de la glucólisis al medio de

maduración, el medio de cultivo fue adicionado con NaF (Biopack, Buenos Aires, Argentina), ATP o AMP a diferentes concentraciones. Para completar la evaluación del efecto del AMP se realizaron experiencias en las que el medio sin FSH y LH fue adicionado con AMP a diferentes concentraciones. Para determinar el consumo de glucosa y la producción de lactato, los COCs fueron madurados individualmente en gotas de 20  $\mu$ l.

### ***Consumo de glucosa y producción de lactato***

Luego de la maduración *in vitro*, cada COC fue removido de su respectiva gota de 20  $\mu$ l, se determinó el contenido de glucosa y lactato en el medio de cultivo remanente y la maduración meiótica del ovocito correspondiente a cada gota.

La concentración de glucosa se determinó espectrofotométricamente mediante la oxidación del azúcar en presencia de glucosa oxidasa y la cuantificación del peróxido de hidrógeno resultante (Barham y Trinder, 1972). La concentración de lactato se determinó espectrofotométricamente mediante la oxidación del lactato por la enzima lactato oxidasa y la cuantificación del peróxido de hidrógeno resultante (Barham y Trinder, 1972). En cada experimento fueron incluidas gotas de 20  $\mu$ l de medio de maduración sin COCs como control de la concentración de glucosa y lactato. Los nmoles de glucosa consumida por COC se calcularon por la diferencia entre la concentración en las gotas de medio de cultivo sin COCs y la concentración en las gotas de medio en las que maduraron los COCs. Los nmoles de lactato producido por COC se calcularon por la diferencia entre la concentración de lactato en las gotas de medio en las que maduraron los COCs y la concentración en las gotas de medio de cultivo sin COCs.

## ***Evaluación de la vitalidad de los COCs madurados in vitro***

Los COCs madurados fueron incubados en una solución de FDA 0,25 µg% (m/v) en PBS durante 10 minutos a 37°C en ambiente humidificado. Luego de ser lavados en PBS fueron observados bajo microscopía de epifluorescencia (filtro de 510 nm) a 125 x, las células del cumulus y los ovocitos vivos presentan fluorescencia verde debido a la presencia de esterasas intracelulares activas, mientras que las células muertas no presentan fluorescencia (Hoppe y Bavister, 1984).

## ***Diseño de experimentos y análisis estadístico***

Experimento 13: Para evaluar la influencia de las características del cumulus que rodea al ovocito y de las gonadotrofinas en la vía glucolítica, los COCs pertenecientes a las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> fueron madurados *in vitro* individualmente en presencia y ausencia de gonadotrofinas. Luego se determinó el estado de maduración meiótica del ovocito, el consumo de glucosa y la producción de lactato por COC. Las comparaciones estadísticas de los porcentajes de maduración fueron realizadas por la prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado y las del consumo de glucosa y producción de lactato mediante un ensayo factorial 4 x 2 x 2. El grado de asociación entre el consumo de glucosa y la producción de lactato se analizó mediante la correlación de Pearson.

Experimento 14: Para verificar la participación del ovocito en el consumo de glucosa y la producción de lactato del COC, ovocitos pertenecientes a la clase A<sub>1</sub> de COC fueron desnudados y luego madurados *in vitro* individualmente en presencia de gonadotrofinas. Al concluir las 48 hs. de cultivo se determinó el estado de maduración meiótica del gameto, el consumo de glucosa y la producción de lactato por ovocito.

Experimento 15: Para evaluar el efecto del NaF en la vía glucolítica, COCs pertenecientes a la clase A<sub>1</sub> fueron madurados *in vitro* individualmente en presencia de

gonadotrofinas y con diversas concentraciones de NaF. Luego se determinó el estado de maduración meiótica del ovocito, el consumo de glucosa y la producción de lactato por COC. Las comparaciones estadísticas de los porcentajes de maduración fueron realizadas por la prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado y las del consumo de glucosa y producción de lactato mediante ANOVA. El grado de asociación entre el consumo de glucosa y la producción de lactato se analizó mediante la correlación de Pearson.

Experimento 16: Para evaluar el efecto del NaF en la vitalidad de las células del cumulus y del ovocito, COCs pertenecientes a la clase A<sub>1</sub> fueron madurados *in vitro* en presencia de gonadotrofinas y con diversas concentraciones de NaF. Luego se determinó el porcentaje de COCs con las células del cumulus vivas y con ovocitos vivos. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas por la prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado.

Experimento 17: Para evaluar el efecto del ATP en la vía glucolítica, COCs pertenecientes a la clase A<sub>1</sub> fueron madurados *in vitro* individualmente en presencia de gonadotrofinas y con diversas concentraciones de ATP. Luego se determinó el estado de maduración meiótica del ovocito, el consumo de glucosa y la producción de lactato por COC. Las comparaciones estadísticas de los porcentajes de maduración fueron realizadas por la prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado y las del consumo de glucosa y producción de lactato mediante ANOVA. El grado de asociación entre el consumo de glucosa y la producción de lactato se analizó mediante la correlación de Pearson.

Experimento 18: Para evaluar el efecto del ATP en la vitalidad de las células del cumulus y del ovocito, COCs pertenecientes a la clase A<sub>1</sub> fueron madurados *in vitro* en presencia de gonadotrofinas y con diversas concentraciones de ATP. Luego se determinó el porcentaje de COCs con las células del cumulus vivas y con ovocitos vivos. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas por la prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado.

Experimento 19: Para evaluar el efecto del AMP en la vía glucolítica, COCs pertenecientes a la clase A<sub>1</sub> fueron madurados *in vitro* individualmente en presencia de gonadotrofinas y con diversas concentraciones de AMP. Luego se determinó el estado de maduración meiótica del ovocito, el consumo de glucosa y la producción de lactato por COC. Las comparaciones estadísticas de los porcentajes de maduración fueron realizadas por la prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado y las del consumo de glucosa y producción de lactato mediante ANOVA. El grado de asociación entre el consumo de glucosa y la producción de lactato se analizó mediante la correlación de Pearson.

Experimento 20: Para completar la evaluación del efecto del AMP en la vía glucolítica, COCs pertenecientes a la clase A<sub>1</sub> fueron madurados *in vitro* individualmente en ausencia de gonadotrofinas y con diversas concentraciones de AMP. Luego se determinó el estado de maduración meiótica del ovocito, el consumo de glucosa y la producción de lactato por COC. Las comparaciones estadísticas de los porcentajes de maduración fueron realizadas por la prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado y las del consumo de glucosa y producción de lactato mediante ANOVA. El grado de asociación entre el consumo de glucosa y la producción de lactato se analizó mediante la correlación de Pearson.

Experimento 21: Para evaluar el efecto del AMP en la vitalidad de las células del cumulus y del ovocito, COCs pertenecientes a la clase A<sub>1</sub> fueron madurados *in vitro* en ausencia de gonadotrofinas y con diversas concentraciones de AMP. Luego se determinó el porcentaje de COCs con las células del cumulus vivas y con ovocitos vivos. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas por la prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado.

## Resultados

### ***Influencia de las características del cumulus que rodea al ovocito y de las gonadotropinas en la vía glucolítica***

Las cuatro clases de COCs que demostraron ser aptas para madurar meióticamente presentan cumulus marcadamente diferentes, por lo que fue de interés evaluar la relevancia de las características del cumulus en la actividad glucolítica del COC. Al estar la acción de las gonadotropinas mediada por las células del cumulus, también fue analizada la importancia de la estimulación gonadotrófica en la actividad glucolítica de cada clase de COC.

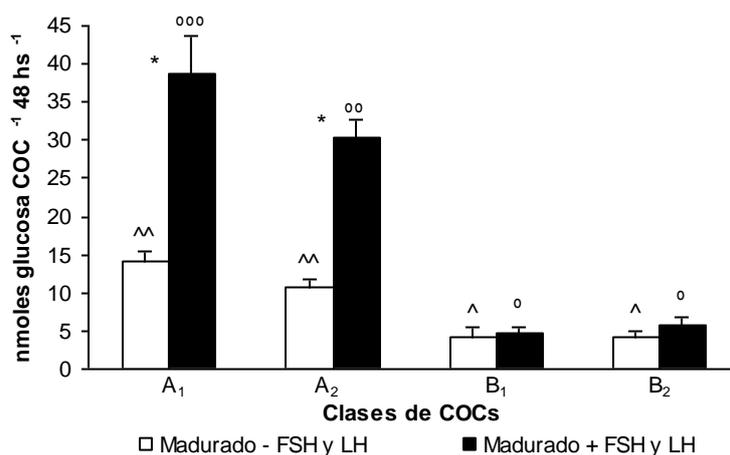
Es generalmente aceptado que la actividad bioquímica de las células del cumulus y del ovocito están íntimamente relacionadas. Por lo tanto, la actividad glucolítica del complejo podría ser un marcador bioquímico del progreso de la meiosis en el ovocito. Debido a que la sensibilidad de los métodos para las determinaciones metabólicas permiten cultivar COCs individualmente, se evaluó la asociación entre el desarrollo de la vía glucolítica en el COC y el progreso de la meiosis del ovocito.

### **Consumo de glucosa**

Se observó mayor consumo de glucosa en las clases A respecto de las clases B durante la maduración sin gonadotropinas ( $p < 0,05$ ), no habiendo diferencia entre  $A_1$  y  $A_2$  y entre  $B_1$  y  $B_2$ . Sólo se observó aumento en el consumo de glucosa en las clases A durante la maduración debido a la presencia de gonadotropinas, resultando significativamente mayor en la clase  $A_1$  ( $p < 0,05$ , Experimento 13) (**Figura 24**).

No se observaron diferencias significativas en los nmoles de glucosa consumida por COC debido al estadio de maduración meiótica del ovocito en el medio control (clase  $A_1$   $12,1 \pm 1$  vs.  $16,2 \pm 3,8$ , clase  $A_2$   $11,1 \pm 1,2$  vs.  $10,5 \pm 1,4$ , clase  $B_1$   $3,6$

$\pm 1,2$  vs.  $4,9 \pm 2,4$  y clase B<sub>2</sub>  $4,8 \pm 1,7$  vs.  $3,4 \pm 0,9$ , con metafase II vs. sin metafase II respectivamente), ni en el medio suplementado con gonadotropinas (clase A<sub>1</sub>  $42,4 \pm 6,2$  vs.  $35,2 \pm 7,9$ , clase A<sub>2</sub>  $28,4 \pm 2,9$  vs.  $32,5 \pm 3,8$ , clase B<sub>1</sub>  $4,1 \pm 1,7$  vs.  $5,4 \pm 1$  y clase B<sub>2</sub>  $7,5 \pm 1,5$  vs.  $4,3 \pm 1$ , con metafase II vs. sin metafase II respectivamente) (Experimento 13).



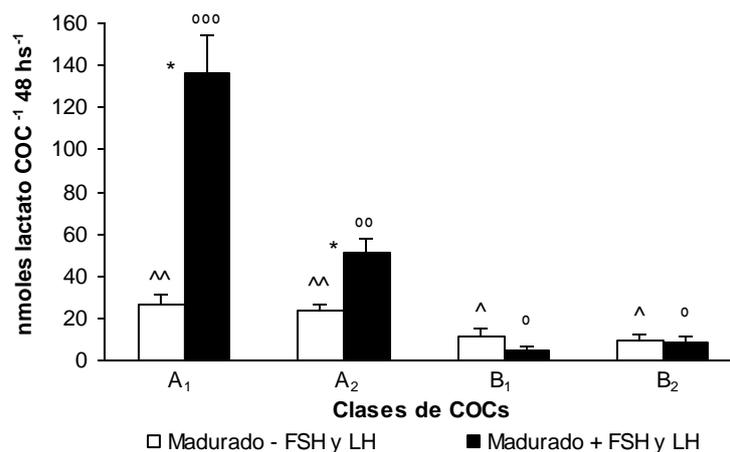
**Figura 24:** Consumo de glucosa en las distintas clases de COCs madurados en ausencia y presencia de FSH y LH. ^^ ^ y 000 00 ° Barras con diferentes superíndices difieren significativamente entre clases de COCs ( $p < 0,05$ ). \* Difieren significativamente en la misma clase de COC Madurado – FSH y LH vs. Madurado + FSH y LH ( $p < 0,05$ ). Experimento 13.  $n = 20 - 25$  para cada valor.

## Producción de lactato

La producción de lactato fue mayor en las clases A respecto de las clases B durante la maduración sin gonadotropinas ( $p < 0,05$ ), no habiendo diferencia entre A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> y entre B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>. La producción de lactato aumentó en las clases A durante la maduración debido a la presencia de gonadotropinas, siendo significativamente mayor en la clase A<sub>1</sub> ( $p < 0,05$ ). En las clases B no se detectó aumento de la producción de lactato por acción de las hormonas (Experimento 13) (**Figura 25**).

No se observaron diferencias significativas en los nmoles de lactato producido por COC debido al estadio de maduración meiótica del ovocito en el medio control

(clase A<sub>1</sub> 22 ± 6,2 vs. 30,9 ± 2,3, clase A<sub>2</sub> 25,3 ± 4,8 vs. 22,3 ± 4,2, clase B<sub>1</sub> 10,7 ± 4,3 vs. 12,2 ± 4,9 y clase B<sub>2</sub> 7,9 ± 4,4 vs. 10,2 ± 4,5, con metafase II vs. sin metafase II respectivamente), ni en el medio suplementado con gonadotrofinas (clase A<sub>1</sub> 147,4 ± 23,3 vs. 125,1 ± 28,6, clase A<sub>2</sub> 50,3 ± 9,3 vs. 52,8 ± 7,9, clase B<sub>1</sub> 2,1 ± 1 vs. 8 ± 2,8 y clase B<sub>2</sub> 12,9 ± 5,1 vs. 4,1 ± 2,1, con metafase II vs. sin metafase II respectivamente) (Experimento 13).



**Figura 25:** Producción de lactato en las distintas clases de COCs madurados en ausencia y presencia de FSH y LH. ^ ^ y ^^^ ^^ ° Barras con diferentes superíndices difieren significativamente entre clases de COCs ( $p < 0,05$ ). \* Difieren significativamente en la misma clase de COC Madurado – FSH y LH vs. Madurado + FSH y LH ( $p < 0,05$ ). Experimento 13.  $n = 20 - 25$  para cada valor.

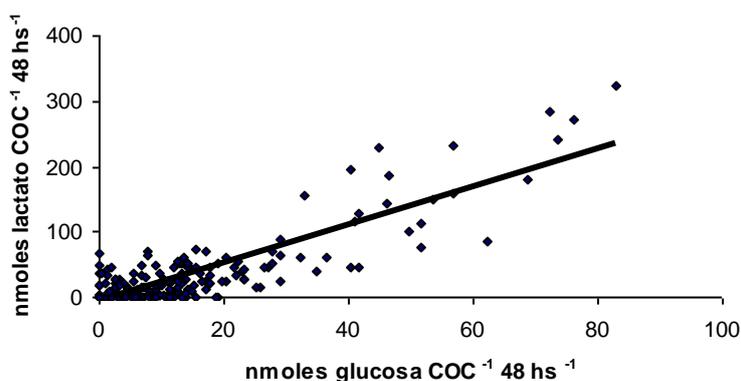
En las experiencias realizadas para analizar el consumo de glucosa y la producción de lactato, el porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II no difirió en ausencia o presencia de FSH y LH ni entre las clases de COCs (porcentaje de maduración meiótica promedio 59,6 %,  $n = 178$ ).

### Correlación entre consumo de glucosa y producción de lactato

Al realizar las determinaciones de consumo de glucosa y producción de lactato se observó una gran dispersión en los datos obtenidos dependiendo del tipo de

cumulus y/o la presencia de gonadotropinas en el medio de cultivo. Con el objetivo de analizar la dependencia entre las variables se evaluó la correlación entre las lecturas de cada metabolito obtenidas de la misma gota de medio de maduración.

Se observó una alta correlación positiva entre el consumo de glucosa y la producción de lactato en los COCs porcinos durante la maduración *in vitro* ( $r = 0,85$ ;  $p = 0,0000$ , Experimento 13) (**Figura 26**). Se halló una relación molar glucosa/lactato de aproximadamente 1/2 en las clases A en presencia o ausencia de gonadotropinas, excepto en la clase A<sub>1</sub> durante la maduración con hormonas donde la relación molar fue aproximadamente 1/3,5.



**Figura 26:** Correlación entre consumo de glucosa y producción de lactato de los COCs madurados *in vitro* ( $r = 0,85$ ;  $p = 0,0000$ ). Experimento 13.

### Consumo de glucosa y producción de lactato en ovocitos denudados

El mayor consumo de glucosa y producción de lactato en las clases con cumulus íntegro sugiere que la actividad glucolítica de los COCs se desarrollaría principalmente en las células del cumulus. Para evaluar la participación relativa del ovocito y de las células del cumulus en el consumo de glucosa y la producción de lactato de los COCs se procedió a determinar tales parámetros en ovocitos denudados provenientes de COCs clase A<sub>1</sub>. Con las técnicas utilizadas no pudo registrarse

consumo de glucosa ni producción de lactato por los ovocitos porcinos desnudos durante las 48 hs. de cultivo *in vitro* (n = 30, Experimento 14). En las experiencias realizadas con ovocitos desnudos el porcentaje de maduración meiótica promedio observado fue 30 % (n = 30).

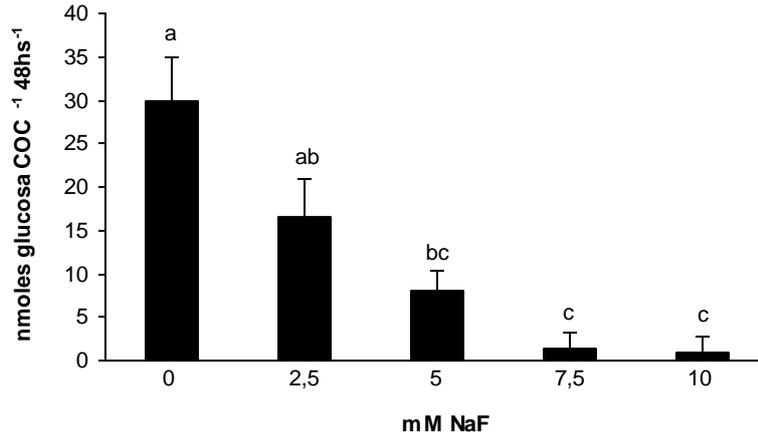
### ***Influencia de reguladores negativos (NaF, ATP) y positivos (AMP) de la vía glucolítica***

En las experiencias presentadas se estableció que la actividad glucolítica del COC se desarrollaría independientemente del progreso meiótico del ovocito. Sin embargo, la clase A<sub>1</sub> de COC ha demostrado tener una mayor capacidad de maduración citoplasmática (Capítulo 1) al igual que una mayor capacidad de respuesta a la estimulación por las gonadotropinas de la vía glucolítica. De allí surgió el interés en profundizar la relevancia de la regulación de la vía en el progreso de la maduración de los ovocitos en esta clase de COC.

### ***Regulación de la glucólisis con NaF***

#### **Consumo de glucosa con NaF**

Se observó una disminución dosis dependiente en los nmoles de glucosa consumida por COC debida a la presencia de NaF en el medio de maduración (p < 0,05, Experimento 15) (**Figura 27**).

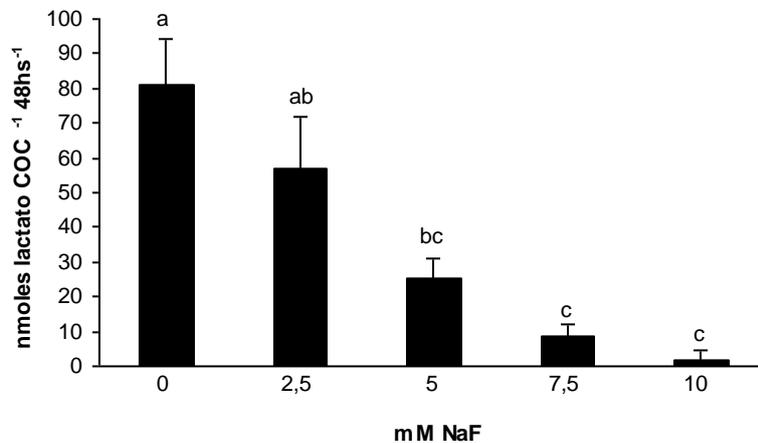


**Figura 27:** Consumo de glucosa en COCs clase A<sub>1</sub> madurados con distintas concentraciones de NaF. <sup>a, b, c</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Experimento 15.  $n = 30$  para cada valor.

### Producción de lactato con NaF

Se observó una disminución dosis dependiente en los nmoles de lactato producido por COC debida a la presencia NaF en el medio de maduración ( $p < 0,05$ , Experimento 15) (**Figura 28**).

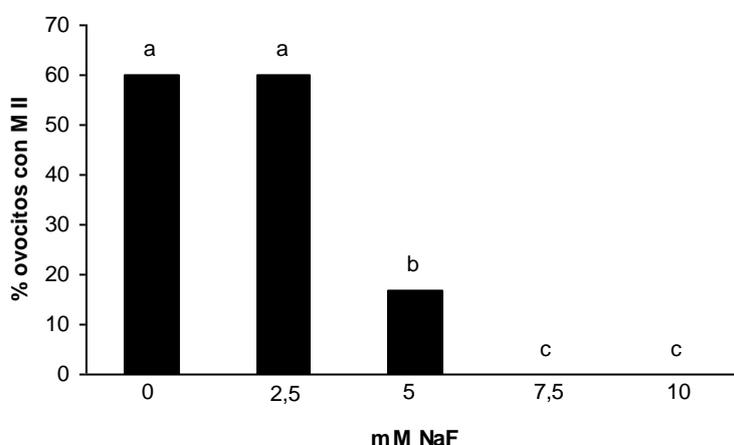
Se observó una alta correlación positiva entre el consumo de glucosa y la producción de lactato en los COCs porcinos durante la maduración *in vitro* ( $r = 0,86$ ;  $p = 0,0000$ , Experimento 15).



**Figura 28:** Producción de lactato en COCs clase A<sub>1</sub> madurados con distintas concentraciones de NaF. <sup>a, b, c</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Experimento 15.  $n = 30$  para cada valor.

## Maduración nuclear con NaF

El porcentaje de maduración meiótica no difirió entre el medio control y el adicionado con 2,5 mM de NaF, pero disminuyó con 5 mM y la inhibición de la maduración fue total con 7,5 y 10 mM ( $p < 0,05$ , Experimento 15) (**Figura 29**).



**Figura 29:** Porcentaje de ovocitos con metafase II en COCs clase A<sub>1</sub> madurados con distintas concentraciones de NaF. <sup>a, b, c</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Experimento 15.  $n = 30$  para cada valor.

## Vitalidad de los COCs con NaF

Debido a la inhibición de la maduración meiótica observada por la presencia de NaF resultó necesario comprobar si el compuesto tiene la capacidad de afectar la vitalidad de las células durante el cultivo.

El porcentaje de ovocitos y de cumulus vivos en los COCs clase A<sub>1</sub> madurados *in vitro* no se modificó por el agregado de NaF al medio de maduración a ninguna de las concentraciones utilizadas (Experimento 16) (**Tabla 1**).

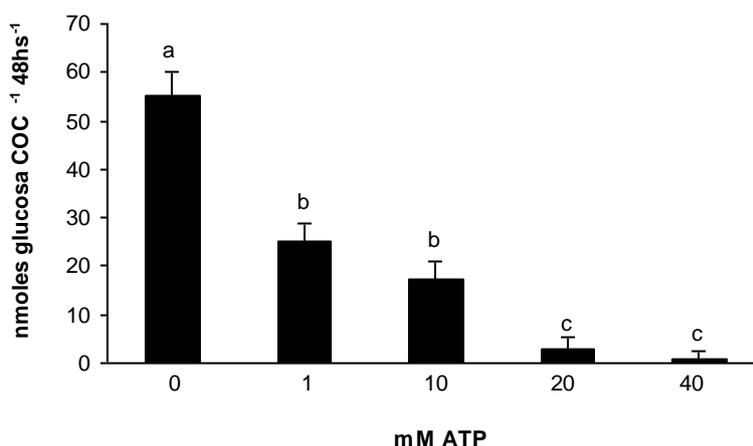
| NaF              | 0 mM             | 2,5 mM            | 5 mM              | 7,5 mM           | 10mM             |
|------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| % ovocitos vivos | 100 <sup>a</sup> | 93,3 <sup>a</sup> | 96,7 <sup>a</sup> | 100 <sup>a</sup> | 100 <sup>a</sup> |
| % cumulus vivos  | 100 <sup>a</sup> | 100 <sup>a</sup>  | 100 <sup>a</sup>  | 100 <sup>a</sup> | 100 <sup>a</sup> |
| n                | 30               | 30                | 30                | 30               | 30               |

**Tabla 1:** Porcentaje de ovocitos y cumulus vivos madurados con distintas concentraciones de NaF. <sup>a</sup> Valores con igual superíndice no difieren significativamente en la misma fila. Experimento 16.

## Regulación de la glucólisis con ATP

### Consumo de glucosa con ATP

Se observó una disminución dosis dependiente en los nmoles de glucosa consumida por COC debida a la presencia de ATP en el medio de maduración ( $p < 0,05$ , Experimento 17) (**Figura 30**).

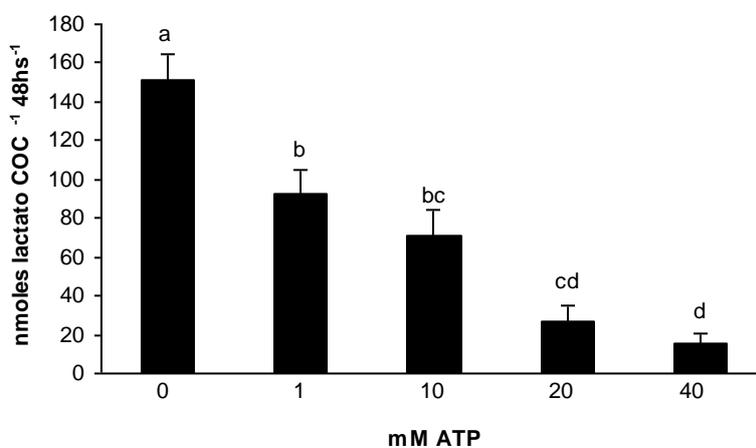


**Figura 30:** Consumo de glucosa en COCs clase A<sub>1</sub> madurados con distintas concentraciones de ATP. <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Experimento 17.  $n = 30$  para cada valor.

## Producción de lactato con ATP

Se observó una disminución dosis dependiente en los nmoles de lactato producido por COC debida a la presencia de ATP en el medio de maduración ( $p < 0,05$ , Experimento 17) (**Figura 31**).

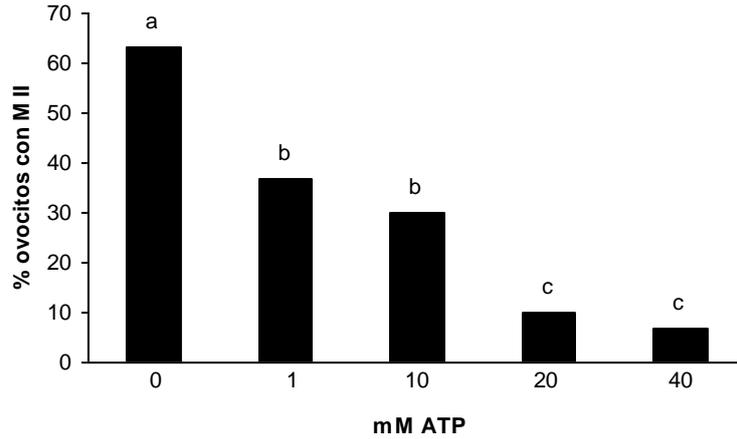
Se observó una alta correlación positiva entre el consumo de glucosa y la producción de lactato en los COCs porcinos durante la maduración *in vitro* ( $r = 0,86$   $p = 0,0000$ , Experimento 17).



**Figura 31:** Producción de lactato en COCs clase  $A_1$  madurados con distintas concentraciones de ATP. <sup>a, b, c, d</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Experimento 17.  $n = 30$  para cada valor.

## Maduración nuclear con ATP

El porcentaje de maduración meiótica disminuyó en forma dosis dependiente por efecto de la adición de ATP al medio de maduración ( $p < 0,05$ , Experimento 17) (**Figura 32**).



**Figura 32:** Porcentaje de ovocitos con metafase II en COCs clase A<sub>1</sub> madurados con distintas concentraciones de ATP. <sup>a, b, c</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Experimento 17.  $n = 30$  para cada valor.

### Vitalidad de los COCs con ATP

Debido a la inhibición de la maduración meiótica observada por la presencia de ATP resultó necesario comprobar si el compuesto tiene la capacidad de afectar la vitalidad de las células durante el cultivo.

El porcentaje de ovocitos y de cumulus vivos en los COCs clase A<sub>1</sub> madurados *in vitro* no se modificó por el agregado de ATP al medio de maduración a ninguna de las concentraciones utilizadas (Experimento 18) (**Tabla 2**).

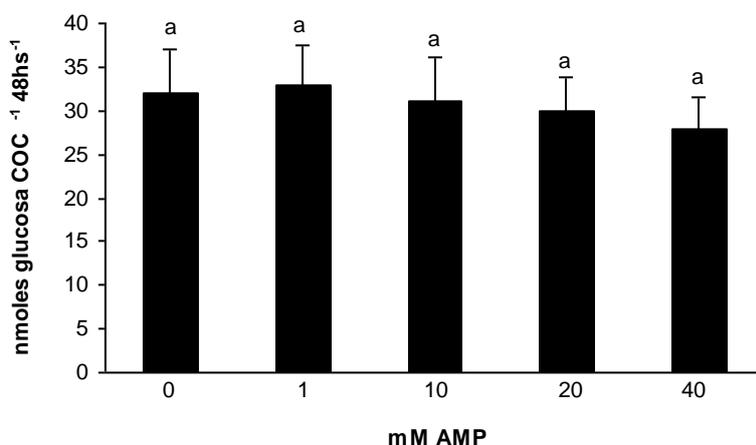
| ATP              | 0 mM              | 1 mM             | 10 mM             | 20 mM            | 40mM              |
|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| % ovocitos vivos | 96,7 <sup>a</sup> | 100 <sup>a</sup> | 93,3 <sup>a</sup> | 100 <sup>a</sup> | 96,7 <sup>a</sup> |
| % cumulus vivos  | 100 <sup>a</sup>  | 100 <sup>a</sup> | 100 <sup>a</sup>  | 100 <sup>a</sup> | 100 <sup>a</sup>  |
| n                | 30                | 30               | 30                | 30               | 30                |

**Tabla 2:** Porcentaje de ovocitos y cumulus vivos madurados con distintas concentraciones de ATP. <sup>a</sup> Valores con igual superíndice no difieren significativamente en la misma fila. Experimento 18.

## Regulación de la glucólisis con AMP

### Consumo de glucosa con AMP

No se observó diferencia en los nmoles de glucosa consumida por COC en presencia de AMP a ninguna de las concentraciones utilizadas (Experimento 19) (Figura 33).

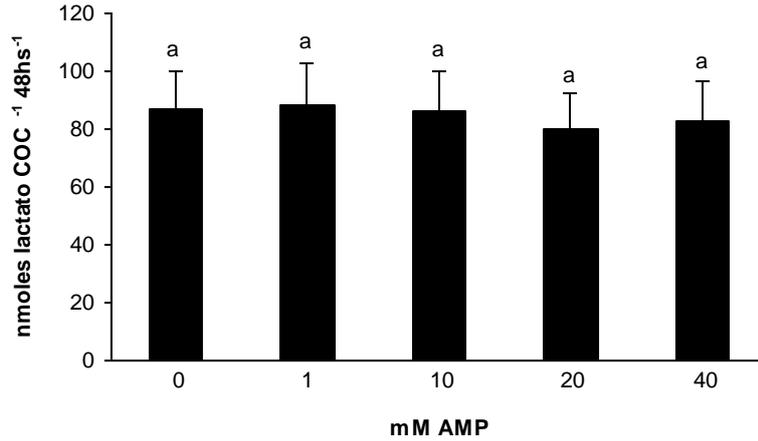


**Figura 33:** Consumo de glucosa en COCs clase A<sub>1</sub> madurados con distintas concentraciones de AMP. <sup>a</sup> Barras con igual superíndice no difieren significativamente. Experimento 19. n = 30 para cada valor.

### Producción de lactato con AMP

No se observó diferencia en los nmoles de lactato producido por COC en presencia de AMP a ninguna de las concentraciones utilizadas (Experimento 19) (Figura 34).

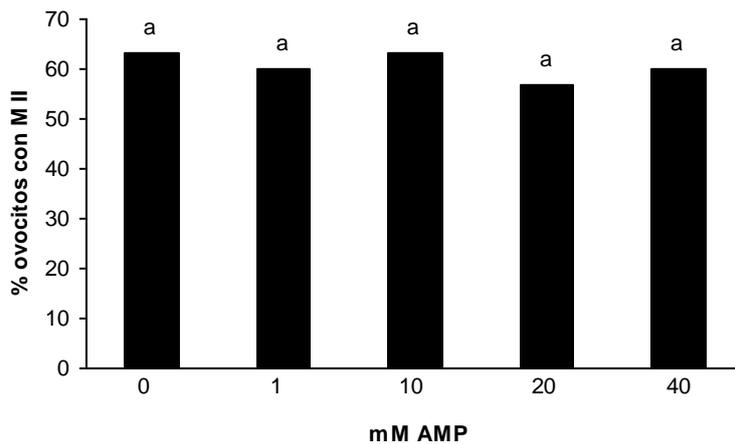
Se observó una alta correlación positiva entre el consumo de glucosa y la producción de lactato en los COCs porcinos durante la maduración *in vitro* ( $r = 0,87$   $p = 0,0000$ , Experimento 19).



**Figura 34:** Producción de lactato en COCs clase A<sub>1</sub> madurados con distintas concentraciones de AMP. <sup>a</sup> Barras con igual superíndice no difieren significativamente. Experimento 19. n = 30 para cada valor.

### Maduración nuclear con AMP

El porcentaje de maduración meiótica no se modificó por el agregado de AMP al medio de maduración a ninguna de las concentraciones utilizadas (Experimento 19) (Figura 35).

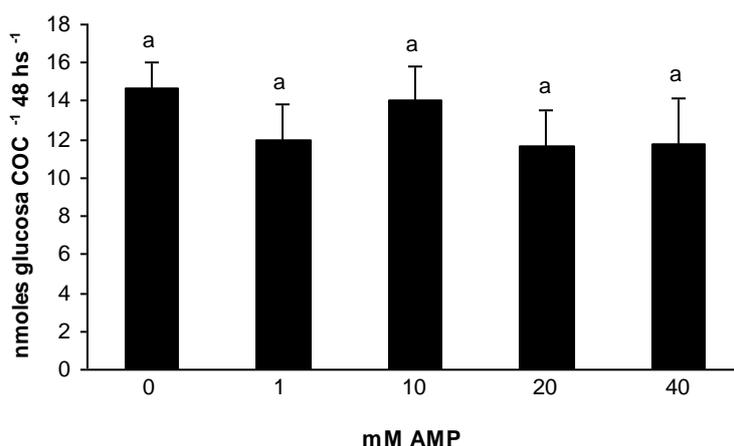


**Figura 35:** Porcentaje de ovocitos con metafase II en COCs clase A<sub>1</sub> madurados con distintas concentraciones de AMP. <sup>a</sup> Barras con igual superíndice no difieren significativamente. Experimento 19. n = 30 para cada valor.

## Consumo de glucosa con AMP (sin adición de gonadotrofinas)

En las experiencias presentadas anteriormente no se observó efecto del AMP en la vía glucolítica. Por otra parte, las gonadotrofinas demostraron ser capaces de estimular la vía en los COCs porcinos. Para completar el estudio del AMP como regulador de la vía glucolítica resultó necesario evaluar si la acción de las gonadotrofinas podría enmascarar el efecto del AMP, por lo que el regulador fue agregado al medio de maduración sin suplemento de hormonas.

Al realizar la maduración en ausencia de gonadotrofinas no se observó diferencia en los nmoles de glucosa consumida en presencia de AMP a ninguna de las concentraciones utilizadas (Experimento 20) (**Figura 36**).

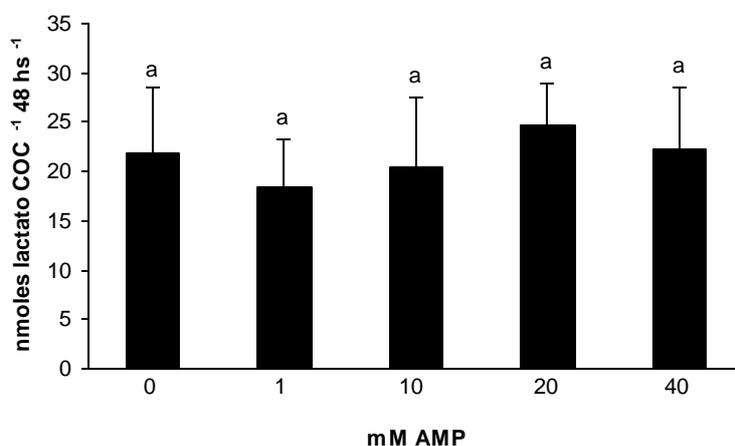


**Figura 36:** Consumo de glucosa en COCs clase A<sub>1</sub> madurados en ausencia de gonadotrofinas con distintas concentraciones de AMP. <sup>a</sup> Barras con igual superíndice no difieren significativamente. Experimento 20. n = 30 para cada valor.

## Producción de lactato con AMP (sin adición de gonadotrofinas)

Al realizar la maduración en ausencia de gonadotrofinas no se observó diferencia en los nmoles de lactato producido en presencia de AMP a ninguna de las concentraciones utilizadas (Experimento 20) (**Figura 37**).

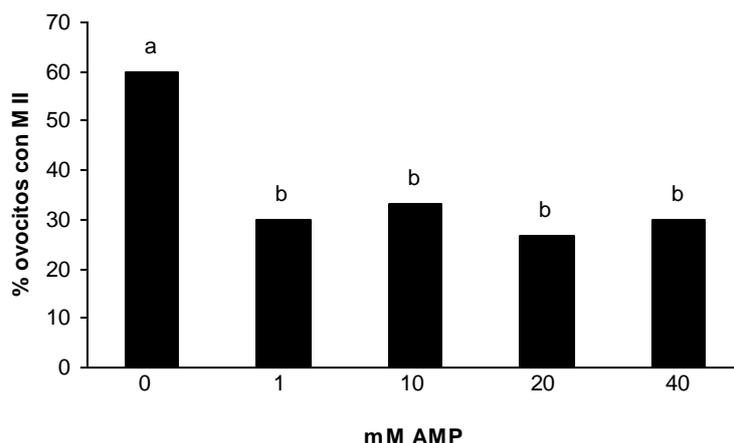
Se observó una baja correlación positiva entre el consumo de glucosa y la producción de lactato en los COCs porcinos durante la maduración *in vitro* ( $r = 0,23$   $p = 0,0056$ , Experimento 20).



**Figura 37:** Producción de lactato en COCs clase A<sub>1</sub>, madurados en ausencia de gonadotrofinas con distintas concentraciones de AMP. <sup>a</sup> Barras con igual superíndice no difieren significativamente. Experimento 20.  $n = 30$  para cada valor.

### Maduración nuclear con AMP (sin adición de gonadotrofinas)

Al realizar la maduración en ausencia de gonadotrofinas el porcentaje de maduración meiótica disminuyó aproximadamente a la mitad por el agregado de AMP a todas las concentraciones utilizadas ( $p < 0,05$ , Experimento 20) (**Figura 38**).



**Figura 38:** Porcentaje de ovocitos con metafase II en COCs clase A<sub>1</sub> madurados en ausencia de gonadotropinas con distintas concentraciones de AMP. <sup>a, b</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Experimento 20.  $n = 30$  para cada valor.

### Vitalidad de los COCs con AMP (sin adición de gonadotropinas)

Debido a la inhibición de la maduración meiótica observada por la presencia de AMP en ausencia de gonadotropinas resultó necesario comprobar si el compuesto tiene la capacidad de afectar la vitalidad de las células durante el cultivo.

El porcentaje de ovocitos y de cumulus vivos en los COCs clase A<sub>1</sub> madurados *in vitro* en ausencia de gonadotropinas no se modificó por el agregado de AMP al medio de maduración a ninguna de las concentraciones utilizadas (Experimento 21) (Tabla 3).

| AMP              | 0 mM              | 1 mM              | 10 mM            | 20 mM             | 40mM             |
|------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|
| % ovocitos vivos | 96,7 <sup>a</sup> | 93,3 <sup>a</sup> | 100 <sup>a</sup> | 96,7 <sup>a</sup> | 100 <sup>a</sup> |
| % cumulus vivos  | 100 <sup>a</sup>  | 100 <sup>a</sup>  | 100 <sup>a</sup> | 100 <sup>a</sup>  | 100 <sup>a</sup> |
| n                | 30                | 30                | 30               | 30                | 30               |

**Tabla 3:** Porcentaje de ovocitos y cumulus vivos madurados en ausencia de gonadotrofinas con distintas concentraciones de AMP. <sup>a</sup> Valores con igual superíndice no difieren significativamente en la misma fila. Experimento 21.

## Discusión

La maduración de los ovocitos porcinos *in vitro* fue realizada en medio 199, el cual es un medio de composición compleja (Anexo 1) diseñado para el cultivo de distintos tipos de células y comúnmente utilizado para la maduración *in vitro* de gametos de diferentes especies. Los hidratos de carbono incluidos en el medio son la glucosa a una concentración 5,56 mM y desoxi-ribosa y ribosa a una concentración considerablemente menor (0,003 mM cada una).

En los ensayos realizados se evaluó el consumo de glucosa conjuntamente con la producción de lactato en el medio de maduración por el COC porcino, hallándose una alta correlación positiva entre ambos parámetros. Además, la relación molar glucosa/lactato obtenida fue aproximadamente 1/2 en la mayoría de las condiciones de maduración de las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>. Estas observaciones sugieren que la glucólisis es el principal destino de la glucosa consumida por el COC porcino durante la maduración *in vitro*. Otras vías alternativas para el consumo de glucosa por el COC son la vía de las pentosas fosfato y la vía de las hexosaminas. En roedores, bovinos y porcinos ha sido descrita la utilización de la glucosa en la vía de las pentosas fosfato por el COC durante la maduración *in vitro*, proponiéndose el aprovechamiento de la glucosa con fines no energéticos en esta vía para el control de la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito (Zuelke y Brackett, 1992; Downs y col., 1998; Downs y Utecht, 1999; Herrick y col., 2006; Sato y col., 2007; Funahashi y col., 2008). Por otro lado, en rumiantes y roedores se ha demostrado la utilización de glucosa para la síntesis de glicosaminoglicanos componentes de la matriz extracelular, en especial ácido hialurónico (Chen y col., 1990; Sutton-McDowall y col., 2004; Thompson, 2006;

Gutnisky y col., 2007), estimándose en el bovino que el 23 % de la glucosa consumida por el COC estaría destinada a la vía de las hexosaminas (Gutnisky y col., 2007). Se ha comprobado la síntesis de ácido hialurónico por los COCs porcinos durante la maduración *in vitro* y su participación en el proceso de expansión del cumulus (Sato y Yokoo, 2005; Yokoo y col., 2008). A pesar de las alternativas metabólicas existentes para la utilización de la glucosa, los resultados presentados indicarían que la glucólisis es la principal vía para el consumo de este azúcar por el COC porcino. De igual modo, en el COC bovino la glucólisis ha sido propuesta como la principal vía de utilización de la glucosa (Sutton y col., 2003).

En las experiencias desarrolladas se observó mayor actividad glucolítica en los COCs porcinos pertenecientes a las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> respecto a los pertenecientes a las clases B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, esta diferencia sugiere que la actividad glucolítica de los COCs se desarrolla principalmente en las células del cumulus. Tal proposición es reforzada por la imposibilidad de evidenciar con las técnicas utilizadas tanto consumo de glucosa como producción de lactato por los ovocitos desnudos durante la maduración *in vitro*. Del mismo modo, en el bovino se ha observado escasa o nula actividad glucolítica durante la maduración *in vitro* en los ovocitos aislados de las células del cumulus (Zuelke y Brackett, 1992; Rieger y Loskutoff, 1994; Sutton y col., 2003). Si bien la glucólisis ha sido propuesta como la principal fuente de ATP para el ovocito porcino (Herrick y col., 2006; Krisher y col., 2007), e incluso ha sido sugerida la utilización de la glucosa en la vía glucolítica preferentemente sobre la vía de las pentosas (Krisher y col., 2007), los estudios se basaron en el comportamiento de los ovocitos maduros, sin examinar la actividad metabólica en el proceso de maduración. Durante la maduración *in vitro*, se ha demostrado que la actividad glucolítica de las células del cumulus bovinas y porcinas puede producir importantes cantidades de lactato, incluso si el mismo no estaba presente en el medio de cultivo (Sutton-McDowall y col., 2004; Experimento 13). Por otra parte, se ha observado un efecto aditivo por la suplementación con glucosa y piruvato al medio de maduración de los complejos

ovocito-cumulus porcinos, acelerando el progreso de la maduración nuclear y mejorando la maduración citoplasmática de los ovocitos. Esto sugiere la utilización diferencial de los metabolitos derivados de la glucosa y el piruvato por el COC en estas condiciones, siendo la primera utilizada en la vía de las pentosas para la regulación de la maduración nuclear, mientras el segundo posiblemente sea consumido en el ciclo de Krebs para la producción de ATP (Sato y col., 2007; Funahashi y col., 2008). Debe considerarse la posibilidad que, como ha sido sugerido en el bovino, las células del cumulus sean las encargadas de catabolizar glucosa con el propósito de obtener energía y producir sustratos oxidativos que pueden ser utilizados por el ovocito durante el proceso de maduración (Brackett y Zuelke, 1993; Cetica y col., 1999b; Cetica y col., 2003).

Si bien Sutton-McDowall y col. (2005), Wongsrikeao y col. (2006), Sato y col. (2007) y Funahashi y col. (2008) han demostrado la importancia de la concentración de glucosa en el progreso de la maduración nuclear *in vitro* de los ovocitos bovinos y porcinos, ninguno de ellos vincula el comportamiento metabólico del COC con la maduración del ovocito. Por su parte, Krisher y Bavister (1999) y Herrick y col. (2006) evaluaron la actividad metabólica del ovocito maduro en ambas especies, demostrándose la correlación del metabolismo con la maduración nuclear y la competencia de desarrollo; pero las células del cumulus fueron removidas al completar la maduración y se evaluó sólo la actividad metabólica del ovocito desnudo. En los experimentos realizados en la presente tesis se observó mayor consumo de glucosa y producción de lactato por los COCs porcinos pertenecientes a la clase A<sub>1</sub> respecto a los pertenecientes a las clases A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> al ser cultivados en presencia de gonadotrofinas. Sin embargo, los ovocitos pertenecientes a las cuatro clases mostraron igual capacidad de madurar meióticamente (Capítulo 1). Además, al evaluar individualmente la actividad metabólica del COC y la maduración nuclear del ovocito, no se observó mayor consumo de glucosa ni producción de lactato en aquellos COCs porcinos cuyos ovocitos alcanzaron el estadio de metafase II. Sería posible entonces

que en las células del cumulus se desarrolle actividad glucolítica independientemente del progreso meiótico del ovocito. En el bovino, si bien se propuso que el ovocito podría regular la actividad glucolítica del cumulus al utilizar los metabolitos de la glucólisis y/o secretar factores moduladores (Zuelke y Brackett, 1992), más recientemente ha sido demostrado que el metabolismo del piruvato, la glucosa y el lactato en el COC no es afectado por la presencia del ovocito (Sutton y col., 2003).

Las investigaciones realizadas han demostrado que las clases de COCs con cumulus íntegro (clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>) aumentan tanto el consumo de glucosa como la producción de lactato en presencia de gonadotrofinas, siendo mayor el incremento en la clase A<sub>1</sub>. Estos resultados sugieren que las células de cumulus responden a la estimulación hormonal aumentando la actividad de la vía glucolítica. Si bien el mayor número de células del cumulus observado en las clases A podría explicar la mayor actividad metabólica, no se registró diferencia en el número de células entre los COCs clase A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, indicando alguna participación de las características del cumulus de la clase A<sub>1</sub> en la intensidad de respuesta a las hormonas. El efecto promotor de la actividad glucolítica de las gonadotrofinas también ha sido observado en células del cumulus y de la granulosa de rata, ratón y humano, al evaluar la producción de lactato en los folículos (Billig y col., 1983; Harlow y col., 1987; Boland y col., 1993; Gull y col., 1999). Durante la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos la presencia de LH y/o FSH también incrementó la actividad de la vía glucolítica en los COCs (Zuelke y Brackett, 1992; Sutton-McDowall y col., 2004). Al evaluar algunos de los posibles mecanismos de participación de la FSH en la modulación de la actividad glucolítica en COCs de ratón, se demostró el aumento en la capacidad de las células del cumulus para incorporar y utilizar el azúcar, mediado por la translocación de transportadores y por la síntesis de una de las enzimas reguladoras de la vía, la hexoquinasa (Downs y col., 1996; Roberts y col., 2004).

Un hallazgo llamativo en las experiencias desarrolladas al ser madurados los COCs clase A<sub>1</sub> en presencia de gonadotrofinas fue la alta producción de lactato. La

misma resultó mayor a la esperada en base al consumo de glucosa registrado, alcanzando la relación molar glucosa/lactato un valor aproximado de 1/3,5. Estos resultados sugieren que la estimulación hormonal no sólo incrementaría la producción de lactato a partir de la vía glucolítica, sino que además modularía la derivación de otros sustratos hacia este metabolito. Ha sido descrito que varios aminoácidos son metabolizados hasta piruvato, el cual mediante la enzima lactato deshidrogenasa puede ser reducido a lactato (Nelson y Cox, 2005b), resultando estos pasos un origen no glucolítico posible para la mayor producción de lactato observada en la clase A<sub>1</sub>.

Si bien ha sido demostrado que la inhibición de la utilización de la glucosa en la vía de las pentosas fosfato durante la maduración de los ovocitos porcinos *in vitro* afecta negativamente la maduración nuclear, el clivaje de los embriones y el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto (Herrick y col., 2006; Sato y col., 2007; Funahashi y col., 2008), la importancia de la regulación de la actividad de la vía glucolítica no había sido evaluada aún en esta especie. En presencia de NaF o ATP en el medio de maduración se produjo la disminución conjunta del consumo de glucosa y de la producción de lactato por el COC, manteniéndose la alta correlación positiva entre ambos parámetros, lo que sugiere que estos compuestos tendrían un efecto inhibitorio sobre la vía glucolítica del COC porcino.

La inhibición de la glucólisis por acción del NaF fue dosis dependiente. El NaF es uno de los inhibidores mejor caracterizados de la vía glucolítica, encontrándose descrita su acción sobre la enzima enolasa (Harris, 2002). La concentración a la cual se manifestaron los efectos del NaF sobre los COCs fue menor a la necesaria para la inhibición de la enzima bacteriana purificada (Kaufmann y Bartholmes, 1992; Guha-Chowdhury y col., 1997) e incluso a la requerida para disminuir la utilización de la glucosa en varios tipos de células eucariotas (Anderson, 1969; Feig y col., 1971; Shayiq y Kidwai, 1986). La inhibición de la glucólisis por el NaF fue acompañada con una disminución paralela del porcentaje de ovocitos que completaron la maduración meiótica, resultando llamativa la coincidencia en el comportamiento de los parámetros

evaluados en respuesta al compuesto. Es destacable que a una concentración 5 mM de NaF la glucólisis desarrolló aproximadamente  $\frac{1}{4}$  de la actividad respecto del control y el porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II también fue aproximadamente  $\frac{1}{4}$  del observado sin inhibidor, sugiriendo que la actividad glucolítica del COC es necesaria para que los ovocitos puedan completar la maduración nuclear.

Al evaluar el efecto del ATP sobre la vía glucolítica también se observó una inhibición dosis dependiente en el consumo de glucosa y en la producción de lactato. El ATP ha sido descrito como uno de los principales moduladores fisiológicos de la glucólisis, actuando como efector alostérico negativo de dos enzimas claves de la vía, la fosfofructoquinasa 1 (Harris, 2002; Kamp y col., 2007) y la piruvato quinasa (Berg y col., 2008a). En las experiencias presentadas, la inhibición de la glucólisis por el ATP fue acompañada también de una disminución en la maduración nuclear, resultando similares las proporciones en que ambos parámetros fueron afectados. A concentraciones 1 mM y 10 mM de ATP la vía glucolítica desarrolló aproximadamente  $\frac{1}{2}$  de la actividad evidenciada sin el efector negativo y el porcentaje de ovocitos que maduraron nuclearmente también fue de aproximadamente  $\frac{1}{2}$  del observado respecto al control. Cabe mencionar que las concentraciones a las cuales se observó inhibición coinciden con las informadas en la bibliografía como efectivas sobre la enzima fosfofructoquinasa 1 (Harris, 2002; Kamp y col., 2007). Aunque no puede descartarse totalmente la posibilidad que el ATP alterase el progreso de la meiosis por un mecanismo diferente a la inhibición de la vía glucolítica, la similar proporción de disminución de ambos parámetros sugiere una relación entre los mismos. Refuerza esta sugerencia que el inhibidor específico de la vía (NaF) mostró igual comportamiento a pesar de no compartir el mecanismo de acción. Además, ninguno de los dos compuestos afectó la vitalidad de los ovocitos o del cumulus que lo rodea. En un estudio anterior, Herrick y col. (2006) no obtuvieron resultados concluyentes al intentar modular la actividad glucolítica de los COCs porcinos durante la maduración *in vitro*, sin embargo los reguladores utilizados fueron diferentes a los del presente

trabajo y la actividad metabólica del COC no fue evaluada, por lo que las experiencias presentadas en esta tesis evidencian por primera vez la importancia de la regulación de la vía glucolítica del COC porcino para la maduración del ovocito.

Entre los reguladores más importantes de la vía glucolítica ha sido descrito el AMP como efector alostérico positivo de la principal enzima reguladora, la fosfofructoquinasa 1 (Harris, 2002; Simpfendörfer y col., 2006; Kamp y col., 2007). En las investigaciones realizadas para evaluar el efecto del AMP en presencia de FSH y LH, no se observó estimulación de la glucólisis, ni variación en la maduración nuclear del ovocito a ninguna de las concentraciones utilizadas. Esto sugiere que el AMP no tendría efecto sobre la actividad glucolítica del COC ni sobre el progreso de la meiosis del ovocito durante la maduración con gonadotrofinas. En el experimento 13 fue determinado que la FSH y la LH incrementan la intensidad de la glucólisis en el COC porcino. El experimento 19 demostró que al mantener la acción estimuladora de las hormonas en los COCs el AMP no es capaz de aumentar la actividad glucolítica, sugiriendo que el AMP y las hormonas no tendrían efecto sinérgico o aditivo.

En la experiencia realizada en ausencia de gonadotrofinas para completar el estudio del efecto del AMP, la actividad glucolítica no se modificó por la presencia del efector a ninguna de las concentraciones utilizadas, a pesar de haber sido incluidas y superadas las concentraciones de AMP descritas como efectivas sobre la enzima fosfofructoquinasa 1 (Simpfendörfer y col., 2006; Kamp y col., 2007). Sin embargo, el porcentaje de ovocitos que completaron la maduración nuclear cayó prácticamente a la mitad del observado sin el efector, independientemente de la concentración de AMP utilizada. Se comprobó también que la vitalidad de los ovocitos o del cumulus no es afectada por el compuesto. El resultado de esta experiencia suma evidencia a la proposición que la actividad glucolítica de los COCs porcinos no sería dependiente del progreso meiótico del ovocito. Un efecto similar ha sido observado en el ratón, demostrándose que la actividad glucolítica del COC no es afectada cuando se inhibe la maduración del ovocito (Downs y col., 1996). En el bovino, ha sido propuesto un

perfil metabólico diferente entre las células del cumulus y el ovocito, sugiriéndose que el metabolismo del COC completo no reflejaría la actividad metabólica del ovocito (Sutton y col., 2003). Una posible explicación del efecto inhibitor del AMP en la maduración meiótica es la activación de una proteína quinasa dependiente de AMP lineal (AMPK) en COCs bovinos y porcinos, la cual tiene la capacidad de inhibir la ruptura de la vesícula germinal y de disminuir el porcentaje de ovocitos que alcanzan el estadio de metafase II (Bilodeau-Goeseels y col., 2007). A diferencia de lo observado en el presente trabajo, ha sido demostrado el aumento en el consumo de glucosa y en la producción de lactato por los COCs bovinos durante la maduración *in vitro* en ausencia de gonadotrofinas debido a la adición de AMP en el medio de cultivo (Gutnisky y col., 2008). Las diferencias entre ambas especies no se limitan a la modulación de la actividad glucolítica del COC, sino que el progreso de la meiosis no se vio afectado en el ovocito bovino al utilizar concentraciones de AMP similares a las del presente trabajo (Bilodeau-Goeseels y col., 2007; Gutnisky y col., 2008). Se puede concluir que el AMP no tendría efecto sobre la actividad glucolítica del COC porcino independientemente de la acción de las gonadotrofinas, pero podría actuar modulando otros aspectos bioquímicos de importancia para la maduración nuclear del ovocito. El efecto negativo del AMP en el progreso meiótico del ovocito no pudo evidenciarse cuando la maduración se realizó en presencia de gonadotrofinas. Esto sugiere que los mecanismos involucrados en la regulación de la maduración nuclear por acción de las hormonas serían preponderantes sobre aquellos mediados por AMP.

En conclusión, la alta correlación positiva y la relación molar entre el consumo de glucosa y la producción de lactato indican que la glucólisis sería el principal destino de la glucosa consumida por el COC porcino durante la maduración *in vitro*. A su vez, la mayor actividad glucolítica en las clases A sugiere que la misma se desarrollaría principalmente en las células del cumulus. El mayor número de células del cumulus en los COCs pertenecientes a las clases A les permitiría responder al estímulo gonadotrófico incrementando la intensidad de la vía, sin embargo las particularidades

del cumulus de la clase A<sub>1</sub> le conferirían a este tipo de COC una mayor capacidad de respuesta a las hormonas que el de la clase A<sub>2</sub>.

El desarrollo de la actividad glucolítica en las células del cumulus sería independiente del progreso meiótico del ovocito, por lo tanto el consumo de glucosa y la producción de lactato no podrían ser utilizados como marcadores bioquímicos de la maduración nuclear. Sin embargo, la inhibición de la glucólisis con NaF y ATP se acompañó con una disminución paralela del porcentaje de maduración meiótica, indicando que la actividad de la vía sería necesaria para que los ovocitos puedan completar la maduración nuclear. Por otro lado, el AMP no tendría efecto en la actividad glucolítica del COC porcino independientemente de la presencia o ausencia de gonadotrofinas, pero podría actuar modulando otros aspectos de importancia para la maduración nuclear del ovocito.

## **Capítulo 3**

### **Metabolismo de aminoácidos en los complejos ovocito-cumulus durante la maduración in vitro**

## Introducción

Como ha sido descrito para los hidratos de carbono, también se ha demostrado que los aminoácidos están involucrados en eventos relacionados con la maduración de los ovocitos en roedores, bovinos y porcinos (Kito y Bavister, 1997; Ka y col., 1997; Cetica y col., 2003). En el bovino, ha sido sugerido que la acción estimuladora de los hidratos de carbono sería en la maduración nuclear, mientras que los aminoácidos actuarían además estimulando la maduración citoplasmática (Lim y col., 1999). Se ha observado que la presencia de ciertos aminoácidos en el medio de maduración de los ovocitos bovinos y porcinos incrementa el porcentaje de éxito de la fecundación *in vitro* y el número de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto (Krisher y Bavister, 1998; Rose-Hellekant y col., 1998; Lim y col., 1999; Hong y col., 2004; Hong y Lee, 2007). En ovocitos porcinos se observó que la suplementación de aminoácidos al medio de maduración no tuvo efecto estimulador sobre la maduración nuclear, ni sobre el tiempo requerido para el progreso de la meiosis, pero incrementó la formación de pronúcleos y blastocistos, sugiriéndose que el efecto beneficioso de los aminoácidos se debería a su acción en la maduración citoplasmática (Ka y col., 1997; Hong y Lee, 2007).

En el ovocito bovino se observó que la progresión de la meiosis requiere la síntesis de ARNm y de proteínas en las células del cumulus y el ovocito (Hunter y Moor, 1987; Simon y col., 1989; Motlik y col., 1990; Kastrop y col., 1991b; Milanov y Sirard, 1994; Lévesque y Sirard, 1995; Tatemoto y Terada 1995). La importancia de los diferentes procesos relacionados a la síntesis de proteínas y su vinculación con la reanudación de la meiosis fue demostrada mediante experimentos en los que se utilizaron inhibidores de la transcripción ( $\alpha$ -amanitina) (Kastrop y col., 1991b; Rambhatla y Latham, 1995), de la traducción (cicloheximida) (Nussbaum y Prather, 1995; Kubelka y col., 1995) y de las modificaciones postraduccionales (6-dimetilaminopurina) (Hampl y Eppig, 1995). Estos agentes impidieron tanto la

progresión nuclear como el normal desarrollo de los ovocitos, proveyendo evidencia sobre la participación de la síntesis de proteínas en la regulación de la maduración de los ovocitos. Se determinó que las etapas de la maduración que requieren de síntesis proteica son la ruptura de la membrana nuclear, la formación de los husos meióticos, la entrada y arresto en la metafase II (Moor y Crosby, 1986; Sirard y col., 1989; Szollosi y col., 1991). En ovocitos bovinos madurados *in vivo* o *in vitro* se observaron cambios en los patrones proteicos comparados con aquellos que permanecieron en el estadio de vesícula germinal (Kastrop y col., 1990; Kastrop y col., 1991a). Además de los cambios cualitativos en las proteínas sintetizadas por el ovocito bovino durante la maduración *in vitro*, se observó un leve pero constante aumento de la síntesis proteica durante las primeras 12 hs., que luego declinó con la progresión del cultivo (Wu y col., 1996). Más recientemente se demostró que el incremento en la síntesis de proteínas se produce en el momento de la ruptura de la vesícula germinal (Tomek y col., 2002).

Las células del cumulus mostraron menos diferencias cualitativas en cuanto al patrón proteico durante la maduración, sin embargo el contenido de proteínas aumentó durante este período, siendo la velocidad de síntesis proteica relativamente constante. Se ha sugerido que la síntesis y secreción de proteínas tanto por los ovocitos como por las células del cumulus bovinas serían necesarias para la normal maduración del ovocito, la expansión del cumulus y el subsecuente desarrollo embrionario (Wu y col., 1996). La síntesis de proteínas ha sido descrita también en los ovocitos y las células del cumulus porcinos durante el proceso de maduración (Ball y col., 1985), aunque con mucho menor detalle que en el bovino.

Varios mecanismos están involucrados en la activación de las moléculas de ARNm traduccionalmente inactivas (Hershey, 1991; Brown y Schreiber 1996). Los procesos responsables incluyen la fosforilación de una serie de factores de iniciación (Tach, 1992), fosforilación de las proteínas de las subunidades ribosomales (Morley y Thomas 1991; Morley, 1994; Gavin y Schorderet-Slatkine 1997) y desfosforilación de la enzima poli-A-polimerasa (Colgan y col., 1996). La modificación de la secuencia

poli-A del ARNm también ha sido correlacionada con la activación de la transcripción (Gebauer y col., 1994; Sheets y col., 1995; Gebauer y Richter, 1996; Shim y col., 1997). Particularmente en ovocitos bovinos, ha sido demostrado que la estimulación de la traducción mediante la poliadenilación triplica la síntesis de proteínas al momento de la ruptura de la vesícula germinal (Tomek y col., 2002). Sin embargo, los mismos autores sugirieron la existencia de otros mecanismos adicionales de regulación de la traducción durante otras etapas de la maduración de los ovocitos.

Ha sido propuesto que los ovocitos bovinos pueden utilizar distintos aminoácidos como sustratos energéticos (Zuelke y Brackett, 1993; Rieger y Loskutoff, 1994). La utilización de sus esqueletos carbonados en el ciclo de Krebs fue sugerida al demostrarse actividad de las enzimas de dicha vía en el gameto femenino (Cetica y col., 2003). Sin embargo, Hong y Lee (2007) sugirieron que podrían existir diferencias especie específicas en el metabolismo de aminoácidos durante la maduración de los ovocitos. Por otro lado, la acción de las gonadotrofinas en la maduración ha sido vinculada con la presencia de aminoácidos durante el cultivo *in vitro* (Kito y Bavister, 1997). Particularmente en el porcino, se demostró que la acción beneficiosa de los aminoácidos es superior en presencia de gonadotrofinas y EGF, sugiriéndose que este efecto estaría modulado por las hormonas (Hong y col., 2004).

Si bien Ball y col. (1985) observaron la acumulación de proteínas en los COCs porcinos durante las primeras 24 hs. de cultivo en respuesta a la FSH, el efecto no fue evaluado durante el período de maduración completo y además no se contempló la influencia de ambas gonadotrofinas en este proceso. La posible utilización de los aminoácidos con fines catabólicos y la relevancia de las gonadotrofinas sobre la misma durante la maduración *in vitro* tampoco han sido estudiadas en los COCs porcinos.

## **Materiales y métodos**

### ***Maduración de los ovocitos in vitro***

Se utilizaron las condiciones de maduración detalladas en la sección general con las particularidades descritas a continuación. En las experiencias en las que se evaluó el efecto de las gonadotrofinas, fue utilizado como control el mismo medio de maduración sin el agregado de FSH y LH. Para complementar el estudio de la influencia del cumulus en el metabolismo de los aminoácidos, los ovocitos provenientes de COCs clase A<sub>1</sub> fueron desnudados y luego madurados en medio suplementado con FSH y LH. Para analizar en forma conjunta la cantidad de proteínas de los COCs y la producción de amoníaco, se maduraron 25 COCs en gotas de 250 µl. Los estudios de correlación entre número de células del cumulus y contenido de proteínas del COC requirieron madurar 55 COCs en gotas de 550 µl.

### ***Producción de amoníaco y determinación de proteínas totales***

Luego de la maduración *in vitro*, los COCs fueron removidos de las gotas de 250 µl, se determinó el contenido de proteínas de 20 COCs y la concentración de amoníaco en el medio de maduración remanente. Paralelamente se evaluó la maduración meiótica de los 5 COCs restantes.

Para la determinación del contenido de proteínas, grupos de 20 COCs inmaduros y madurados *in vitro* fueron suspendidos en H<sub>2</sub>O destilada, luego congelados-descongelados dos veces, agitados en vórtex durante 30 minutos en una solución de NaOH 1 N y el homogenato resultante fue centrifugado a 10.000 x g durante 20 minutos. Se agregaron a los sobrenadantes los reactivos del Biuret y Folin-Ciocalteu y la absorbancia fue medida en espectrofotómetro a 660 nm (Lowry y col.,

1951). Se corrigieron las absorbancias utilizando blancos paralelos. Para calcular la concentración de proteínas se realizó una curva de calibración utilizando como testigo diferentes diluciones de una solución de albúmina bovina de concentración conocida.

La concentración de amoníaco se determinó espectrofotométricamente basada en el consumo del compuesto por la enzima glutamato deshidrogenasa. La cantidad de NADPH oxidado durante la reacción equivale a la cantidad de amoníaco presente en la muestra, midiéndose la disminución de la absorbancia a 340 nm (Kirsten y col., 1963; Da Fonseca-Wollheim, 1973a; 1973b). En cada experimento fueron incluidas gotas de 250  $\mu$ l de medio de maduración sin COCs como control de la concentración de amoníaco. Los nmoles de amoníaco producido por COC se calcularon por la diferencia entre la concentración de amoníaco en las gotas de medio en las que maduraron los COCs y la concentración en las gotas de medio de maduración sin células.

### ***Correlación entre el número de células del cumulus y el contenido de proteínas del COC***

Para analizar la correlación entre el número de células del cumulus y el contenido de proteínas del COC en la misma muestra, se estimó el número células del cumulus utilizando un método de cuantificación de ADN, el cual no interfiere con la medición de proteínas de la muestra. En una experiencia previa se verificó una alta correlación positiva entre el método de determinación del número de células por conteo en Cámara de Neubauer descrito en el Capítulo 1 y el método de estimación del número de células por cuantificación de ADN ( $r = 0,83$ ;  $p = 0,0000$ ;  $n = 21$ ).

Grupos de 50 COCs inmaduros y madurados *in vitro*, pertenecientes a las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> fueron suspendidos en H<sub>2</sub>O destilada, luego congelados-descongelados dos veces, homogeneizados mediante agitación en vortex durante 5 minutos y se dividió la muestra en dos alícuotas para la cuantificación de proteínas y de ADN,

respectivamente. Paralelamente se evaluó la maduración meiótica de los 5 COCs restantes.

Una alícuota se utilizó para la cuantificación de proteínas de idéntica forma a la descrita en el ítem precedente. Para la cuantificación de ADN, la alícuota correspondiente fue adicionada con una solución de Tris 0,121 % (m/v), EDTA 0,037 % (m/v), NaCl 20,44 % (m/v), Hoechst 33258 0,1 µg/ml de pH 7,4 e incubada en oscuridad durante 10 minutos. Luego la fluorescencia fue medida en espectrofluorómetro a 365 nm de excitación y 458 nm de emisión (Labarca y Paigen, 1980). La fluorescencia fue corregida utilizando blancos paralelos de la solución de tinción y de autofluorescencia de las células. Para calcular la concentración de ADN se realizó una curva de calibración utilizando como testigo diferentes diluciones de una solución de ADN de timo de ternero (ICN Biomedicals Inc, Aurora, OH) de concentración conocida. El número de células del cumulus fue calculado considerando que una célula porcina contiene en promedio 5,1 pg de ADN (Mirsky y Osawa, 1961).

## ***Diseño de experimentos y análisis estadístico***

Experimento 22: Para evaluar la influencia de las características del cumulus y de las gonadotrofinas en el metabolismo de los aminoácidos, los COCs pertenecientes a las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> fueron madurados *in vitro* en ausencia y presencia de gonadotrofinas. Se determinó la variación en el contenido de proteínas de los COCs debido al proceso de maduración, cuantificando el contenido de proteínas de COCs inmaduros y madurados *in vitro* en ausencia y presencia de gonadotrofinas (ensayo factorial 4 x 3). Se evaluó la producción de amoníaco en el medio de cultivo remanente luego de las 48 hs. de cultivo (ensayo factorial 4 x 2) y se determinó el estado de maduración meiótica en una alícuota de los COCs utilizados en cada experiencia. Las comparaciones estadísticas de los porcentajes de maduración fueron realizadas por la

prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado. El grado de asociación entre el contenido de proteínas del COC madurado y la producción de amoníaco durante el proceso de maduración se analizó mediante la correlación de Pearson.

Experimento 23: Para evaluar la participación del ovocito en la variación del contenido de proteínas del COC y en la producción de amoníaco durante el proceso de maduración, ovocitos provenientes de la clase A<sub>1</sub> de COC fueron denudados y luego madurados *in vitro* en presencia de gonadotrofinas. Al concluir las 48 hs. de maduración *in vitro* se determinó el contenido de proteínas del ovocito, la producción de amoníaco y se determinó el estado de maduración meiótica en una alícuota de los ovocitos utilizados en cada experiencia. En simultáneo COCs pertenecientes a la misma clase fueron madurados *in vitro* en presencia de gonadotrofinas. Luego de las 48 hs. de cultivo los ovocitos fueron denudados y se determinó su contenido final de proteínas y el estado de maduración meiótica en una alícuota de los COCs utilizados. Ovocitos inmaduros provenientes de la clase A<sub>1</sub> de COC fueron denudados y utilizados para cuantificar el contenido de proteínas inicial del ovocito. Las comparaciones estadísticas del contenido de proteínas se realizaron por la prueba de ANOVA.

Experimento 24: Para evaluar la correlación entre el número de células del cumulus y en el contenido de proteínas de los COCs y su posible variación debido al proceso de maduración, se utilizaron COCs pertenecientes a las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> inmaduros y madurados *in vitro* en ausencia y presencia de gonadotrofinas. Se determinó el estado de maduración meiótica en una alícuota de los COCs utilizados en cada experiencia. Las comparaciones estadísticas de los porcentajes de maduración fueron realizadas por la prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado. El grado de asociación entre el número de células del cumulus y el contenido de proteínas del COC en las diferentes condiciones se analizó mediante la correlación de Pearson.

## Resultados

### ***Influencia de las características del cumulus que rodea al ovocito y de las gonadotropinas en el metabolismo de aminoácidos***

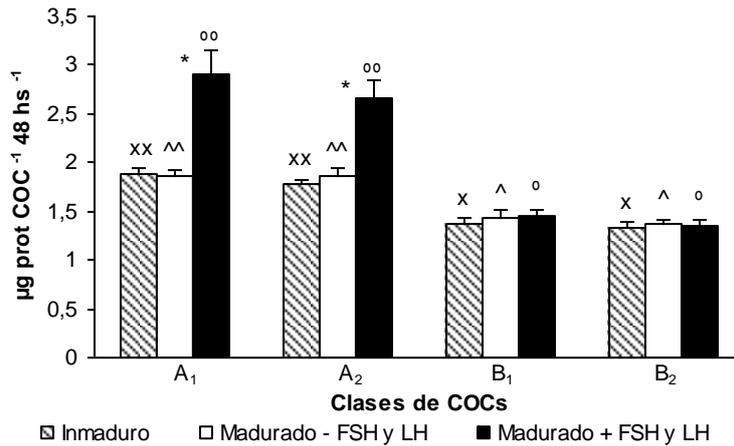
De igual modo que al estudiar el metabolismo de los hidratos de carbono, en el presente capítulo se evaluó la relevancia de las características del cumulus en el metabolismo de los aminoácidos en las cuatro clases de COCs aptas para madurar meióticamente. Además, se prosiguió con el análisis de la influencia de las hormonas en el metabolismo de aminoácidos en cada clase de COC.

### **Variación en el contenido de proteínas del COC durante la maduración in vitro**

En los COCs inmaduros se observó mayor contenido de proteínas en las clases A respecto de las clases B ( $p < 0,05$ ), no habiendo diferencia entre  $A_1$  y  $A_2$  y entre  $B_1$  y  $B_2$ .

Del mismo modo, se observó mayor contenido de proteínas en los COCs de las clases A respecto a las clases B al ser madurados sin gonadotropinas ( $p < 0,05$ ), no habiendo diferencia entre  $A_1$  y  $A_2$  y entre  $B_1$  y  $B_2$ . En ninguna de las clases de COCs se detectó aumento en el contenido de proteínas debido a la maduración sin gonadotropinas.

Se observó aumento en el contenido de proteínas en las clases A durante la maduración debido a la presencia de gonadotropinas ( $p < 0,05$ ), en cambio en las clases B no se detectó incremento en el contenido de proteínas por acción de las hormonas (Experimento 22) (**Figura 39**).



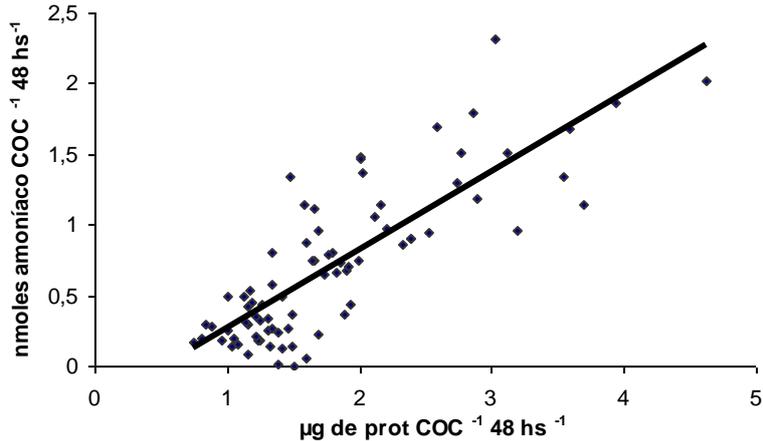
**Figura 39:** Contenido de proteínas en las distintas clases de COCs inmaduros y madurados *in vitro*. <sup>xx, xy, yy, zz, \*</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente entre clases de COCs ( $p < 0,05$ ). \* Difieren significativamente en la misma clase de COC Inmaduro y Madurado – FSH y LH vs. Madurado + FSH y LH ( $p < 0,05$ ). Experimento 22.  $n = 9 - 11$  para cada valor.

## Producción de amoníaco durante la maduración *in vitro*

La producción de amoníaco fue mayor en las clases A respecto de las clases B durante la maduración sin gonadotrofinas ( $p < 0,05$ ), no habiendo diferencia entre A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> y entre B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>. La producción de amoníaco aumentó en las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y B<sub>1</sub> durante la maduración debido a la presencia de las hormonas, resultando en orden decreciente: clase A<sub>1</sub>, clase A<sub>2</sub> y clase B<sub>1</sub> ( $p < 0,05$ ). En la clase B<sub>2</sub> no se detectó aumento en la producción de amoníaco por acción de las gonadotrofinas (Experimento 22) (**Figura 40**).

En las experiencias realizadas para analizar la cantidad de proteínas del COC y la producción de amoníaco, el porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II no difirió en ausencia o presencia de FSH y LH ni entre las clases de COCs (porcentaje de maduración meiótica promedio 54,9 %,  $n = 337$ ).





**Figura 41:** Correlación entre contenido de proteínas y producción de amoníaco de los COCs madurados *in vitro* ( $r = 0,82$ ;  $p = 0,0000$ ). Experimento 22.

### Variación en el contenido de proteínas y producción de amoníaco por el ovocito denudado durante la maduración *in vitro*

La variación en el contenido de proteínas totales y la producción de amoníaco durante la maduración *in vitro* resultaron mayores en las clases de COCs con cumulus íntegro en presencia de gonadotrofinas, sugiriendo la participación preponderante del cumulus en ambos parámetros. Para confirmar la participación relativa del ovocito y de las células del cumulus en el contenido de proteínas totales del COC y la producción de amoníaco se procedió a determinar los mismos parámetros en ovocitos denudados provenientes de COCs clase A<sub>1</sub>.

Con las técnicas utilizadas no se registró variación en el contenido de proteínas totales en los ovocitos porcinos denudados ni producción de amoníaco por los mismos durante las 48 hs. de cultivo *in vitro* ( $n = 8$ , Experimento 23) (**Tabla 4**). El porcentaje de maduración meiótica promedio observado en esta experiencia con ovocitos denudados fue 27,5 % ( $n = 40$ ).

Tampoco se evidenció variación en el contenido de proteínas del ovocito denudado luego de la maduración del COC *in vitro* ( $n = 8$ , Experimento 23) (**Tabla 4**).

El porcentaje de maduración meiótica promedio observado en esta experiencia fue 60 % (n = 40).

| Tabla 4                           | Ovocito Inmaduro       | Ovocito denudado y luego madurado | Ovocito madurado y luego denudado |
|-----------------------------------|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| µg de prot. Ovocito <sup>-1</sup> | 1,4 ± 0,1 <sup>a</sup> | 1,3 ± 0,1 <sup>a</sup>            | 1,3 ± 0,1 <sup>a</sup>            |

**Tabla 4:** Contenido de proteínas de los ovocitos porcinos inmaduros y madurados in vitro.

<sup>a</sup> Valores con igual superíndice no difieren significativamente. Experimento 23. n = 8 para cada valor.

### Correlación entre el número de células del cumulus y el contenido de proteínas del COC

Con el objetivo de analizar la dependencia entre la variación del contenido de proteínas y la variación del número de células del cumulus, se calculó la correlación entre las variables en la misma muestra de COCs. La estimación del número de células del cumulus sólo pudo realizarse en las muestras de COCs pertenecientes a las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> debido a la sensibilidad de la técnica de cuantificación de ADN.

Se observó alta correlación positiva entre el número de células de cumulus y el contenido de proteínas en los COCs inmaduros y en los COCs madurados en presencia de gonadotrofinas, sin embargo no se observó correlación significativa en los COCs madurados sin gonadotrofinas (Experimento 24) (**Tabla 5**).

En las experiencias realizadas para analizar correlación entre el número de células del cumulus y el contenido de proteínas del COC, el porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II no difirió en ausencia o presencia de FSH y LH ni entre las clases de COCs (porcentaje de maduración meiótica promedio 56,6 %, n = 175).

| Tabla 5 | Inmaduro | Madurado – FSH y LH | Madurado + FSH y LH |
|---------|----------|---------------------|---------------------|
| r       | 0,92     | 0,28                | 0,70                |
| p       | 0,0000   | 0,2513              | 0,0026              |
| n       | 15       | 19                  | 16                  |

**Tabla 5:** Correlación entre número de células del cumulus y contenido de proteínas de los COCs inmaduros y madurados *in vitro* en ausencia y presencia de gonadotropinas (Experimento 24).

## Discusión

La formulación del medio utilizado para la maduración de los ovocitos (Anexo 1) incluye veintiún aminoácidos que podrían ser utilizados por las células para la síntesis de proteínas y de otros compuestos nitrogenados, o bien ser degradados para utilizar los esqueletos carbonados como sustratos energéticos; esta última alternativa requiere la desaminación de los mismos. Si bien los diferentes aminoácidos pueden tener diversos destinos, todos ellos liberarían  $\text{NH}_3$  al ser catabolizados. La sumatoria de los aminoácidos presentes en el medio 199 da una concentración final de 5,71 mM, la cual es similar a la concentración del principal sustrato energético del medio (glucosa 5,56 mM). Además, en la composición del medio se hallan otros compuestos que contienen nitrógeno y podrían liberar  $\text{NH}_3$  al ser catabolizados (adenina, adenosina, glutatión, guanina, hipoxantina, timina, uracilo, xantina, colina, inositol, niacina, niacinamida, piridoxina, riboflavina y tiamina), sin embargo, todos estos compuestos sumados alcanzan una concentración final de 0,04 mM, por lo que su posible aporte a la producción de  $\text{NH}_3$  en el medio de cultivo es considerablemente menor.

En los ensayos realizados se observó un mayor contenido de proteínas totales en las clases  $A_1$  y  $A_2$  respecto a las clases  $B_1$  y  $B_2$ , tanto en COCs inmaduros como

madurados *in vitro*. Esta diferencia se podría deber al mayor número de células del cumulus presentes en dichos complejos (Capítulo 1), así como también a un mayor contenido de matriz extracelular por tratarse de COCs de mayor tamaño.

En el caso de los COCs inmaduros se observó una muy alta correlación positiva entre el número de células del cumulus y el contenido de proteínas ( $r = 0,92$ ), demostrando la relación entre las variables y proponiendo que el contenido de proteínas de los COCs inmaduros dependería principalmente del número de células del cumulus.

En las experiencias desarrolladas se ha demostrado que la síntesis de proteínas en los COCs porcinos es estimulada por la presencia de gonadotrofinas en el medio de maduración, efecto observado exclusivamente en las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>. Estos resultados sugieren que las células del cumulus serían principalmente las encargadas de responder al estímulo gonadotrófico con un incremento en la síntesis proteica. Tal proposición es reforzada por la falta de variación en el contenido de proteínas del ovocito desnudo luego del proceso de maduración. La estimulación de la síntesis de proteínas por las gonadotrofinas ha sido demostrada también en los COCs bovinos (Gutnisky y col., 2007). Es destacable observar que se mantiene la alta correlación positiva entre el número de células del cumulus y el contenido de proteínas de los COCs luego de la maduración con gonadotrofinas ( $r = 0,70$ ). Se advierte un aumento tanto del número de células del cumulus, alcanzando 1,3 veces el valor del COC inmaduro (Capítulo 1), como del contenido de proteínas totales, llegando a 1,5 veces el valor del COC inmaduro. Estos resultados sugieren que la FSH y la LH estimularían la síntesis proteica de tipo celular principalmente, correspondiendo a la misma aproximadamente el 60 % del total de proteínas sintetizadas, mientras el 40 % restante correspondería a síntesis de proteínas de la matriz extracelular. Por otro lado, durante la maduración sin el estímulo hormonal la síntesis de proteínas no parecería ser estimulada. La alta correlación positiva entre el número de células del cumulus y el contenido de proteínas se pierde luego de la maduración sin hormonas ( $r = 0,28$ ). La

causa de tal efecto sería la pérdida de aproximadamente el 20 % de las células del cumulus (Capítulo 1) acompañada por el mantenimiento del contenido de proteínas del COC durante la maduración. Esto sugiere que habría algún nivel de síntesis de proteínas a pesar de la falta de estímulo hormonal, que posiblemente corresponda a proteínas de la matriz extracelular.

En el experimento 23 no se observó diferencia en el contenido de proteínas totales del ovocito desnudo inmaduro o madurado *in vitro*. Por otra parte, en el ovocito bovino se ha observado la disminución en el contenido de proteínas totales durante la maduración *in vitro* (Cetica y col., 2001). Si bien la determinación cuantitativa del contenido de proteínas totales realizada indica que en el porcino la síntesis de proteínas se produciría principalmente en las células del cumulus, no puede obviarse la necesidad de síntesis proteica en el ovocito para la maduración normal del gameto. Al estudiar la síntesis de algunas proteínas en particular, ha sido demostrado que el ovocito porcino tiene la capacidad de sintetizar proteínas que determinan su habilidad para reiniciar la meiosis aún al ser madurados en medio sin gonadotrofinas o cultivados los ovocitos desnudos (Sun y col., 2001). En estudios similares se determinaron cambios cualitativos en las proteínas sintetizadas por el ovocito bovino durante la maduración *in vitro* (Wu y col., 1996). Por lo tanto, no se produciría un aumento en el contenido total de proteínas de los ovocitos, pero la síntesis de diversas proteínas regulatorias sería necesaria para la maduración de los ovocitos en ambas especies.

La producción de amoníaco observada durante la maduración *in vitro* de las diferentes clases de COCs porcinos sugiere que los aminoácidos presentes en el medio de maduración son catabolizados por dichos complejos. La mayor producción de amoníaco por parte de las clases de COCs con cumulus íntegro (clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>) indica que el catabolismo de los aminoácidos se produciría principalmente en las células del cumulus. Tal proposición se ve reforzada al no detectarse con las técnicas utilizadas producción de amoníaco por los ovocitos desnudos durante las 48 hs. de

cultivo *in vitro*. Si bien no se ha informado la presencia de desaminasas en el COC, en el bovino se ha demostrado una alta actividad de transaminasas en las células del cumulus respecto del ovocito y se propuso su relación con la provisión de sustratos oxidativos al gameto femenino (Cetica y col., 2003). Por otro lado, la generación de amoníaco a partir de otras fuentes de nitrógeno presentes en el medio de cultivo resultaría despreciable en comparación a la producción a partir de los aminoácidos, ya que la concentración total de estos últimos es 131 veces superior.

En las experiencias realizadas se ha determinado un aumento en la producción de amoníaco en las clases de COCs A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y B<sub>1</sub> en presencia de gonadotrofinas en el medio de maduración. Estos resultados sugieren que las células del cumulus responderían al estímulo hormonal con un aumento en el catabolismo de aminoácidos. A su vez, la producción de amoníaco en la clase A<sub>1</sub> fue aproximadamente el doble al madurar en presencia de FSH y LH respecto a la registrada por los COCs madurados sin gonadotrofinas, mientras que en las clases A<sub>2</sub> y B<sub>1</sub> fue aproximadamente un 50 % superior bajo la acción de las hormonas respecto a sus correspondientes controles. La mayor producción de amoníaco de la clase A<sub>1</sub> en presencia de hormonas indicaría un mayor catabolismo de aminoácidos en estos complejos. Si bien la mayor producción de amoníaco de las clases A respecto a las clases B podría atribuirse al mayor número de células del cumulus, no se ha observado diferencia en su número entre las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, sugiriendo alguna influencia de las características del cumulus de la clase A<sub>1</sub> en la capacidad de respuesta a las hormonas. Ha sido descrito que varios aminoácidos son metabolizados hasta piruvato, el cual mediante la lactato deshidrogenasa puede ser reducido a lactato (Nelson y Cox, 2005b), resultando estos pasos un origen no glucolítico posible para la mayor producción de lactato observada en la clase A<sub>1</sub> (Capítulo 2). En roedores ha sido demostrada la acción de las gonadotrofinas mediando la utilización de los aminoácidos presentes en el medio de cultivo durante la maduración de los ovocitos *in vitro* (Kito y Bavister, 1997). En el caso del porcino, ha sido sugerido que las gonadotrofinas y el EGF en conjunto serían los

moduladores del efecto beneficioso de los aminoácidos sobre la maduración de los ovocitos *in vitro* (Hong y col., 2004). Sin embargo la influencia de la acción hormonal sobre el destino metabólico de los aminoácidos no había sido evaluada hasta el momento.

En el presente estudio se ha observado una importante estimulación del metabolismo de aminoácidos por las gonadotrofinas en las clases de COCs con cumulus íntegro (clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>), tanto en su catabolismo como en su utilización para la síntesis proteica. Si bien se hubiera esperado que al aumentar la síntesis de proteínas en respuesta a las hormonas el catabolismo de aminoácidos disminuyera, la alta correlación hallada entre el contenido de proteínas y la producción de amoníaco sugiere que los COCs porcinos utilizarían los aminoácidos para ambos destinos durante la maduración *in vitro*. Incluso, el contenido de proteínas de los COC madurados bajo la acción de las gonadotrofinas alcanzó valores de 1,6, 1,4 y 1 veces respecto a los madurados sin hormonas en las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y B<sub>1</sub> respectivamente, mientras que el alcanzado en la producción de amoníaco fue de 1,9, 1,6 y 1,5 veces respecto al COC madurado sin gonadotrofinas, respectivamente. El incremento superior en la producción de amoníaco sugiere que la estimulación hormonal induciría en mayor proporción la utilización de los aminoácidos con un destino catabólico.

En resumen, el mayor número de células del cumulus de las clases A explicaría el mayor contenido de proteínas de los COCs inmaduros pertenecientes a estas clases. A su vez, las gonadotrofinas estimularían la síntesis de proteínas principalmente en las células del cumulus durante la maduración *in vitro* de los COCs porcinos clases A.

Los aminoácidos presentes en el medio de maduración serían catabolizados por los COCs, como lo sugiere la producción de amoníaco observada. Esta degradación de los aminoácidos se produciría principalmente en las células del cumulus y sería estimulada por las gonadotrofinas. Este último aspecto estaría relacionado con las características propias del cumulus de la clase A<sub>1</sub>, pudiendo

contribuir en la mayor capacidad de maduración citoplasmática observada en esta clase de COC.

## **Capítulo 4**

### **Metabolismo de los lípidos en los complejos ovocito-cumulus durante la maduración in vitro**

## Introducción

Una de las principales funciones de los triglicéridos es servir como fuente de energía para las células. Para ello deben ser catabolizados a través de una serie de vías metabólicas (hidrólisis de triglicéridos,  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, ciclo de Krebs y cadena respiratoria) hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (Mayes y Botham, 2004b y 2004c). La hidrólisis de los triglicéridos es un proceso citosólico y la oxidación de los ácidos grasos para la obtención de energía se realiza totalmente en las mitocondrias (Berg y col., 2008b).

El citoplasma del ovocito es el lugar donde se desarrollan los procesos metabólicos que proveen la energía necesaria para las funciones celulares durante el proceso de maduración. El ovocito porcino presenta un característico color oscuro, este aspecto es conferido por el alto contenido de lípidos endógenos que se pueden observar formando gotas distribuidas en todo el citoplasma del gameto inmaduro (Fujihira y col., 2004). En los ovocitos porcinos, el número de gotas lipídicas aumenta durante la maduración *in vitro* por la transformación de aquellas grandes en otras más pequeñas (Cran, 1985; Niimura y col., 2002). Se han clasificado las diferentes conformaciones que pueden adquirir las gotas de lípidos en el ovocito porcino luego de la maduración, considerándose normal cuando las mismas son pequeñas y se hallan distribuidas en forma homogénea en todo el ovoplasma y anormal cuando la distribución es heterogénea o las gotas son de gran tamaño. Se ha observado mayor proporción de ovocitos con conformación normal de sus gotas de lípidos y distribución homogénea de las mitocondrias luego de la maduración de los COCs respecto a la maduración de los ovocitos denudados, sugiriendo que las células del cumulus cumplirían una función importante en la distribución de ambos elementos en el gameto (Cui y col., 2009). Además de la redistribución de las gotas lipídicas y las mitocondrias,

se demostró la colocalización de ambas estructuras a una distancia menor a 10 nm, tanto en ovocitos porcinos inmaduros como en aquellos madurados *in vitro*. La estrecha asociación de las mitocondrias con las gotas de lípidos sugeriría que las mismas mantendrían un contacto directo, el cual permitiría la eficiente difusión de los ácidos grasos desde estas gotas hacia las mitocondrias para su degradación (Sturmey y col., 2006). Se han observado cambios en el aspecto de las gotas de lípidos y de las mitocondrias durante la maduración de los ovocitos porcinos *in vitro* por la suplementación del medio con TGF- $\alpha$ , sin embargo no se conocen las implicancias metabólicas de tales cambios (Mito y col., 2009). Las gotas de lípidos modifican su estructura no sólo durante la maduración del ovocito, sino también durante la fecundación y el desarrollo embrionario, por lo que se cree que cumplirían una función importante en todas estas etapas (Kikuchi y col., 2002a).

Un ovocito porcino inmaduro contiene aproximadamente 161 ng de lípidos, un valor que casi triplica al determinado en los ovocitos de rumiantes (McEvoy y col., 2000). Ha sido demostrado que los triglicéridos son el componente principal de los lípidos intracelulares en los ovocitos porcinos inmaduros (Homa y col., 1986). En ovocitos bovinos y porcinos ha sido observada una disminución en el contenido de triglicéridos durante la maduración *in vitro* (Ferguson y Leese, 1999; Kim y col., 2001; Sturmey y Leese, 2003; Sturmey y col., 2006); este comportamiento sugeriría que los triglicéridos endógenos serían una importante fuente de energía para los ovocitos durante este proceso en ambas especies. Incluso, Ferguson y Leese (2006) han propuesto que esta función se extendería durante el proceso de fecundación y potencialmente en el desarrollo embrionario en el bovino. En diferentes tipos de células, varios compuestos han demostrado ser capaces de estimular la degradación de triglicéridos, entre los que se encuentran el dbAMPc y la forskolina (un potente activador de la adenilato ciclasa) (Seamon y col., 1981; Ho y Shi, 1982; Holm, 2003). Se ha observado la estimulación de la actividad lipolítica intracelular por forskolina durante el cultivo *in vitro* de blastocistos porcinos (Men y col., 2006). Sin embargo, la

participación de las células del cumulus y la relevancia de la estimulación gonadotrófica en el metabolismo lipídico de los COCs porcinos durante la maduración *in vitro* no han sido consideradas.

## **Materiales y métodos**

### ***Maduración de los ovocitos in vitro***

Se utilizaron las condiciones de maduración detalladas en la sección general con las particularidades descritas a continuación. En las experiencias para la evaluación del efecto de las gonadotrofinas fue utilizado como control el mismo medio de maduración sin el agregado de FSH y LH. Para evaluar el contenido de lípidos del ovocito se maduraron 20 COCs en gotas de 200  $\mu$ l.

### ***Determinación del contenido de lípidos del ovocito***

El contenido de lípidos neutros de los ovocitos se determinó según la técnica descrita por Genicot y col. (2005) y Leroy y col. (2005) con algunas modificaciones. Los ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* fueron desnudados e incubados a 37°C durante 2 hs. en una solución del fluorocromo Rojo Nilo 10  $\mu$ g/ml y polivinilalcohol 0,1 % (m/v) en solución fisiológica. La fluorescencia fue cuantificada por medición de las fotografías digitales tomadas bajo microscopio de epifluorescencia (excitación: 510 nm y emisión: 590 nm). Las fotografías obtenidas fueron analizadas con el software Image J 1.240 midiendo la cantidad de fluorescencia emitida por cada ovocito. Los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias de fluorescencia x ovocito<sup>-1</sup>. Luego de la

determinación del contenido de lípidos se evaluó la maduración meiótica de los ovocitos.

## ***Diseño de experimentos y análisis estadístico***

Experimento 25: Para evaluar la influencia del cumulus y de las gonadotrofinas sobre la variación en el contenido de lípidos de los ovocitos debido al proceso de maduración, se analizaron COCs de las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> inmaduros y madurados *in vitro* en ausencia y presencia de gonadotrofinas. Se determinó el contenido de lípidos mediante el fluorocromo Rojo Nilo y el estado de maduración meiótica del ovocito. Las comparaciones estadísticas de los porcentajes de maduración fueron realizadas por la prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado y las del contenido de lípidos de los ovocitos mediante un ensayo factorial 4 x 3.

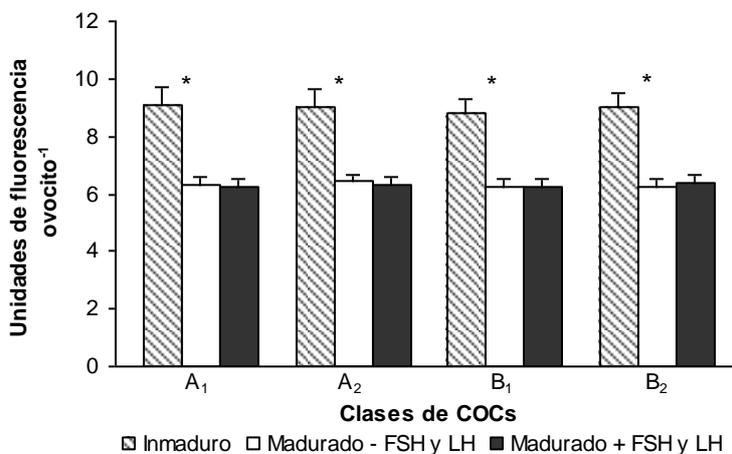
## **Resultados**

### ***Influencia de las características del cumulus que rodea al ovocito y de las gonadotrofinas en el metabolismo de los lípidos***

Otros autores han demostrado que las células del cumulus y el suplemento del medio de cultivo afectan la estructura y la distribución de las gotas de lípidos en el citoplasma de los ovocitos porcinos. En las experiencias desarrolladas en este capítulo se evaluó la influencia de las características del cumulus que rodea al ovocito y la injerencia de las gonadotrofinas en el metabolismo de los lípidos endógenos del gameto, para ello se cuantificó la variación en el contenido de lípidos de los ovocitos en cada clase de COC al ser madurados en ausencia y presencia de hormonas.

## Variación en el contenido de lípidos en los ovocitos durante la maduración *in vitro*

Debido a la maduración *in vitro* se produjo una disminución en el contenido lipídico de los ovocitos en todas las clases de COCs ( $p < 0,05$ ), no observándose efecto por la presencia de gonadotropinas. Tampoco se observó diferencia en el contenido de lípidos entre los ovocitos provenientes de las diferentes clases de COCs (Experimento 25) (**Figura 42**).

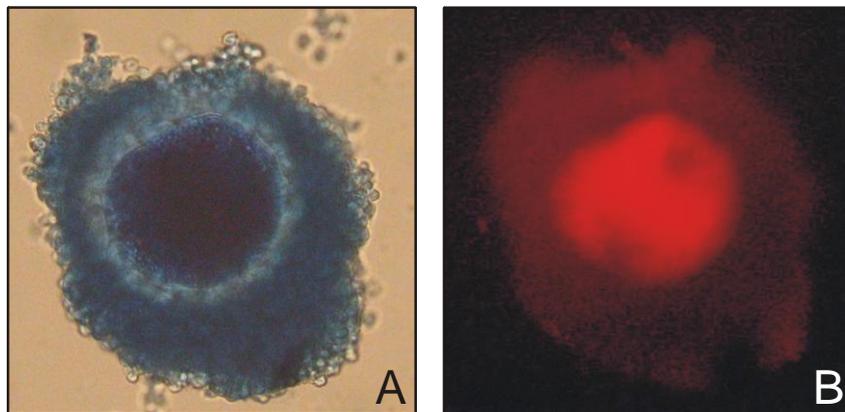


**Figura 42:** Contenido de lípidos en los ovocitos de las distintas clases de COCs inmaduros y madurados *in vitro*. Barras de igual de color no difieren significativamente. \* Difieren significativamente en la misma clase de COC Inmaduro vs. Madurado – FSH y LH y Madurado + FSH y LH ( $p < 0,05$ ). Experimento 25.  $n = 64 - 78$  para cada valor.

En las experiencias realizadas para analizar el contenido de lípidos, el porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II no difirió en ausencia

o presencia de FSH y LH ni entre las clases de COCs (porcentaje de maduración meiótica promedio 58,2 %, n = 612).

***Apreciación del contenido relativo de lípidos del ovocito y el cumulus mediante el fluorocromo Rojo Nilo.***



**Foto 9:** A y B fotos apareadas: A - Complejo ovocito-cumulus inmaduro teñido con Rojo Nilo bajo microscopia de luz blanca. B - Fluorescencia de los lípidos en el ovocito y en las células del cumulus en el mismo complejo (250x).

En la **Foto 9** se puede observar el contenido de lípidos del complejo ovocito-cumulus con la tinción de Rojo Nilo. Si bien la fluorescencia indica la presencia de lípidos tanto en el ovocito como en las células del cumulus, la intensidad de la misma resulta ampliamente superior en el gameto, indicando que el contenido de lípidos del ovocito es considerablemente superior al del cumulus.

## **Discusión**

Para la maduración de los ovocitos porcinos *in vitro* se utilizó medio 199 suplementado con suero fetal bovino. El medio contiene acetato a una concentración 0,61 mM (Anexo 1), pero el mismo debe ser activado a acetil-CoA para servir de sustrato al ciclo de Krebs o a la síntesis de ácidos grasos, no habiendo sido aún descrito este proceso en los COCs. El suplemento utilizado aporta a la formulación una variedad de ácidos grasos, siendo los componentes mayoritarios el linoleico, palmítico y esteárico. Se ha observado que la disminución en el contenido de triglicéridos de los ovocitos bovinos durante la maduración *in vitro* es menor al suplementar el medio con suero fetal bovino, sugiriéndose que los lípidos y los ácidos grasos de este suplemento podrían participar en el metabolismo lipídico del gameto (Kim y col., 2001).

En los ensayos realizados se evaluó el contenido relativo de lípidos neutros de los ovocitos porcinos con la técnica descrita por Genicot y col. (2005) y Leroy y col. (2005). Anteriormente Greenspan y col. (1985) señalaron, en otros tipos de células, la especificidad del Rojo Nilo para lípidos neutros a la longitud de onda utilizada en el presente trabajo. El grupo de lípidos neutros está compuesto por triacilgliceroles y ésteres de colesterol (Mayes y Botham, 2004a). Particularmente en los ovocitos porcinos fue descrito un alto contenido lipídico, siendo los triglicéridos el componente mayoritario (Homa y col., 1986; McEvoy y col., 2000). Por lo tanto, la variación en el contenido de lípidos determinada con Rojo Nilo puede atribuirse principalmente a la variación en el contenido de triglicéridos del ovocito. Refuerza esta propuesta la observación que los ácidos grasos palmítico, esteárico y oleico son los más abundantes en el ovocito porcino (McEvoy y col., 2000), siendo estos compuestos los constituyentes principales de los lípidos de reserva en esta especie (Kaufmann y Saelzer, 1976).

Ha sido demostrado por varios autores que el contenido de lípidos en los ovocitos contribuye a la apariencia morfológica del ovoplasma (Kim y col., 2001; Leroy y col., 2005; Fujihira y col., 2004). Las clases de COCs porcinos descritas en este

trabajo presentan diferencias morfológicas apreciables bajo lupa estereoscópica cuando el cumulus rodea al ovocito. Sin embargo, en los ovocitos desnudos que se obtienen de las diferentes clases no se evidenciaron diferencias morfológicas bajo lupa estereoscópica o microscopio óptico (datos no mostrados). El similar contenido de lípidos hallado en los ovocitos inmaduros provenientes de las diferentes clases de COCs resulta acorde con la apariencia morfológica del ovoplasma observada luego de la desnudación de los ovocitos porcinos y sugiere que el contenido de lípidos del ovocito inmaduro no estaría relacionado con las características del cumulus que lo rodea. Además, en la evaluación del COC completo puede apreciarse la mayor concentración de lípidos en el ovocito respecto al cumulus, indicando que el metabolismo de estos compuestos debería realizarse principalmente en el gameto.

En las experiencias desarrolladas, todas las clases de COCs evaluadas mostraron una disminución de similar magnitud en el contenido lipídico de los ovocitos durante la maduración *in vitro*. El análisis realizado en las distintas clases de COCs indicaría que el consumo de lípidos endógenos en el gameto porcino sería independiente de las características del cumulus que rodea al ovocito, siendo la primera vez que este aspecto del metabolismo lipídico es considerado. Las células del cumulus son de gran importancia para la regulación del nivel de diversos compuestos intracelulares en el ovocito (Leese y Barton, 1984; Grupen y col., 1995; Yamauchi y Nagai, 1999; Cetica y col., 2002 y 2003). En roedores, bovinos y porcinos se ha demostrado la participación de las células del cumulus en la utilización por parte del ovocito de metabolitos exógenos, como hidratos de carbono y aminoácidos (Buccione y col., 1990; Brackett y Zuelke, 1993; Ka y col., 1997; Cetica y col., 1999b; Capítulo 2; Capítulo 3), sin embargo no ocurriría lo mismo en relación a la utilización de los lípidos endógenos en el ovocito porcino. Cui y col. (2009) demostraron la relación entre las células del cumulus y la distribución de las gotas de lípidos en el ovoplasma, sin embargo sus estudios estuvieron enfocados en la ultraestructura del gameto porcino sin incluir los aspectos metabólicos abordados en el presente trabajo. Los resultados

de este capítulo indicarían algún grado de independencia metabólica entre el ovocito y las células del cumulus en relación a los lípidos neutros. Refuerza esta propuesta lo observado anteriormente por Cetica y col. (2002), quienes detectaron alta actividad de lipasa en el ovocito bovino durante la maduración *in vitro*, mientras que observaron una disminución de la misma en las células del cumulus, sugiriendo que el ovocito podría utilizar lípidos como sustrato oxidativo incluso luego de ser separado del cumulus que lo rodea.

También cabe resaltar que la injerencia de las gonadotrofinas en el metabolismo lipídico de los ovocitos no había sido evaluada anteriormente. En los estudios realizados se ha observado que el consumo de lípidos en los ovocitos porcinos durante la maduración *in vitro* no fue afectado por la presencia de gonadotrofinas, sugiriendo la falta de regulación de la lipólisis por parte de las mismas en el COC porcino. Esta situación es diferente a lo demostrado respecto a la regulación del metabolismo glucolítico y de los aminoácidos por acción de la FSH y la LH en los COCs porcinos.

En las clases de COCs evaluadas, la maduración meiótica y el metabolismo de los lípidos endógenos demostraron ser independientes de las características del cumulus y de la estimulación hormonal, sugiriendo que estos aspectos estarían regulados por factores propios del ovocito. Por otro lado, si bien la variación en la capacidad de madurar citoplasmáticamente y la similar disminución en el contenido de lípidos de los ovocitos observada en las distintas clases de COCs sugieren que ambos eventos se desarrollarían independientemente, no puede afirmarse que no exista relación entre ellos, ya que ha sido demostrado que la inhibición de la oxidación de ácidos grasos mediante el bloqueo de su incorporación a la mitocondria durante la maduración *in vitro* de los ovocitos porcinos y bovinos afecta su capacidad de alcanzar el estadio de blastocisto (Sturmey y col., 2006; Ferguson y Leese, 2006). Si bien la utilización de los lípidos propios en los ovocitos estaría relacionada con la maduración

citoplasmática de los mismos, la regulación de estos aspectos metabólicos podría ser independiente de la maduración citoplasmática del gameto.

En resumen, el contenido de lípidos del ovocito inmaduro no estaría relacionado con las características del cumulus que lo rodea. Las clases de COCs evaluadas mostraron una disminución de similar magnitud en el contenido lipídico de los ovocitos durante la maduración *in vitro*, sugiriendo que el consumo de lípidos endógenos en el gameto porcino sería independiente de las características del cumulus que rodea al ovocito. Además, la mayor concentración de lípidos en el ovocito respecto al cumulus, refuerza la proposición que el metabolismo de estos compuestos se produciría principalmente en el gameto. Los resultados de este capítulo indicarían algún grado de independencia metabólica entre el ovocito y las células del cumulus en relación a los lípidos neutros. El consumo de lípidos en los ovocitos porcinos observado durante la maduración *in vitro* no fue afectado por la presencia de gonadotrofinas, sugiriendo la falta de regulación de la lipólisis por parte de las mismas en el COC porcino.

## **Capítulo 5**

### **Producción de especies reactivas del oxígeno durante la maduración in vitro de los complejos ovocito-cumulus**

## Introducción

El efecto de las ROS en el cultivo de ovocitos de mamíferos ha sido evaluado anteriormente, describiéndose múltiples alteraciones como consecuencia del estrés oxidativo generado por compuestos exógenos adicionados durante la maduración *in vitro*. En el porcino, ha sido informado que la presencia de ROS durante la maduración *in vitro* afecta el progreso de la meiosis provocando una disminución del número de ovocitos que alcanzan el estadio de metafase II, comprometiendo también la maduración citoplasmática y la competencia de desarrollo de los embriones. Asimismo se ha demostrado que las ROS tienen la capacidad de producir daño en el ADN y de inducir la muerte celular por mecanismos de apoptosis en los ovocitos (Tatemoto y col., 2000; 2001; 2004). En ovocitos de ratón fueron observadas alteraciones en la estructura de los husos meióticos inducidas por estrés oxidativo durante la maduración *in vitro* y se propuso que las ROS participarían en el arresto meiótico del ovocito (Downs y Mastropolo, 1994; Zhang y col., 2006b; Choi y col., 2007). Se ha demostrado que la presencia de ROS durante el cultivo *in vitro* puede inducir la apoptosis en ovocitos humanos (Zhang y col., 2006a). En ovocitos bovinos se observó que el estrés oxidativo durante la maduración *in vitro* afecta su competencia de desarrollo (Fatehi y col., 2005). La maduración de ovocitos bovinos en medios ricos en glucosa y con altas tensiones de oxígeno aumenta la producción de ROS afectando su competencia de desarrollo (Hashimoto y col., 2000). También se ha demostrado que la tensión de oxígeno utilizada en el cultivo de embriones porcinos *in vitro*, idéntica a la de

maduración, es capaz de inducir la acumulación de ROS en los mismos provocando lesiones en el ADN y afectando su desarrollo (Kitagawa y col., 2004).

En el cerdo, ha sido sugerido que las células del cumulus protegerían a los ovocitos del estrés durante el cultivo *in vitro*, dando como resultado una mejor maduración nuclear y citoplasmática (Tatemoto y col., 2000; Somfai y col., 2004). Una de las explicaciones propuestas para tal efecto sería su relación con el contenido citoplasmático de glutatión (Yamauchi y Nagai, 1999; Tatemoto y col., 2000). También se ha demostrado que al estimular los COCs con FSH durante la maduración *in vitro* se obtiene un mayor nivel de glutatión en las células del cumulus y el ovocito porcino (Ozawa y col., 2010). Se ha propuesto que la presencia de las células del cumulus rodeando al gameto durante la maduración *in vitro* regularía el contenido citoplasmático de glutatión, el cual sería sintetizado por estas células y acumulado en el ovocito (Tatemoto y col., 2000; Maedomari y col., 2007). A su vez, el contenido de glutatión del gameto sería importante para la formación de pronúcleos y su posterior desarrollo hasta el estadio de blastocisto luego de la fecundación (Maedomari y col., 2007). Además, ha sido demostrado que durante la maduración *in vitro* las células del cumulus protegen al ovocito del daño celular por estrés oxidativo debido a la adición de ROS exógenas, efecto que estaría mediado por el incremento en el contenido de glutatión del gameto (Tatemoto y col., 2000).

El medio de maduración de los ovocitos porcinos es suplementado rutinariamente con diversos compuestos que aseguran el adecuado nivel de glutatión en el gameto (Sawai y col., 1997; Abeydeera y col., 1999; Yamauchi y Nagai, 1999; Viet Linh y col., 2009). Se ha demostrado que la adición de cisteamina al medio de maduración incrementa la capacidad de los ovocitos de formar pronúcleos, así como la competencia de desarrollo de los embriones luego de la fecundación (Gruppen y col., 1995). Tales efectos serían mediados por su capacidad de aumentar el contenido de glutatión de los ovocitos (Yamauchi y Nagai, 1999). De igual modo, ha sido comprobado que la presencia de cisteína y  $\beta$ -mercaptoetanol en el medio de

maduración produce un incremento en el nivel de glutatión de los ovocitos, con la consecuente mejora en la maduración citoplasmática (Sawai y col., 1997; Abeydeera y col., 1999; Tatemoto y col., 2001; Viet Linh y col., 2009). Se ha propuesto que un adecuado balance redox en el ovocito mediaría en parte tal efecto (Viet Linh y col., 2009). También ha sido observado que la adición tanto de cisteamina como de  $\beta$ -mercaptoetanol durante la maduración *in vitro* de ovocitos ovinos estimula la síntesis de glutatión y produce una disminución de las ROS en el gameto (de Matos y col., 2002).

Al suplementar los medios de cultivo con diversos compuestos antioxidantes se ha demostrado su implicancia durante las diferentes etapas de la producción de embriones *in vitro*. En el cerdo, se observó que el suplemento con ácido ascórbico durante la maduración *in vitro* permite al ovocito alcanzar una concentración intracelular crítica del compuesto que desempeñaría un papel fundamental en la prevención del estrés oxidativo, sustentando la maduración citoplasmática responsable de la formación de pronúcleos y el subsiguiente desarrollo hasta el estadio de blastocisto. Este efecto del ácido ascórbico se observó incluso en la maduración de ovocitos desnudos en los que el contenido de glutatión disminuyó, por lo que se le atribuyó una función protectora contra el estrés oxidativo diferente a la del glutatión (Tatemoto y col., 2001). También se obtuvo un mayor porcentaje de blastocistos al suplementar con antioxidantes sintéticos el medio de maduración de los ovocitos porcinos (Whitaker y Knight, 2009). En el cultivo *in vitro* de embriones porcinos se ha observado un incremento en el desarrollo embrionario y una disminución en el nivel de ROS cuando se adiciona el medio con  $\beta$ -mercaptoetanol o vitamina E, sugiriéndose que tales compuestos protegerían al ADN del daño por estrés oxidativo (Kitagawa y col., 2004). Sin embargo, los resultados publicados en otras especies resultan contradictorios. Se observó la inhibición de la reanudación de la meiosis en ovocitos de rata por la adición de compuestos antioxidantes, sugiriendo que las ROS tendrían alguna función regulatoria en el proceso de maduración (Takami y col., 1999). En

ovocitos bovinos, el suplemento del medio de maduración con diversos antioxidantes (ácido ascórbico,  $\beta$ -mercaptoetanol, superóxido dismutasa,  $\alpha$ -tocoferol) no modificó los porcentajes de éxito de la maduración meiótica *in vitro*, pero se observó una disminución en el porcentaje de blastocistos obtenidos (Blondin y col., 1997; Dalvit y col., 2005b). También en el bovino se observó que la adición de antioxidantes al medio de fecundación *in vitro* afecta negativamente el proceso. Los antioxidantes presentes en este medio de cultivo redujeron el porcentaje de clivaje de los embriones, sugiriéndose que sería necesario cierto nivel de producción de ROS durante la maduración y fecundación de los ovocitos bovinos *in vitro* (Blondin y col., 1997; Dalvit y col., 1998).

El rol de las ROS durante la maduración *in vitro* sigue siendo controvertido y parecería no ser el mismo en las diferentes especies estudiadas. Particularmente en el cerdo, la participación de las ROS producidas por el propio ovocito en el proceso de maduración aún no ha sido evaluada. Si bien se ha propuesto la capacidad de las células del cumulus de proteger al ovocito del estrés oxidativo, su relevancia en la producción de ROS propia del gameto no ha sido contemplada. De igual modo, no se ha estudiado la influencia de la suplementación con hormonas y compuestos antioxidantes durante la maduración en la producción de ROS endógena del ovocito.

## **Materiales y métodos**

### ***Maduración de los ovocitos in vitro***

Se utilizaron las condiciones de maduración detalladas en la sección general con las particularidades descritas a continuación. En las experiencias para la evaluación del efecto de las gonadotrofinas y de la cisteína fue utilizado como control

el mismo medio de maduración sin el agregado de FSH y LH o sin el agregado de cisteína, respectivamente. Para evaluar la producción de ROS se maduraron 13 COCs en gotas de 130  $\mu$ l.

### ***Producción de ROS***

Para la determinación de la producción de ROS los ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* fueron desnudados e incubados a 37°C durante 30 minutos en una solución de diacetato de 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCHFDA) 5  $\mu$ M y BSA 0,3 % (m/v) en PBS (Le Bel y col., 1992). Para la determinación de la actividad de las esterasas los ovocitos desnudados fueron incubados a 37°C durante 15 minutos en una solución de diacetato de fluoresceína (FDA) 0,12  $\mu$ M y BSA 0,3 % (m/v) en PBS. La fluorescencia de ambas muestras fue cuantificada por medición de las fotografías digitales tomadas bajo microscopio de epifluorescencia (excitación: 450-490 nm y emisión: 520 nm). Las fotografías obtenidas fueron analizadas con el software Image J 1.240 midiendo la cantidad de fluorescencia emitida por cada ovocito.

Los niveles de fluorescencia detectados por DCHFDA son dependientes de la actividad de esterasas y de la producción de ROS. Por lo tanto, el nivel de ROS de cada ovocito fue corregido mediante el cociente entre la intensidad de fluorescencia del ovocito medida por DCHFDA y la media de la fluorescencia detectada por FDA en cada grupo de ovocitos (Lane y col., 2002). Los niveles de ROS fueron expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia  $\times$  ovocito<sup>-1</sup>  $\times$  minuto<sup>-1</sup>. Luego de la determinación del nivel de ROS se evaluó la maduración meiótica de los ovocitos.

## ***Diseño de experimentos y análisis estadístico***

Experimento 26: Para evaluar la influencia del cumulus y de las gonadotrofinas sobre la producción de ROS en los ovocitos durante la maduración, se utilizaron COCs de las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> inmaduros y madurados *in vitro* en ausencia y presencia de gonadotrofinas. Se determinó la producción de ROS en el ovocito inmaduro y madurado en ausencia y presencia de gonadotrofinas en cada clase de COC y el estado de maduración meiótica del ovocito. Las comparaciones estadísticas de los porcentajes de maduración fueron realizadas por la prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado y las del nivel de ROS de los ovocitos mediante un ensayo factorial 4 x 3.

Experimento 27: Para evaluar la influencia del cumulus y el efecto de la cisteína en la producción de ROS en los ovocitos durante la maduración, se utilizaron COCs de las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> inmaduros y madurados *in vitro* en ausencia y presencia de cisteína. Se determinó la producción de ROS en el ovocito inmaduro y madurado en ausencia y presencia de cisteína en cada clase de COC y el estado de maduración meiótica del ovocito. Las comparaciones estadísticas de los porcentajes de maduración fueron realizadas por la prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado y las del nivel de ROS de los ovocitos mediante un ensayo factorial 4 x 3.

Experimento 28: Para evaluar la influencia del cumulus y de la cisteína en la maduración citoplasmática, se maduraron COCs de las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> en ausencia y presencia de cisteína y luego fueron sometidos al procedimiento de fecundación. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas por la prueba de homogeneidad de Chi-cuadrado.

## **Resultados**

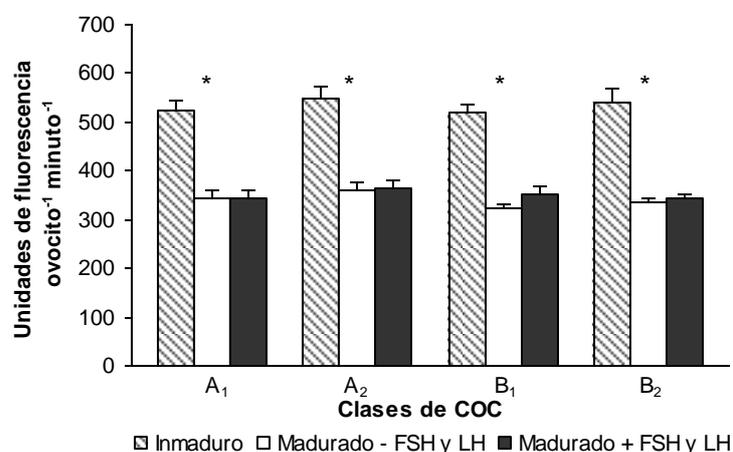
## **Producción de ROS en el ovocito durante la maduración *in vitro***

Las condiciones de cultivo utilizadas en la maduración *in vitro* de los COCs porcinos podría influir la producción de ROS en el ovocito, al igual que algunos factores que participan durante el proceso, como las características del cumulus y el suplemento con gonadotrofinas y cisteína.

### **Influencia de las características del cumulus y de las gonadotrofinas en la producción de ROS en el ovocito**

Las células del cumulus y las gonadotrofinas han demostrado estar relacionadas con la actividad metabólica del COC, de ese modo podrían afectar la producción de ROS en el ovocito.

Debido al proceso de maduración *in vitro* se produjo una disminución de la producción de ROS en los ovocitos de todas las clases de COCs ( $p < 0,05$ ), no observándose efecto por la presencia de gonadotrofinas. No se observó diferencia en el nivel de ROS entre los ovocitos provenientes de las diferentes clases de COCs (Experimento 26) (**Figura 43**).



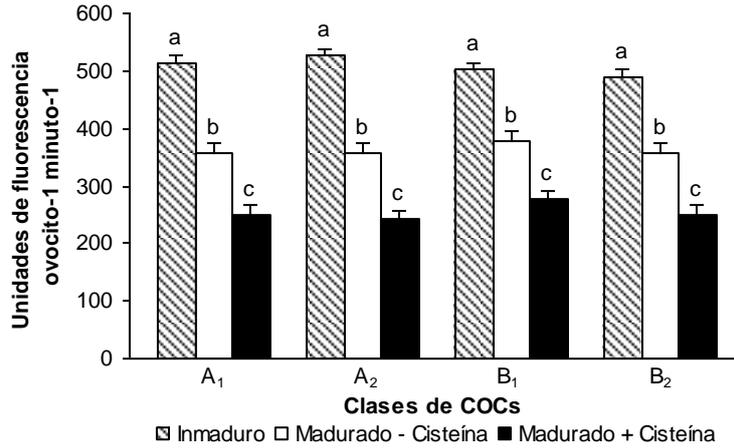
**Figura 43:** Producción de ROS en los ovocitos de las distintas clases de COCs inmaduros y madurados *in vitro*. Barras de igual de color no difieren significativamente. \* Difieren significativamente en la misma clase de COC Inmaduro vs. Madurado – FSH y LH y Madurado + FSH y LH ( $p < 0,05$ ). Experimento 26.  $n = 30$  para cada valor.

En las experiencias para analizar la producción de ROS, el porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II no difirió en ausencia o presencia de FSH y LH y tampoco entre las clases de COCs (porcentaje de maduración meiótica promedio 57,5 %,  $n = 240$ ).

### **Efecto de la cisteína sobre la producción de ROS en el ovocito**

Ha sido propuesto que el agregado de cisteína al medio de cultivo mejoraría la maduración de los ovocitos al aumentar el contenido de glutatión del gameto, efecto mediado por las células del cumulus. Sin embargo, no ha sido evaluado si tal condición afecta la producción de ROS en el ovocito porcino durante la maduración.

Se observó una disminución de la producción de ROS en los ovocitos de todas las clases de COCs debido a la maduración *in vitro* ( $p < 0,05$ ), observándose mayor disminución en presencia de cisteína ( $p < 0,05$ ). No se observó diferencia en el nivel de ROS entre los ovocitos provenientes de las diferentes clases de COCs (Experimento 27) (**Figura 44**).

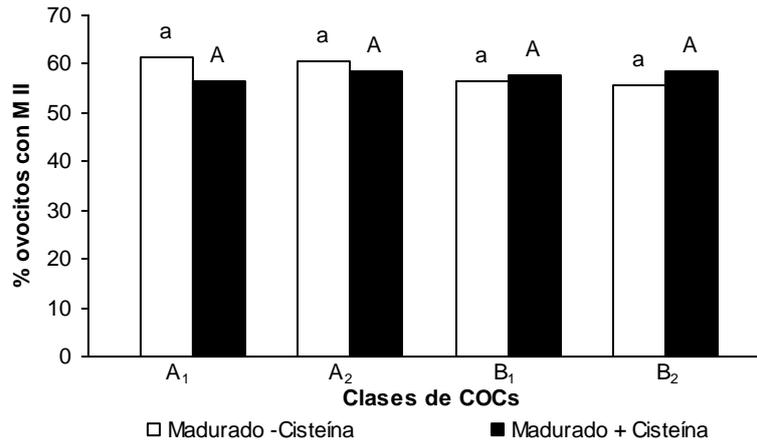


**Figura 44:** Producción de ROS en los ovocitos de las distintas clases de COCs inmaduros y madurados *in vitro*. Barras de igual de color no difieren significativamente. <sup>a, b, c</sup> Barras con diferentes superíndices difieren significativamente en la misma clase de COC ( $p < 0,05$ ). Experimento 27.  $n = 52 - 53$  para cada valor.

### Efecto de la cisteína sobre la maduración nuclear de los ovocitos *in vitro*

Para completar la evaluación del sistema de maduración utilizado se debió determinar la influencia de la adición de cisteína al medio de cultivo tanto en la maduración nuclear como en la citoplasmática de los ovocitos.

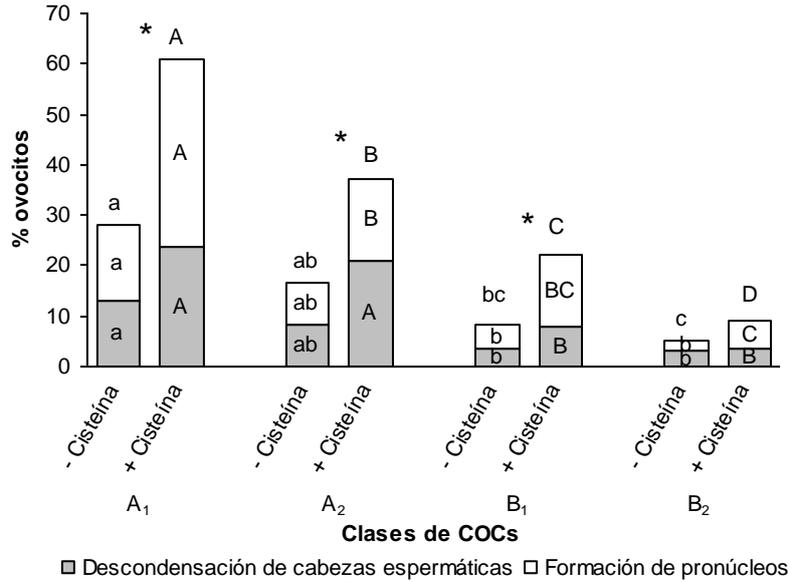
No se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II luego de la maduración en ausencia o presencia de cisteína en ninguna de las clases evaluadas. Además, el porcentaje de maduración nuclear resultó similar entre las distintas clases de COCs (Experimento 27) (**Figura 45**).



**Figura 45:** Porcentaje de ovocitos en metafase II en las distintas clases de COCs madurados en ausencia y presencia de cisteína. <sup>a</sup> y <sup>A</sup> Barras con igual superíndice no difieren significativamente entre clases de COCs. No hay diferencia significativa entre Madurado – Cisteína vs. Madurado + Cisteína en la misma clase de COC. Experimento 27. n = 52 – 53 para cada valor.

### Efecto de la cisteína sobre la maduración citoplasmática de los ovocitos in vitro

Los porcentajes de maduración citoplasmática resultaron superiores en todas las clases de COCs en presencia de cisteína ( $p < 0,05$ ), excepto en la clase B<sub>2</sub>. Los mayores porcentajes de maduración citoplasmática y de formación de pronúcleos fueron observados en la clase A<sub>1</sub> en presencia de cisteína ( $p < 0,05$ , Experimento 28) (Figura 46).



**Figura 46:** Porcentaje de ovocitos citoplasmáticamente maduros en las distintas clases de COCs madurados en ausencia y presencia de cisteína. *a, b, c y A, B, C, D* Barras con diferentes superíndices difieren significativamente entre clases de COCs al evaluar con el mismo parámetro ( $p < 0,05$ ). \* Difieren significativamente en la misma clase de COC Madurado – Cisteína vs. Madurado + Cisteína ( $p < 0,05$ ). Experimento 28.  $n = 56 - 63$  para cada valor.

Los porcentajes de activación partenogenética espontánea en el estadio de pronúcleos (18 hs.) fueron: 0 % clase A<sub>1</sub>, 0 % clase A<sub>2</sub>, 0 % clase B<sub>1</sub> y 0 % clase B<sub>2</sub> en el medio control y 0 % clase A<sub>1</sub>, 0 % clase A<sub>2</sub>, 0 % clase B<sub>1</sub> y 0 % clase B<sub>2</sub> en el medio suplementado con cisteína ( $n = 5$  para cada valor).

## Discusión

En el presente trabajo se determinó la producción de ROS endógena del ovocito por primera vez en la especie porcina. Los cultivos *in vitro* presentan mayor concentración de oxígeno que los ambientes *in vivo*, favoreciendo el aumento en los niveles de ROS (Luvoni y col., 1996). Sin embargo, se observó una disminución de los niveles de ROS durante la maduración de los ovocitos porcinos *in vitro* en el sistema

de cultivo empleado. Utilizando condiciones de cultivo semejantes a las del presente trabajo, ha sido demostrado que el nivel de ROS en los ovocitos bovinos madurados *in vitro* es similar al de los gametos inmaduros (Cetica y col., 2001; Dalvit y col., 2005a). Tales observaciones podrían deberse a la actividad de los sistemas removedores de ROS tanto enzimáticos como no enzimáticos. Durante el proceso de maduración *in vitro* se ha demostrado la actividad de un sistema enzimático antioxidante en los ovocitos bovinos (Cetica y col., 2001) y el aumento del contenido de glutatión en los ovocitos porcinos (Sawai y col., 1997; Abeydeera y col., 1999), considerado uno de los principales compuestos que protegen a las células contra el daño oxidativo (Matés, 2000).

Ha sido propuesto en el bovino por Fatehi y col. (2005) y en el porcino por Tatemoto y col. (2000) que las células del cumulus protegerían al ovocito del estrés oxidativo; sin embargo estos estudios fueron realizados con diversos sistemas generadores de ROS exógenos. En las experiencias realizadas en el presente trabajo, la evaluación de ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* reveló igual nivel de ROS en todas las clases de COCs, sugiriendo la falta de relación entre la producción de ROS endógena del gameto y las características del cumulus que lo rodea. Refuerza esta proposición lo observado en el bovino por Cetica y col. (2001), quienes no detectaron diferencia en la producción de ROS endógena entre ovocitos desnudos y luego madurados *in vitro* y ovocitos provenientes de COCs madurados *in vitro*, indicando que las células del cumulus no regularían la producción de ROS en el ovocito bovino.

La injerencia de las gonadotropinas en la producción de ROS de los ovocitos porcinos durante la maduración *in vitro* no había sido evaluada anteriormente. La presencia de FSH y LH durante las 48 horas de maduración no produjo variación en el nivel de ROS, indicando que la estimulación hormonal no modificaría la producción de ROS endógena de los ovocitos en esta especie.

Considerando de manera conjunta que los receptores para las gonadotropinas se expresan en las células de la granulosa y del cumulus (Priedkalns, 1994; Tanghe y

col., 2002) y la falta de relación entre la producción de ROS y las características del cumulus que rodea al ovocito, los resultados presentados sugerirían que el metabolismo del ovocito sería responsable del nivel de producción de ROS sin la participación del cumulus. Tal proposición ha sido realizada también en el bovino al demostrar que la denudación de los ovocitos inmaduros y posterior maduración *in vitro* no produce variación en el nivel de ROS del gameto (Cetica y col., 2001). La estimulación hormonal del metabolismo de los hidratos de carbono y de los aminoácidos en las células del cumulus no modificaría la producción de ROS endógena en los ovocitos, pudiendo esto deberse a que la última sería dependiente del metabolismo del ovocito sin la influencia del cumulus.

En las clases de COCs evaluadas la maduración meiótica y la producción de ROS en los ovocitos demostraron ser independientes de las características del cumulus y de la estimulación hormonal, sugiriendo que estos aspectos estarían regulados por factores propios del ovocito. Por otro lado, la diferencia en la maduración citoplasmática y la similar producción de ROS endógenas entre las distintas clases de COCs indicarían la independencia entre estos sucesos. Sin embargo, no puede afirmarse que no exista relación entre ellos, ya que se ha demostrado anteriormente el efecto de la adición de antioxidantes durante la maduración de los ovocitos porcinos y bovinos *in vitro* sobre su capacidad de alcanzar el estadio de blastocisto (Blondin y col., 1997; Tatemoto y col., 2001; Dalvit y col., 2005b; Whitaker y Knight, 2009). Si bien la producción de ROS endógena en los ovocitos estaría relacionada con la maduración citoplasmática de los mismos, la regulación de este aspecto del metabolismo podría ser independiente de la maduración citoplasmática del gameto.

En el presente trabajo al adicionar cisteína al medio de cultivo se produjo una disminución en el nivel de ROS de los ovocitos en todas las clases de COCs. Estos resultados sugieren que la adición de cisteína al medio de maduración contribuye al control de la producción de ROS de los ovocitos durante el cultivo *in vitro*

independientemente de las características del cumulus que rodea al gameto. En presencia de cisteína el progreso de la meiosis no se modificó en las diferentes clases de COCs, sin embargo el porcentaje de maduración citoplasmática resultó superior. Debe mencionarse que la falta de influencia de la cisteína en la maduración nuclear y su contribución para mejorar la maduración citoplasmática de los ovocitos porcinos había sido observada por otros autores (Sawai y col., 1997; Abeydeera y col., 1999), situación que se repite para el caso de la cisteamina (Grupen y col., 1995; Yamauchi y Nagai, 1999).

Ha sido demostrado que las células del cumulus porcinos sintetizan glutatión al ser cultivadas en presencia de gonadotrofinas y cisteína (Ozawa y col., 2010). La cisteína es utilizada durante la maduración de ovocitos porcinos *in vitro* para la síntesis de glutatión, el cual sería necesario para la formación de pronúcleos y el desarrollo embrionario luego de la fecundación (Sawai y col., 1997; Abeydeera y col., 1999; Viet Linh y col., 2009) y permitiría al gameto adquirir un adecuado estado redox (Viet Linh y col., 2009). Sin embargo, Tatemoto y col. (2001) observaron una mayor formación de pronúcleos con el agregado de ácido ascórbico al medio de maduración respecto al suplemento sólo de cisteína, incluso en ovocitos desnudos en los que el contenido de glutatión disminuyó. Estos autores propusieron que el ácido ascórbico contribuiría en la adquisición de la competencia de desarrollo por un mecanismo diferente al del glutatión, al prevenir el estrés oxidativo de los ovocitos porcinos durante la maduración *in vitro*. Del mismo modo, los resultados presentados en este capítulo sugieren que la adición de cisteína durante la maduración de los ovocitos porcinos *in vitro* podría contribuir en la adquisición de competencia de desarrollo no sólo a causa del aumento en los niveles de glutatión sino también a una mejor maduración citoplasmática debida a la reducción en la producción de ROS en los ovocitos. En concordancia con esta proposición, de Matos y col. (2002) hallaron una disminución en el nivel de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el ovocito ovino al adicionar cisteamina o β-mercaptoetanol al medio de cultivo durante la maduración *in vitro* y Whitaker y Knight (2009) observaron una mejor maduración

citoplasmática de los ovocitos porcinos con el suplemento de otros compuestos antioxidantes sintéticos.

En resumen, al determinarse por primera vez en la especie porcina la producción de ROS endógena en ovocitos, se observó una disminución del nivel de ROS durante la maduración *in vitro*, la cual sería independiente de las características del cumulus que rodea al gameto. Además, la estimulación hormonal no modificaría la producción de ROS endógena de los ovocitos porcinos. La falta de relación de la producción de ROS con las características del cumulus y la estimulación hormonal sugeriría que el metabolismo del ovocito sería responsable del nivel de producción de ROS sin la participación del cumulus.

La adición de cisteína al medio de maduración contribuiría al control de la producción de ROS de los ovocitos durante el cultivo *in vitro* independientemente de las características del cumulus que rodea al gameto y podría favorecer la adquisición de competencia de desarrollo no sólo a causa del aumento en los niveles de glutatión sino también a una mejor maduración citoplasmática debida a la reducción en la producción de ROS en los ovocitos.

## **Conclusiones generales**

- La vitalidad del ovocito inmaduro estaría relacionada con las características del cumulus que lo rodea.
- La maduración nuclear podría completarse independientemente de las características del cumulus en las clases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, siendo el estadio de vesícula germinal del ovocito inmaduro el factor principalmente involucrado en la progresión nuclear hasta metafase II. Contrariamente, la maduración citoplasmática tendría una dependencia más estrecha con el tipo de cumulus.
- La competencia de maduración de los ovocitos estaría más relacionada con las características del cumulus del COC inmaduro que con el tipo de expansión del cumulus durante el cultivo *in vitro*.
- La capacidad de las gonadotrofinas de estimular la maduración citoplasmática del ovocito dependería del tipo de cumulus que circunda al gameto.
- La glucólisis sería el destino principal de la glucosa consumida por el COC durante la maduración *in vitro*. La vía metabólica se desarrollaría principalmente en las células del cumulus, las cuales responderían a la estimulación gonadotrófica con un aumento en la actividad de la misma.
- La actividad glucolítica del COC no dependería del progreso meiótico del ovocito; por lo tanto, sería posible que en las células del cumulus se desarrolle la vía independientemente de la actividad bioquímica del ovocito.

- La actividad glucolítica en el COC sería necesaria para el progreso meiótico del gameto, ya que la inhibición de la vía metabólica (tanto con NaF como con ATP) impactó negativamente en la maduración nuclear del ovocito.
- El AMP no tendría efecto sobre la actividad glucolítica del COC independientemente de la acción de las gonadotrofinas. Sin embargo, podría actuar modulando otros aspectos bioquímicos de importancia para la maduración nuclear del ovocito.
- El estímulo gonadotrófico induciría la síntesis de proteínas en las células del cumulus. Si bien la FSH y la LH estimularían la síntesis proteica principalmente al inducir el aumento en el número de células, ante la falta de estímulo hormonal habría algún nivel de síntesis de proteínas, posiblemente de la matriz extracelular.
- Los aminoácidos presentes en el medio de cultivo serían catabolizados por los COCs durante la maduración *in vitro*. Las células del cumulus serían las encargadas de este proceso, respondiendo al estímulo gonadotrófico con un incremento en la actividad degradativa.
- Las gonadotrofinas estimularían la utilización de los aminoácidos tanto para su catabolismo como para la síntesis proteica en los COCs durante la maduración *in vitro*.
- El catabolismo de los aminoácidos podría estar relacionado con el metabolismo de los hidratos de carbono a través del lactato producido por las células del cumulus bajo estimulación gonadotrófica.

- La utilización de los triacilglicéridos contenidos en el gameto sería independiente de las características del cumulus que rodea al ovocito.
- La actividad de la vía lipolítica en el ovocito durante la maduración *in vitro* no estaría regulada por las gonadotrofinas.
- El metabolismo del ovocito durante la maduración *in vitro* sería responsable del nivel de producción de ROS sin la participación del cumulus.
- La producción de ROS endógena de los ovocitos durante la maduración *in vitro* no sería regulada por las gonadotrofinas.
- La adición de cisteína al medio de cultivo contribuiría al control de la producción de ROS de los ovocitos durante la maduración *in vitro* independientemente de las características del cumulus que rodea al gameto.
- El control de la producción de ROS de los ovocitos por acción de la cisteína mejoraría su capacidad de madurar citoplasmáticamente.
- Los distintos tipos de cumulus responderían de manera diferencial a la estimulación gonadotrófica, la cual induciría cambios metabólicos en el COC implicados en la maduración del ovocito.

## **Consideraciones finales**

En el presente trabajo se ha estudiado el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos, contribuyendo a dilucidar el perfil metabólico de los COCs porcinos durante la maduración *in vitro*. Además, se ha demostrado la participación de las gonadotrofinas en la regulación de las diferentes vías implicadas en la maduración de los ovocitos porcinos. Ha sido determinada por primera vez en la especie porcina la producción de ROS endógenas en el ovocito y la variación de su nivel durante el proceso de maduración. De este modo se ha logrado ampliar el conocimiento del metabolismo de los COCs, lo que permitiría establecer condiciones más favorables para la maduración de los ovocitos porcinos *in vitro* y desarrollar protocolos específicos basados en sus requerimientos particulares.

Al evaluar la maduración por la presencia de la placa cromosómica en metafase II no se observaron diferencias entre las clases de COCs A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, indicando que los ovocitos rodeados por un cumulus de menor tamaño o incompleto no serían totalmente incompetentes para madurar. Sin embargo, la deficiencia en la maduración citoplasmática en las clases B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> hace que estos tipos de COCs no sean aptos para el desarrollo embrionario. A su vez, en estas clases de COCs la actividad glucolítica y el metabolismo de aminoácidos resultaron menores en relación a las clases A, lo que podría resultar en un deficiente aporte de energía y/o intermediarios metabólicos a los ovocitos. El suplemento del medio de cultivo con los metabolitos que deberían ser aportados por las células del cumulus podría contribuir al mejoramiento de la maduración citoplasmática de los ovocitos en estas clases de COCs.

Si bien la mayor actividad glucolítica y producción de amoníaco de las clases A respecto a las clases B podrían atribuirse al mayor número de células que forman el cumulus, no se ha observado diferencia en su número entre las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, indicando alguna influencia de las características del cumulus en estas clases. Las

diferencias en el tipo de cumulus entre las clases  $A_1$  y  $A_2$  no sólo serían morfológicas sino también funcionales, como lo evidencian la mejor maduración citoplasmática y mayores actividad glucolítica y catabolismo de aminoácidos de los COCs pertenecientes a la clase  $A_1$  al ser cultivados en presencia de gonadotrofinas. La estimulación hormonal podría generar una mayor provisión de energía y/o de diversos metabolitos intermedios en el COC durante la maduración *in vitro* de los ovocitos, que serían necesarias para la adecuada maduración citoplasmática de los gametos, especialmente en la adquisición de la capacidad de formar pronúcleos.

El consumo de glucosa, la producción de lactato y la producción de amoníaco registrados en los COCs clase  $A_1$  madurados con gonadotrofinas resultaron 2,7, 5,2 y 1,9 veces respecto a los valores alcanzados por los COCs madurados sin estimulación hormonal. Sin embargo, el número de células del cumulus determinado luego de la maduración en presencia de hormonas fue aproximadamente 1,6 veces respecto al de los COCs madurados en ausencia de las hormonas en la clase  $A_1$ . Esto sugiere que el mayor número de células del cumulus puede explicar sólo en parte la mayor actividad metabólica al estimular los COCs con FSH y LH, mientras que el incremento superior en los parámetros metabólicos considerados respecto al aumento en el número de células indicaría que las mismas intensificaron su metabolismo en respuesta a las hormonas.

Los estudios de correlación realizados indican que el contenido de proteínas del COC inmaduro dependería principalmente del número de células que forman el cumulus y que las gonadotrofinas en el medio de maduración estimularían en igual medida la síntesis de proteínas en los COCs clases  $A_1$  y  $A_2$ , sugiriendo que la actividad de síntesis proteica dependería principalmente del número de células del cumulus, pero no del tipo de cumulus que rodea al ovocito en estas clases. La estimulación de la síntesis de proteínas por acción de las gonadotrofinas observada en las clases A no parecería ser necesaria para el progreso de la meiosis hasta el estadio

de metafase II, como queda demostrado por la similar capacidad de madurar nuclearmente de las clases B en las que no se manifiesta este efecto de las hormonas. En cambio, la maduración citoplasmática podría estar relacionada con la estimulación de la síntesis de proteínas por la FSH y la LH, como lo sugiere el incremento de ambos parámetros en las clases A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> en presencia de hormonas.

Los resultados presentados sugieren que las células del cumulus responderían al estímulo hormonal con un aumento en la actividad glucolítica, en la síntesis de proteínas y en el catabolismo de aminoácidos, estando la intensidad de la respuesta de la glucólisis y la producción de amoníaco relacionada con el tipo de cumulus que rodea al ovocito. El medio de cultivo aporta los hidratos de carbono y los aminoácidos que serían captados y metabolizados por las células del cumulus para que el ovocito tenga acceso a los metabolitos derivados de ambos tipos de compuestos. La estimulación del cumulus por las gonadotropinas estaría impactando en la capacidad del COC de metabolizar los compuestos de origen exógeno disponibles en el medio de cultivo.

La maduración meiótica, el metabolismo de los lípidos endógenos y la producción de ROS en los ovocitos mostraron un comportamiento similar en todas las clases de COCs evaluadas; sin embargo, la maduración citoplasmática resultó superior en las clases A. Tales resultados podrían sugerir cierta independencia de la maduración citoplasmática respecto a estos aspectos del metabolismo. La similar disminución en el contenido de lípidos neutros y en la producción de ROS en los ovocitos pertenecientes a las clases A y B de COCs madurados en presencia o ausencia de gonadotropinas indicaría la falta de relación entre el metabolismo de los lípidos endógenos y el nivel de ROS con el tipo de cumulus, el número de células que rodea al gameto y la estimulación hormonal, sugiriendo que estos aspectos estarían regulados por factores propios del ovocito. Los resultados obtenidos plantean algún grado de independencia metabólica entre el gameto y las células del cumulus en

relación a estos aspectos metabólicos. El metabolismo de estos compuestos endógenos se produciría en el propio ovoplasma, por lo que no dependería del cumulus rodea al ovocito ni de la acción de las hormonas sobre las células del cumulus.

La estimulación hormonal de la síntesis de proteínas en las clases A debería estar acompañada por un aumento en el requerimiento energético de los COCs, especialmente en las células del cumulus. En forma simultánea, las gonadotrofinas incrementarían la actividad glucolítica principalmente en las células del cumulus en los COCs, generando un aumento en la producción de ATP para satisfacer la mayor demanda energética en esta situación metabólica.

La mayor producción de lactato a la esperada en base al consumo de glucosa registrado al ser madurados los COCs clase A<sub>1</sub> en presencia de gonadotrofinas sugiere que la estimulación hormonal modularía además la derivación de otros sustratos hacia este metabolito. A su vez, la mayor producción de amoníaco de la clase A<sub>1</sub> en presencia de hormonas indicaría un mayor catabolismo de aminoácidos en estos complejos. La metabolización de diferentes aminoácidos hasta lactato podría ser estimulada por acción de las hormonas en las células del cumulus en la clase A<sub>1</sub>.

Las mayores actividades de la vía glucolítica y del metabolismo de aminoácidos en los COCs pertenecientes a las clases A y el aumento de las mismas por acción de las gonadotrofinas no se asociaron a un cambio en el consumo de lípidos endógenos o de la producción de ROS de los ovocitos. Esto indicaría que la mayor obtención de energía y/o diversos intermediarios metabólicos debido a la degradación de azúcares o aminoácidos del medio de cultivo por parte de las células del cumulus no influiría en la utilización de lípidos endógenos o en la producción de ROS por los ovocitos.

Los resultados de las experiencias desarrolladas indican que la glucólisis, la síntesis de proteínas y el catabolismo de los aminoácidos dependerían de las características del cumulus y serían regulados por las gonadotrofinas, mientras que la variación en el contenido de lípidos neutros y la producción de ROS endógenas en el ovocito serían independientes de estos aspectos, estando modulados por factores propios del gameto. Es generalmente aceptado que los COCs se comportan como un sincitio morfológico y funcional con cooperación metabólica. Sin embargo, se pudo apreciar que el metabolismo de los diferentes compuestos se desarrolla en las células del cumulus o en el ovocito, sugiriendo la posibilidad de una compartimentalización funcional del COC vinculada con los distintos aspectos del metabolismo.

En conclusión, el mayor tamaño del cumulus que rodea al ovocito en las clases A demostró estar relacionado con una mejor maduración citoplasmática y con una mayor intensidad en la actividad glucolítica, síntesis de proteínas y catabolismo de aminoácidos por los COCs durante la maduración *in vitro*. Además, las características del cumulus de estas clases le conferirían a los COCs la capacidad de responder al estímulo hormonal con un incremento en la vía glucolítica y en la degradación de aminoácidos. Si bien se hubiera esperado que tales observaciones se debieran al mayor número de células del cumulus en los COCs pertenecientes a las clases A, la glucólisis y el catabolismo de aminoácidos fueron más intensos en la clase A<sub>1</sub>, cuyo cumulus está formado por igual número de células que el de los COCs pertenecientes a la clase A<sub>2</sub>. Por lo tanto, la diferencia morfológica observable bajo lupa estereoscópica en los COCs inmaduros se correspondería con propiedades del cumulus relacionadas a una mayor capacidad metabólica, la cual sería necesaria para una adecuada maduración citoplasmática que permitiría al ovocito adquirir la habilidad de formar pronúcleos.

La disminución en el contenido de lípidos neutros y la disminución en el nivel de ROS endógenas de los ovocitos no parecerían estar relacionadas con las

características del cumulus ni con la estimulación hormonal de los COCs. Por lo tanto, la diferencia en la capacidad de madurar citoplasmáticamente entre las clases de COCs no podría atribuirse a variaciones en el metabolismo de estos compuestos.

## **Referencias bibliográficas**

1. Abeydeera L (2001) In vitro fertilization and embryo development in pigs. *Reprod Suppl* 58:159-173.
2. Abeydeera L (2002) In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology* 57:257-273.
3. Abeydeera L, Day B (1997) In vitro penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology* 48: 537-544.
4. Abeydeera L, Wang W, Prather R, Day B (2001) Effect of incubation temperature on in vitro maturation of porcine oocytes: nuclear maturation, fertilisation and developmental competence. *Zygote* 9: 331-337.
5. Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN (1999) Glutathione content and embryo development after in vitro fertilisation of pig oocytes matured in the presence of a thiol compound and various concentrations of cysteine. *Zygote* 7:203-10.
6. Adashi E Y, Resnik C E, D'Ercole A J, Svoboda M E, Van Wyk J J (1985) Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev* 6:400-420.
7. Aitken RJ, Peterson M, Fisher H, Buckingham D, van Duin M (1995) Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Science* 198:2017-2025.
8. Akaki Y, Yoshioka K, Noguchi M, Hoshi H, Funahashi H (2009) Successful piglet production in a chemically defined system for in-vitro production of porcine embryos: dibutyryl cyclic amp and epidermal growth factor-family peptides support in-vitro maturation of oocytes in the absence of gonadotropins. *J Reprod Dev* 55:446-53.
9. Algriany O, Bevers M, Schoevers E, Colenbrander B, Dieleman S (2004) Follicle size-dependent effects of sow follicular fluid on in vitro cumulus expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow cumulus oocytes complexes. *Theriogenology* 62:1483-1497.

10. Allworth A, Albertini D (1992) Cytoskeletal reorganization in bovine cumulus oocyte complexes is maturation associated. *Biol Reprod (Suppl 1, Abst)* 46:139.
11. Allworth A, Albertini D (1993) Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Dev Biol* 158:101-112.
12. Anderson DM (1969) In vitro inhibition of glycolysis in blood and its effect on the haematocrit. *J Comp Pathol* 79:525-35.
13. Anderson LL (2002) Cerdos. En "Reproducción e inseminación artificial en animales". Eds. Hafez B y Hafez ESE. McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. V. 7ª edición. México, D. F. p. 188-198.
14. Assey R, Hyttel P, Greve T, Purwantara B (1994) Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol Reprod Dev* 37:335-344.
15. Baker T (1986) Gametogenesis. In "Comparative primate biology: reproduction and development". Ed. Alan R. Liss Inc. New York. p. 195-213.
16. Ball G, Wieben E, Byers A (1985) DNA, RNA, and protein synthesis by porcine oocyte-cumulus complexes during expansion. *Biol Reprod* 33:739-744.
17. Barham D, Trinder P (1972) An Improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* 97:142-145.
18. Beattie D (2002) Bioenergetics and oxidative metabolism. In "Textbook of biochemistry". Ed. Devlin T. Fifth edition. Wiley-Liss, New York. p. 537-596.
19. Berg J M, Tymoczko J L, Stryer L (2008a) Glicolisis y gluconeogénesis. En "Bioquímica". Reverté, Barcelona. p. 433-474.
20. Berg J M, Tymoczko J L, Stryer L (2008b) Metabolismo de los ácidos grasos. En "Bioquímica". Reverté, Barcelona. p. 617-648.
21. Bielańska-Osuchowska Z (2006) Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reprod Biol* 6:161-93.

22. Biggers J, Whittingham D, Donahue R (1967) The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc Nat Acad Sci USA* 58:560-567.
23. Billig H, Hedin L, Magnusson C (1983) Gonadotrophins stimulate lactate production by rat cumulus and granulosa cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* 103:562-566.
24. Bilodeau-Goeseels S, Sasseville M, Guillemette C, Richard FJ (2007) Effects of adenosine monophosphate-activated kinase activators on bovine oocyte nuclear maturation in vitro. *Mol Reprod Dev* 74:1021-34.
25. Blondin P, Coenen K, Sirard MA (1997) The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl* 18:454-60.
26. Boland N, Humpherson P, Leese H, Gosden R (1993) Pattern of lactate production and steroidogenesis during growth and maturation of mouse ovarian follicles in vitro. *Biol Reprod* 48:798-806.
27. Brackett B, Bousquet D, Boice M, Donawick W, Evans J, Dressel M (1982) Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod* 27:147-158.
28. Brackett B, Zuelke K (1993) Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 39:43-64.
29. Brevini TA, Cillo F, Antonini S, Gandolfi F (2007) Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. *Anim Reprod Sci* 98:23-38.
30. Brown EJ, Schreiber SL (1996) A signaling pathway to translational control. *Cell* 86:517-20.
31. Buccione R, Schoeder A, Eppig J (1990) Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod* 43:543-547.
32. Byskov AG, Andersen CY, Leonardsen L (2002) Role of meiosis activating sterols, MAS, in induced oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol* 187:189-96.

33. Cadenas E, Davies KJ (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29:222-30.
34. Callejas SS (2001) Fisiología del ciclo estral bovino. En "Biotecnología de la reproducción". Ed. Palma G. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. p. 37-60.
35. Cetica P, Dalvit G, Beconi M (1999a) Study of evaluation criteria used for in vitro bovine oocyte selection and maturation. *Biocell* 23:125-133.
36. Cetica P, Pintos L, Dalvit G, Beconi M (1999b) Effect of lactate dehydrogenase activity and isoenzyme localization in bovine oocytes and utilization of oxidative substrates on in vitro maturation. *Theriogenology* 51:541-550.
37. Cetica P, Pintos L, Dalvit G, Beconi M (2002) Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction* 124:675-81.
38. Cetica P, Pintos L, Dalvit G, Beconi M (2003) Involvement of enzymes of amino acid metabolism and tricarboxylic acid cycle in bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction* 126:753-763.
39. Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT (2001) Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life* 51:57-64.
40. Chen L, Wert S, Hendrix E, Ruddell P, Cannon M, Larsen W (1990) Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Mol Reprod Dev* 26:236-247.
41. Choi WJ, Banerjee J, Falcone T, Bena J, Agarwal A, Sharma RK (2007) Oxidative stress and tumor necrosis factor-alpha-induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure. *Fertil Steril* 88:1220-31.
42. Choi Y, Love L, Varner D, Hinrichs K (2004). Factors affecting developmental competence of equine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction* 127:187-194.

43. Chun S Y, Billig H, Tilly J L, Furuta I, Tsafirri A, Hsueh A J W (1994) Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 135:1845-1853.
44. Chun S Y, Eisenhauer K M, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh A J W (1996) Hormonal regulation of apoptosis en early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 137:1447-1456.
45. Cimasoni, G (1972) The inhibition of enolase by fluoride in vitro. *Caries Res* 6:93-102.
46. Clarenburg R (1992a) Enzymes. In "Physiological chemistry of domestic animals". Ed. Reinhardt R. Mosby Year Book Inc, Saint Louis. p. 63-78.
47. Clarenburg R (1992b) Carbohydrate metabolism. In "Physiological chemistry of domestic animals". Ed. Reinhardt R. Mosby Year Book Inc, Saint Louis. p. 239-291.
48. Clarenburg R (1992c) Lipid metabolism. In "Physiological chemistry of domestic animals". Ed. Reinhardt R. Mosby Year Book Inc, Saint Louis. p. 292-333.
49. Claver J, Sanchez A, Sicardi A, Lawzewitsch I (1987) Aparato reproductor femenino comparado. En "Lecciones de histología veterinaria". Editorial Hemisferio Sur S.A. 3º edición. Buenos Aires, Argentina. p. 1-77.
50. Colgan DF, Murthy KG, Prives C, Manley JL (1996) Cell-cycle related regulation of poly(A) polymerase by phosphorylation. *Nature* 384:282-5.
51. Coomes M (2002) Amino acid metabolism. In "Textbook of biochemistry". Ed. Devlin T. Fifth edition. Wiley-Liss, New York. p. 779-824.
52. Cox AG, Winterbourn CC, Hampton MB (2009) Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem J* Dec 425:313-25.
53. Cran DG (1985) Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. *J Reprod Fertil* 74:237-45.

54. Cui MS, Fan YP, Wu Y, Hao ZD, Liu S, Chen XJ, Zeng SM (2009) Porcine cumulus cell influences ooplasmic mitochondria-lipid distributions, GSH-ATP contents and calcium release pattern after electro-activation. *Theriogenology* 71:412-21.
55. Curtis H, Barnes N (2000a) La continuidad de la vida I: reproducción. En "Biología". Editorial Médica Paramericana S. A. 6º edición. Buenos Aires, Argentina. p. 1314-1339.
56. Curtis H, Barnes N (2000b) Moléculas orgánicas. En "Biología". Editorial Médica Paramericana S. A. 6º edición. Buenos Aires, Argentina. p. 63-98.
57. Da Fonseca-Wollheim F (1973a) The significance of the hydrogen ion concentration and the addition of ADP in the determination of ammonia with glutamate dehydrogenase. An improved enzymic determination of ammonia, I. *Z Klin Chem Klin Biochem* 11:421-425.
58. Da Fonseca-Wollheim F (1973b) Direct determination of plasma ammonia without deproteinization. An improved enzymic determination of ammonia, II. *Z Klin Chem Klin Biochem* 11:426-431.
59. Dalvit G (2003) Metabolismo del oxígeno y rol de los antioxidantes naturales en la fertilización in vitro y desarrollo embrionario temprano. Tesis Doctoral, Biblioteca de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, p. 127.
60. Dalvit G, Cetica P, Beconi M (1998) Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine in vitro fertilization. *Theriogenology* 49:619-627.
61. Dalvit G, Cetica P, Pintos L, Beconi M (2005a) Reactive oxygen species in bovine embryo in vitro production. *Biocell* 29:209-12.
62. Dalvit G, Llanes S, Descalzo A, Insani M, Beconi M, Cetica P (2005b) Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte in vitro maturation. *Reprod Domest Anim* 40, 93–97.
63. Dantzer V, Björkman N (1994) Placentación. En "Histología veterinaria". Ed. Dellmann H. Editorial Acribia S. A. 2º edición. Zaragoza, España. p. 291-306.

64. Davidson AP, Stabenfeldt GH (1999) Control del desarrollo gonadal y de los gametos. En "Fisiología veterinaria". Ed. Cunningham. McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. V. 2º edición. México, D. F. p. 499-509.
65. de Loos F, Kastrop P, van Maurik P, van Beneden T, Kruip T (1991) Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Mol Reprod Dev* 28:255-259.
66. de Loos F, Van Vliet C, Van Maurik P, Kruip T (1989) Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res* 24:197-204.
67. de Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini SR, Thompson JG (2002) Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* 57:1443-51.
68. Dekel, N (1999) Meiotic cell cycle, oocytes. In "Encyclopedia of Reproduction". Eds. Knobil E. and Neill J. Academic Press, San Diego, USA, Vol 3, p. 168-176.
69. Donahue R, Stern S (1968) Follicular cell support of oocyte maturation: production of pyruvate in vitro. *J Reprod Fertil* 17:395-398.
70. Downs S (1995) The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic control in the isolated mouse oocytes. *Dev Biol* 167:502-512.
71. Downs S, Houghton F, Humpherson P, Leese H (1997) Substrate utilization and maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes: evidence that pyruvate oxidation does not mediate meiotic induction. *J Reprod Fertil* 110:1-10.
72. Downs S, Humpherson P, Leese H (1998) Meiotic induction in cumulus cell-enclosed mouse oocytes: involvement of the pentose phosphate pathway. *Biol Reprod* 58:1084-1094.
73. Downs S, Humpherson P, Martin K, Leese H (1996) Glucose utilization during gonadotropin-induced meiotic maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 44:121-131.

74. Downs S, Mastropolo A (1994) The participation of energy substrates in the control of meiotic maturation in murine oocytes. *Dev Biol* 162:154-68.
75. Downs S, Utecht A (1999) Metabolism of radiolabeled glucose by mouse oocytes and oocyte-cumulus cell complexes. *Biol Reprod* 60:1446-1452.
76. Eppig J (1996) Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 8:485-489.
77. Eppig J, Koide S (1978) Effects of progesterone and oestradiol-17beta on the spontaneous meiotic maturation of mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 53:99-101.
78. Eroglu A (1993) Experimental studies on in vitro maturation of porcine oocytes. Effects of medium, energy source and protein source on in vitro maturation rate. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 106:153-157.
79. Eyestone W, First N (1989) Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fertil* 85:715-720.
80. Fagbohun CF, Downs SM (1992) Requirement for glucose in ligand-stimulated meiotic maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 96:681-97.
81. Fan HY, Sun QY (2004) Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod* 70:535-47.
82. Fatehi AN, Roelen BA, Colenbrander B, Schoevers EJ, Gadella BM, Beverst MM, van den Hurk R (2005) Presence of cumulus cells during in vitro fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. *Zygote* 13:177-85.
83. Feig SA, Shohet SB, Nathan DG (1971) Energy metabolism in human erythrocytes. I. Effects of sodium fluoride. *J Clin Invest* 50:1731-7.
84. Ferguson EM, Leese HJ (1999) Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J Reprod Fertil* 116:373-8.

85. Ferguson EM, Leese HJ (2006) A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol Reprod Dev* 73:1195-201.
86. Fujihira T, Kinoshita M, Sasaki M, Ohnishi M, Ishikawa H, Ohsumi S, Fukui Y (2004) Comparative studies on lipid analysis and ultrastructure in porcine and southern minke whale (*Balaenoptera bonaerensis*) oocytes. *J Reprod Dev* 50:525-32.
87. Funahashi H, Cantley TC, Day BN (1997) Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. *Biol Reprod* 57:49-53.
88. Funahashi H, Koike T, Sakai R (2008) Effect of glucose and pyruvate on nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes in a chemically defined medium. *Theriogenology* 15:1041-7.
89. Fuster PC (1995) Fisiología de la gestación. En "Fisiología Veterinaria". Ed. García Sacristán A. McGraw-Hill Interamericana de España. Madrid. p. 861-874.
90. Gandhi A, Lane M, Gardner D, Krisher R (2001) Substrate utilization in porcine embryos cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential culture media. *Mol Reprod Dev* 58:269-275.
91. Garcia-Garcia R, Ward F, Fair S, O'Meara C, Wade M, Duffy P, Lonergan P (2007) Development and quality of sheep embryos cultured in commercial G1.3/G2.3 sequential media. *Anim Reprod Sci* 98:233-40.
92. 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.
93. Gardner D, Leese H (1990) Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *J Reprod Fertil* 88:361-368.

94. Gavin AC, Schorderet-Slatkine S (1997) Ribosomal S6 kinase p90rsk and mRNA cap-binding protein eIF4E phosphorylations correlate with MAP kinase activation during meiotic reinitiation of mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 46:383-91.
95. Gebauer F, Richter JD (1996) Mouse cytoplasmic polyadenylation element binding protein: an evolutionarily conserved protein that interacts with the cytoplasmic polyadenylation elements of c-mos mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14602-7.
96. Gebauer F, Xu W, Cooper GM, Richter JD (1994) Translational control by cytoplasmic polyadenylation of c-mos mRNA is necessary for oocyte maturation in the mouse. *EMBO J* 13:5712-20.
97. Geneser F (1990) Aparato genital. En "Histología". Editorial Médica Panamericana S. A. Buenos Aires, Argentina. p. 538-592.
98. Genicot G, Leroy JL, Soom AV, Donnay I (2005) The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. *Theriogenology* 63:1181-94.
99. Gigli I, Russo A, Agüero A (2006) Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *InVet* 8:183-204.
100. Gilula NB, Epstein ML, Beers WH (1978) Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J Cell Biol* 78:58-75.
101. Gonzalez-Flecha B, Reides C, Cutrin JC, Llesuy SF, Boveris A (1993) Oxidative stress produced by suprahepatic occlusion and reperfusion. *Hepatology* 18:881-9.
102. Gosden R, Hunter R, Telfer E, Torrance C, Brown N (1988) Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *J Reprod Fertil* 82:813-825.
103. Gougeon A, Testart J (1986) Germinal vesicle breakdown in oocytes of human atretic follicles during the menstrual cycle. *J Reprod Fertil* 78:389-401.
104. Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD (1985) Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 100:965-73.

105. Grupen CG, Nagashima H, Nottle MB (1995) Cysteamine enhances in vitro development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Biol Reprod* 53:173-8.
106. Gruszka J, Pawlak A, Kruk J (2008) Tocochromanols, plastoquinol, and other biological prenyllipids as singlet oxygen quenchers-determination of singlet oxygen quenching rate constants and oxidation products. *Free Radic Biol Med* 45:920-8.
107. Guha-Chowdhury N, Clark AG, Sissons CH (1997) Inhibition of purified enolases from oral bacteria by fluoride. *Oral Microbiol Immunol* 12:91-7.
108. Gull I, Geva E, Lerner Geva L, Lessing J, Wolman I, Arrit A (1999) Anaerobic glycolysis. The metabolism of the preovulatory human oocyte. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 85:225-228.
109. Gutnisky C, Dalvit GC, Pintos LN, Thompson JG, Beconi MT, Cetica PD (2007) Influence of hyaluronic acid synthesis and cumulus mucification on bovine oocyte in vitro maturation, fertilisation and embryo development. *Reprod Fertil Dev* 19:488-97.
110. Gutnisky C, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT, Cetica PD (2008) Control de la vía glucolítica durante la maduración de COCs bovinos in vitro. *InVet* 10:176. (Resumen).
111. Hafez ESE, Hafez B (2002a) Fecundación y segmentación. En "Reproducción e inseminación artificial en animales". Eds. Hafez B y Hafez ESE. McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. V. 7º edición. México, D. F. p. 113-128.
112. Hafez ESE, Hafez B (2002b) Foliculogénesis, maduración del óvulo y ovulación. En "Reproducción e inseminación artificial en animales". Eds. Hafez B y Hafez ESE. McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. V. 7º edición. México, D. F. p. 70-83.
113. Hafez ESE, Hafez B (2002c) Ciclos reproductivos. En "Reproducción e inseminación artificial en animales". Eds. Hafez B y Hafez ESE. McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. V. 7º edición. México, D. F. p. 56-69.

114. Hafez ESE, Jainudeen MR, Rosnina Y (2002) Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. En "Reproducción e inseminación artificial en animales". Eds. Hafez B y Hafez ESE. McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. V. 7<sup>o</sup> edición. México, D. F. p. 33-55.
115. Hammond J M, Mondschein J S, Samaras S Em Canning S F (1991) The ovarian insuline-like growth factors, a local amplification mechanism for steroidogenesis and hormone action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40:411-416.
116. Hampl A, Eppig JJ (1995) Translational regulation of the gradual increase in histone H1 kinase activity in maturing mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 40:9-15.
117. Hancock J, Hovell G (1959). The collection of boar semen. *The Veterinary record* 71: 664-665.
118. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ (2001) Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 29:345-50.
119. Hardarson T, Lundin K, Hamberger L (2000) The position of the metaphase II spindle cannot be predicted by the location of the first polar body in the human oocyte. *Human reproduction* 15:1372-1376.
120. Harlow C, Winston R, Margara R, Hillier S (1987) Gonadotrophic control of human granulosa cell glycolysis. *Hum Reprod* 2:649-653.
121. Harris R A (2002) Carbohydrate metabolism I: Major metabolic pathways and their control. In "Textbook of Biochemistry". Ed. Devlin T M. Fifth edition. Wiley-Liss, New York. p. 597-664.
122. Hashimoto S, Minami N, Yamada M, 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.
123. Hatey F, Langlois I, Mulsant P, Bonnet A, Benne F, Gasser F (1992) Gonadotropins induce accumulation of insulin-like growth factor I mRNA in pig granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 86:205-211.

124. Herrick J R, Brad A M, Krisher R L (2006) Chemical manipulation of glucose metabolism in porcine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation in vitro. *Reproduction* 131:289-298.
125. Hershey JW (1991) Translational control in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 60:717-55.
126. Hinrichs K, Williams K (1997) Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. *Biol Reprod* 57:377-84.
127. Ho R, Shi QH (1982) Forskolin as a novel lipolytic agent. *Biochem Biophys Res Commun* 107:157-64.
128. Holm C (2003) Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans* 31:1120-4.
129. Homa S, McGaughey R, Racowsky C (1988) Isolated subpopulations of mass-harvested pig oocytes and their characterization by size, incidence of atresia and competence to mature in culture. *J Reprod Fertil* 82:81-86.
130. Homa S, Racowsky C, McGaughey R (1986) Lipid analysis of immature pig oocytes. *J Reprod Fertil* 77:425-34.
131. Hong J, Lee E (2007) Intrafollicular amino acid concentration and the effect of amino acids in a defined maturation medium on porcine oocyte maturation, fertilization, and preimplantation development. *Theriogenology* 68:728-35.
132. Hong JY, Yong HY, Lee BC, Hwang WS, Lim JM, Lee ES (2004) Effects of amino acids on maturation, fertilization and embryo development of pig follicular oocytes in two IVM media. *Theriogenology* 62:1473-82.
133. Hoppe R, Bavister B (1984) Evaluation of the fluorescein diacetate (FDA) vital dye viability test with hamster and bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 6:323-325.

134. Hsu C J, Hammond J M (1987) Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor-I production by porcine granulosa cells in vitro. *Endocrinology* 120:198-207.
135. Hume D, Weidemann M (1979) Role and regulation of glucose metabolism in proliferating cells. *J Natl Cancer Inst* 62:3-8.
136. Hunter A, Moor R (1987) Stage dependent effects of inhibiting RNA and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. *J Dairy Science* 70:1646-1651.
137. Hunter MG (2000) Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Rev Reprod* 5:122-30.
138. Ikeda K, Takahashi Y (2003). Comparison of maturational and developmental parameters of oocytes recovered from prepubertal and adult pigs. *Reprod Fertil Dev* 15:215-221.
139. Isobe N, Fujihara M, Terada T (1996) Cumulus cells suppress meiotic progression in pig oocytes cultured in vitro. *Theriogenology* 45:1479-1489.
140. Jainudeen MR, Hafez ESE (2002) Gestación, fisiología prenatal y parto. En "Reproducción e inseminación artificial en animales". Eds. Hafez B y Hafez ESE. McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. V. 7<sup>o</sup> edición. México, D. F. p. 144-160.
141. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC (2000) Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 62:143-172.
142. Ka HH, Sawai K, Wang WH, Im KS, Niwa K ( 1997) Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated in vitro. *Biol Reprod* 57:1478-83.
143. Kamata H, Hirata H (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 11:1-14.

144. Kamp G, Schmidt H, Stypa H, Feiden S, Mahling C, Wegener G (2007) Regulatory properties of 6-phosphofructokinase and control of glycolysis in boar spermatozoa. *Reproduction* 133:29-40.
145. Kastrop P, Bevers M, Destree O, Kruip T (1990) Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation in vitro. *J Reprod Fertil* 90:305-310.
146. Kastrop P, Bevers M, Destree O, Kruip T (1991a) Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovine oocyte maturing in vivo. *Mol Reprod Dev* 29:271-275.
147. Kastrop P, Hulshof S, Bevers M, Destreé O, Kruip T (1991b) The effects of alpha-amantin and cycloheximide on nuclear progression, protein synthesis, and phosphorylation during bovine oocyte maturation in vitro. *Mol Reprod Dev* 28:249-254.
148. Kaufmann M, Bartholmes P (1992) Purification, characterization and inhibition by fluoride of enolase from *Streptococcus mutans* DSM 320523. *Caries Res* 26:110-6.
149. Kaufmann W, Saelzer V (1976) Metabolismo de las grasas. En "Fisiología digestiva aplicada del ganado vacuno". Editorial Acribia. España, Zaragoza. p 49-55.
150. Khoo j, Steinberg D (1981) Hormone-sensitive lipase from Chicken adipose tissue including the separation and purification of monoglyceride lipase. En "Methods in Enzymology". Ed. Lowenstein J. Academic Press, New York – London – Toronto – Sydney – San Francisco. 71:627-646.
151. Khurana N, Niemann H (2000) Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology* 54:741-756.
152. Kikuchi K (2004) Developmental competence of porcine blastocysts produced in vitro. *J Reprod Dev* 50:21-8.
153. Kikuchi K, Ekwall H, Tienthai P, Kawai Y, Noguchi J, Kaneko H, Rodriguez-Martinez H (2002a) Morphological features of lipid droplet transition during porcine

oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst in vivo and in vitro. *Zygote* 10:355-66.

154. Kikuchi K, Kashiwazaki N, Nagai T, Nakai M, Somfai T, Noguchi J, Kaneko H (2008) Selected aspects of advanced porcine reproductive technology. *Reprod Domest Anim* 43:401-6.
155. Kikuchi K, Kashiwazaki N, Noguchi J, Shimada A, Takahashi R, Hirabayashi M, Shino M, Ueda M, Kaneko H (1999) Developmental competence, after transfer to recipients, of porcine oocytes matured, fertilized and cultured in vitro. *Biol Reprod* 60:336-340.
156. Kikuchi K, Onishi A, Kashiwazaki N, Iwamoto M, Noguchi J, Kaneko H, Akita T, Nagai T (2002b) Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified in vitro system. *Biol Reprod* 66:1033-41.
157. Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui Y (2001) Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction* 122:131-8.
158. Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T (2004) Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 62:1186-97.
159. Kito S, Bavister BD (1997) Gonadotropins, serum, and amino acids alter nuclear maturation, cumulus expansion, and oocyte morphology in hamster cumulus-oocyte complexes in vitro. *Biol Reprod* 56:1281-9. Erratum in: *Biol Reprod* (1997) 57:214.
160. Krisher R (2004) The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* 82 E-Suppl:E14-23.
161. Krisher R, Bavister B (1998) Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 49:103-114.

162. Krisher RL, Bavister BD (1999) Enhanced glycolysis after maturation of bovine oocytes in vitro is associated with increased developmental competence. *Mol Reprod Dev* 53:19-26.
163. Krisher RL, Brad AM, Herrick JR, Sparman ML, Swain JE (2007) A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during in vitro maturation. *Anim Reprod Sci* 98:72-96.
164. Kristen E, Gerez C, Kirsten R (1963) Eine enzymatische mikrobestimmung des ammoniaks, geeignet für extrakte tierischer gewebe und flüssigkeiten. *Biochem Z* 337:312-319.
165. Kubelka M, Rimkevičová Z, Guerrier P, Motlík J (1995) Inhibition of protein synthesis affects histone H1 kinase, but not chromosome condensation activity, during the first meiotic division of pig oocytes. *Mol Reprod Dev* 41:63-9.
166. Labarca C, Paigen K (1980) A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102:344-352.
167. Lane L, Maybach JM, Gardner DK (2002) Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. *Hum Reprod* 17:2686-2693.
168. Larsen W, Wert S, Brunner G (1986) A dramatic loss of cumulus cells gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Dev Biol* 113:517-521.
169. Laurincik J, Krosiak P, Hyttel P, Pivko J, Sirotkin A (1992) Bovine cumulus expansion and corona-oocyte disconnection during culture in vitro. *Reprod Nutr Dev* 32:151-161.
170. Le Bel C, Ischiropoulos H, 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.
171. Leese H, Barton A (1984) Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantational embryos. *J Reprod Fertil* 72:9-13.

172. Lefèvre B, Gougeon A, Peronny H, Testart J (1988) Effect of cumulus cell mass and follicle quality on in-vitro maturation of cynomolgus monkey oocytes. *Hum Reprod* 3:891-3.
173. Lefèvre B, Gougeon A, Testart J (1987) In-vitro oocyte maturation: some questions concerning the initiation and prevention of this process in humans. *Hum Reprod* 2:495-497.
174. Leroy JL, Genicot G, Donnay I, Van Soom A (2005) Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach. *Reprod Domest Anim* 40:76-8.
175. Lévesque J, Sirard M (1995) Effects of different kinases and phosphatases on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 42:114-121.
176. Liang CG, Su YQ, Fan HY, Schatten H, Sun QY (2007) Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol* 21:2037-55.
177. Lim JM, Lee BC, Lee ES, Chung HM, Ko JJ, Park SE, Cha KY, Hwang WS (1999) In vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes cultured in a chemically defined, protein-free medium: effects of carbohydrates and amino acids. *Reprod Fertil Dev* 11:127-32.
178. López SR (1995) Reproducción en porcinos. En "Fisiología Veterinaria". Ed. García Sacristán A. McGraw-Hill Interamericana de España. Madrid. p. 951-968.
179. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 120:227-37.
180. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
181. Luttmmer S, Longo F (1986) Examination of living and fixed gametes and early embryos stained with supravital fluorochromes. *Gamete research* 13:267-283.

182. Luvoni G, Keskinetepe L, Brackett B (1996) Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. *Mol Reprod Dev* 43:437-443.
183. Machaty Z, Day B, Prather R (1998) Development of early porcine embryos in vitro and in vivo. *Biol Reprod* 59:451-455.
184. Maedomari N, Kikuchi K, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Ohnuma K, Nakai M, Shino M, Nagai T, Kashiwazaki N (2007) Cytoplasmic glutathione regulated by cumulus cells during porcine oocyte maturation affects fertilization and embryonic development in vitro. *Theriogenology* 67:983-93.
185. Mandel L (1986) Energy metabolism of cellular activation, growth, and transformation. *Curr Top Memb Trans* 27:261-291.
186. Marchal R, Feugang JM, Perreau C, Venturi E, Terqui M, Mermillod P (2001) Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology* 56:17-29.
187. Marchal R, Vigneron C, Perreau C, Bali-Papp A, Mermillod P (2002) Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology* 57:1523-1532.
188. Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Vazquez JL (2005) An update on Reproductive Technologies with Potential Short-Term Application in Pig Production. *Reprod Dom Anim* 40:300-309.
189. Matés JM (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153:83-104.
190. Mattioli M (1994) Transduction mechanisms for gonadotrophin-induced oocyte maturation in mammals. *Zygote* 2:347-9.
191. Mattioli M, Bacci M, Galeati G, Seren E (1991) Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes in vitro. *Theriogenology* 36:95-105.

192. Mattioli M, Barboni B (2000) Signal transduction mechanism for LH in the cumulus-oocyte complex. *Mol Cell Endocrinol* 161:19-23.
193. Mattioli M, Gioia L, Barboni B (1998) Calcium elevation in sheep cumulus-oocyte complexes after luteinising hormone stimulation. *Mol Reprod Dev* 50:361-9.
194. Mayes P A (1994) Oxidación biológica. En "Bioquímica de Harper". Ed. Murray R, Granner D, Mayes P, Rodwell V. 13<sup>o</sup> edición. Editorial El Manual Moderno, S. A. De C. V., México, D. F. p. 135-142.
195. Mayes P A, Bender D (2004) La vía del fosfato de pentosas y otras vías del metabolismo de las hexosas. En "Harper. Bioquímica Ilustrada". Ed. Murray R. 16<sup>o</sup> edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V., México, D. F. p. 185-196.
196. Mayes P A, Botham K M (2004a) Lípidos de importancia fisiológica. En "Harper. Bioquímica Ilustrada". Ed. Murray R. 16<sup>o</sup> edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V.. México, D.F. p. 125-136.
197. Mayes P A, Botham K M (2004b) Metabolismo de acilgliceroles y esfingolípidos. En "Harper. Bioquímica Ilustrada". Ed. Murray R. 16<sup>o</sup> edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V.. México, D.F. p. 225-232.
198. Mayes P A, Botham K M (2004c) Oxidación de los ácidos grasos: cetogénesis. En "Harper. Bioquímica Ilustrada". Ed. Murray R. 16<sup>o</sup> edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V.. México, D.F. p. 205-215.
199. Mazuecos AL (1995) Bases fisiológicas de la reproducción en la hembra. En "Fisiología Veterinaria". Ed. García Sacristán A. McGraw-Hill Interamericana de España. Madrid. p. 840-860.
200. McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS, Speake BK (2000) Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J Reprod Fertil* 118:163-70.
201. McGarry J (2002) Lipid metabolism I: utilization and storage of energy in lipid form. In "Textbook of biochemistry". Ed. Devlin T. Fifth edition. Wiley-Liss, New York. p. 693-726.

202. Mehlmann LM (2005) Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 130:791-9.
203. Men H, Agca Y, Riley LK, Critser JK (2006) Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology* 66:2008-16.
204. Milanov C, Sirard M (1994) Manipulation of chromosome condensation by protein synthesis inhibitors and cyclic AMP during maturation of bovine oocytes. *Theriogenology* 41:819-827.
205. Mirsky AE, Osawa S (1961) The interphase nucleus. In "The Cell". Eds. Brackett J and Mirsky AE. Academic Press, New York. p. 677-770.
206. Mito T, Yoshioka K, Nagano M, Suzuki C, Yamashita S, Hoshi H (2009) Transforming growth factor-alpha in a defined medium during in vitro maturation of porcine oocytes improves their developmental competence and intracellular ultrastructure. *Theriogenology* 72:841-50.
207. Miyano T (2003) Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. *Theriogenology* 59:61-72.
208. Moor RM, Crosby IM (1986) Protein requirements for germinal vesicle breakdown in ovine oocytes. *J Embryol Exp Morphol* 94:207-20.
209. Moor RM, Mattioli M, Ding J, Nagai T (1990) Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil Suppl* 40:197-210.
210. Morgan M, Faik P (1981) Carbohydrate metabolism in cultured animal cells. *Biosci Rep* 1:669-686.
211. Morley SJ (1994) Signal transduction mechanisms in the regulation of protein synthesis. *Mol Biol Rep* 19:221-31.
212. Morley SJ, Thomas G (1991) Intracellular messengers and the control of protein synthesis. *Pharmacol Ther* 50:291-319.

213. Motlik J, Crozet N, Fluka J (1984) Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J Reprod Fertil* 72:323-328.
214. Motlik J, Fulka J (1976) Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *J Exp Zool* 198:155-62.
215. Motlik J, Fulka J (1986) Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* 25:87-96.
216. Motlik J, Lie B, Shioya Y (1990) Two sensitivity levels of cattle oocytes to puromycin. *Biol Reprod* 43:994-998.
217. Murdoch W (1992) Comparative morphometry and steroidogenic function of antral ovine follicles destined for ovulation or atresia. *Domest Anim Endocrinol* 9:219-224.
218. Murray R, Keeley F (2004) La matriz extracelular. En "Harper. Bioquímica Ilustrada". Ed. Murray R. 16<sup>o</sup> edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V., México, D.F. p. 597-618.
219. Nagai T, Funahashi H, Yoshioka K, Kikuchi K (2006) Up date of in vitro production of porcine embryos. *Front Biosci* 11:2565-73.
220. Nelson D, Cox M (2005a) Enzymes. In "Lehninger. Principles of biochemistry". Eds Nelson D, Cox M. Forth edition. W. H. Freeman and Company, New York. p. 190-237.
221. Nelson D, Cox M (2005b) Amino acid oxidation and the production of urea. In "Lehninger. Principles of biochemistry". Eds Nelson D, Cox M. Forth edition. W. H. Freeman and Company, New York. p. 656-689.
222. Nelson D, Cox M (2005c) Glycolysis, gluconeogenesis, and the pentose phosphate pathway. In "Lehninger. Principles of biochemistry". Eds Nelson D, Cox M. Forth edition. W. H. Freeman and Company, New York. p. 521-559.
223. Nelson D, Cox M (2005d) Principles of metabolic regulation: glucose and glycogen. In "Lehninger. Principles of biochemistry". Eds Nelson D, Cox M. Forth edition. W. H. Freeman and Company, New York. p. 560-600.

224. Nelson D, Cox M (2005e) Biosynthesis of amino acids, nucleotides, and related molecules. In "Lehninger. Principles of biochemistry". Eds Nelson D, Cox M. Forth edition. W. H. Freeman and Company, New York. p. 833-880.
225. Nelson D, Cox M (2005f) Fatty acid catabolism. In "Lehninger. Principles of biochemistry". Eds Nelson D, Cox M. Forth edition. W. H. Freeman and Company, New York. p. 631-655.
226. Nelson D, Cox M (2005g) Principles of bioenergetics. In "Lehninger. Principles of biochemistry". Eds Nelson D, Cox M. Forth edition. W. H. Freeman and Company, New York. p. 489-520.
227. Nelson D, Cox M (2005h) Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. In "Lehninger. Principles of biochemistry". Eds Nelson D, Cox M. Forth edition. W. H. Freeman and Company, New York. p. 690-750.
228. Niemann H, Rath D (2001) Progress in reproductive biotechnology in swine. *Theriogenology* 56:1291-1304.
229. Niemann H, Rath D, Wrenzycki C (2003) Advances in biotechnology: new tools in future pig production for agriculture and biomedicine. *Reprod Domest Anim* 38:82-9.
230. Niimura S, Takano H, Onishi A, Hosoe M (2002) Changes in the amount of proteins, glycogen and lipids in porcine oocytes during in vitro meiotic maturation. *Anim Sci J* 73:327-32.
231. Noden DM, Lahunta A (1990a) Estadios iniciales del desarrollo en aves y mamíferos. En "Embriología de los animales domésticos". Editorial Acribia S. A. Zaragoza, España. p. 27-52.
232. Noden DM, Lahunta A (1990b) Derivados del mesodermo intermedio: órganos reproductores. En "Embriología de los animales domésticos". Editorial Acribia S. A. Zaragoza, España. p. 353-374.
233. Nussbaum DJ, Prather RS (1995) Differential effects of protein synthesis inhibitors on porcine oocyte activation. *Mol Reprod Dev* 41:70-5.

234. Oakberg E (1979) Follicular growth and atresia in mouse. *In vitro* 15:41-49.
235. Ocampo M, Ocampo L, Kanagawa H (1991) Timing of sequential changes in chromosome configurations during the 1st meiotic division of pig oocytes cultured in vitro. *Jpn J Vet Res* 38:127-137.
236. Ozawa M, Nagai T, Somfai T, Nakai M, Maedomari N, Miyazaki H, Kaneko H, Noguchi J, Kikuchi K (2010) Cumulus cell-enclosed oocytes acquire a capacity to synthesize GSH by FSH stimulation during in vitro maturation in pigs. *J Cell Physiol* 222:294-301.
237. Palma G, Brem G (2001) Biotecnología de la reproducción. En "Biotecnología de la reproducción". Ed. Palma G. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. p. 1-20.
238. Pereira R, Tuli R, Wallenhorst S, Holtz W (2000). The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A23187 on in vitro induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. *Theriogenology* 54: 185-192.
239. Pfeilschifter J, Eberhardt W, Huwiler A (2001) Nitric oxide and mechanisms of redox signalling: matrix and matrix-metabolizing enzymes as prime nitric oxide targets. *Eur J Pharmacol* 429:279-86.
240. Priedkalns J (1994) Sistema reproductor femenino. En "Histología veterinaria". Ed. Dellmann H. Editorial Acribia S. A. 2º edición. Zaragoza, España. p. 267-290.
241. Qian Y, Shi W, Ding J, Sha J, Fan B (2003) Predictive value of the area of expanded cumulus mass on development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Dev* 49:167-174.
242. Rambhatla L, Latham KE (1995) Strain-specific progression of alpha-amanitin-treated mouse embryos beyond the two-cell stage. *Mol Reprod Dev* 41:16-9.
243. Rath D (2001) Producción in Vitro de embriones porcinos. En "Biotecnología de la reproducción". Ed. Palma GA. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. p. 637-672.

244. Rieger D, Loskutoff N (1994) Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 100:257-262.
245. Roberts R, Stark J, Iatropoulou A, Becker DL, Franks S, Hardy K (2004) Energy substrate metabolism of mouse cumulus-oocyte complexes: response to follicle-stimulating hormone is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway and is associated with oocyte maturation. *Biol Reprod* 71:199-209.
246. Rose-Hellekant T, Libersky Williamson E, Bavister B (1998) Energy substrates and amino acids provided during in vitro maturation of bovine oocytes alter acquisition of developmental competence. *Zygote* 6:285-294.
247. Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge M, First N (1991) In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol Reprod* 44:256-260.
248. Sato E, Yokoo M (2005) Morphological and biochemical dynamics of porcine cumulus-oocyte complexes: role of cumulus expansion in oocyte maturation. *Ital J Anat Embryol* 110:205-17.
249. Sato H, Iwata H, Hayashi T, Kimura K, Kuwayama T, Monji Y (2007) The effect of glucose on the progression of the nuclear maturation of pig oocytes. *Anim Reprod Sci* 99:299-305.
250. Sawai K, Funahashi H, Niwa K (1997) Stage-specific requirement of cysteine during in vitro maturation of porcine oocytes for glutathione synthesis associated with male pronuclear formation. *Biol Reprod* 57:1-6.
251. Schirmer T, Evans P (1990) Structural basis of the allosteric behaviour of phosphofructokinase. *Nature* 343:140-145.
252. Schoevers E, Kidson A, Verheijden J, Bevers M (2003) Effect of follicle-stimulating hormone on nuclear and cytoplasmic maturation of sow oocytes in vitro. *Theriogenology* 59:2017-2028.

253. Schrader M, Fahimi HD (2004) Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* 122:383-93.
254. Schwartz N (2002) Carbohydrate metabolism II: special pathways and glycoconjugates. In "Textbook of biochemistry". Ed. Devlin T. Fifth edition. Wiley-Liss, New York. p. 665-692.
255. Seamon KB, Padgett W, Daly JW (1981) Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:3363-7.
256. Shalgi R, Kraicer P, Soferman N (1972) Gases and electrolytes of human follicular fluid. *J Reprod Fertil* 28:335-340.
257. Shayiq RM, Kidwai AM (1986) Effect of fluoride on uptake of D-glucose by isolated epithelial cells of rat intestine. *Environ Res* 41:388-99.
258. Sheets MD, Wu M, Wickens M (1995) Polyadenylation of c-mos mRNA as a control point in *Xenopus* meiotic maturation. *Nature* 374:511-6.
259. Shim C, Lee SG, Song WK, Lee CS, Lee KK, Kim K (1997) Laminin chain-specific gene expression during mouse oocyte maturation. *Mol Reprod Dev* 48:185-93.
260. Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S, Hanada A (1988) In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology* 30:489-496.
261. Sikka SC (2001) Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* 8:851-62.
262. Simon M, Jilek F, Fulka J (1989) Effect of cycloheximide upon maturation of bovine oocytes. *Reprod Nutr Dev* 29:533-540.
263. Simpfendörfer R W, Oelckers K B, López D A (2006) Phosphofructokinase from muscle of the marine giant barnacle *Austromegabalanus psittacus*: Kinetic characterization and effect of in vitro phosphorylation. *Comp Biochem Physiol* 142:382-389.

264. Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL (1989) Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 40:1257-63.
265. Somfai T, Kikuchi K, Onishi A, Iwamoto M, Fuchimoto D, Bali Papp A, Sato E, Nagai T (2004) Relationship between the morphological changes of somatic compartment and kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes during in vitro maturation of porcine follicular oocytes. *Mol Reprod Dev* 68:484-491.
266. Stokes P, Abeydeera L, Leese H (2005) Development of porcine embryos in vivo and vitro; evidence for embryo "cross talk" in vitro. *Dev Biol* 284:62-71.
267. Sturmey RG, Leese HJ (2003) Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction* 126:197-204.
268. Sturmey RG, O'Toole PJ, Leese HJ (2006) Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial:lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction* 132:829-37.
269. Sun Q, Lai L, Bonk A, Prather R, Schatten H (2001) Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size, and protein synthesis inhibition. *Mol Reprod Dev* 59:192-198.
270. Sutovsky P, Fléchon J, Fléchon B, Motlik J, Peynot N, Chesné P, Heyman Y (1993) Dynamics changes of gap junctions and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocyte cumulus complexes. *Biol Reprod* 49:1277-1287.
271. Sutton M, Cetica P, Beconi M, Kind K, Gilchrist R, Thompson J (2003) Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction* 126:27-34.
272. Sutton-McDowall M, Gilchrist R, Thompson J (2004) Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction* 128:313-319.

273. Sutton-McDowall M, Gilchrist R, Thompson J (2005) Effect of hexoses and gonadotrophin supplementation on bovine oocyte nuclear maturation in a synthetic follicle fluid medium. *Reprod Fertil Dev* 17:407-415.
274. Sutton-McDowall M, Mitchell M, Cetica P, Dalvit G, Pantaleon M, Lane M, Gilchrist R, Thompson J (2006) Glucosamine supplementation during in vitro maturation inhibits subsequent embryo development: possible role of the hexosamine pathway as a regulator of developmental competence. *Biol Reprod* 74:881-8.
275. Szollosi M, Debey P, Szollosi D, Rime H, Vautier D (1991) Chromatin behaviour under influence of puromycin and 6-DMAP at different stages of mouse maturation. *Chromosoma* 100:339-354.
276. Takami M, Preston S, Poyloy V, Behrman H (1999) Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. *Am J Physiol* 276:684-688.
277. Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A (2002) Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* 61:414-24.
278. Tatemoto H, Muto N, Sunagawa I, Shinjo A, Nakada T (2004) Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biol Reprod* 71:1150-7.
279. Tatemoto H, Ootaki K, Shigeta K, Muto N (2001) Enhancement of developmental competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside during in vitro maturation. *Biol Reprod* 65:1800-6.
280. Tatemoto H, Sakurai N, Muto N (2000) Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 63:805-10.
281. Tatemoto H, Terada T (1995) Time-dependent effects of cycloheximide and alpha-amantin on meiotic resumption and progression in bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 43:1107-1113.

282. Thach RE (1992) Cap recap: the involvement of eIF-4F in regulating gene expression. *Cell* 68:177-180.
283. Thompson J (2006) The impact of nutrition of the cumulus oocyte complex and embryo on subsequent development in ruminants. *J Reprod Dev* 52:169-175.
284. Thompson J, Gardner D, Pugh P, McMillan W, Tervit H (1995) Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biol Reprod* 53:1385-1391.
285. Tomek W, Torner H, Kanitz W (2002) Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reprod Domest Anim* 37:86-91.
286. Tornqvist H, Belfrage P (1981) Monoacylglycerol lipase from rat adipose tissue. In "Methods in Enzymology". Ed. Lowenstein J. Academic Press, New York – London – Toronto – Sydney – San Francisco. 71: 646-652.
287. Vanderhyden B C, Telfer E E, Eppig J J (1992) Mouse oocyte promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro. *Biol Reprod* 46:1196-1204.
288. Viet Linh N, Dang-Nguyen TQ, Nguyen BX, Manabe N, Nagai T (2009) Effects of cysteine during in vitro maturation of porcine oocytes under low oxygen tension on their subsequent in vitro fertilization and development. *J Reprod Dev* 55:594-8.
289. Wang WH, Sun QY, Hosoe M, Shioya Y, Day BN (1997) Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biol Reprod* 56:1376-82.
290. Wassarman P, Albertini D (1994) The mammalian ovum. In "The physiology of reproduction". Eds. Knobil E and Neill J. Raven Press, Ltd., New York. p. 79-122.
291. Wassarman PM (1988) The mammalian ovum. In "The physiology of reproduction". Eds. Knobil E and Neill J. Raven Press, Ltd., New York. p. 69-102.

292. Wassarman PM, Litscher ES (2008) Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida. *Int J Dev Biol* 52:665-76.
293. Whitaker B, Knight J (2009) Effects of N-acetyl-cysteine and N-acetyl-cysteine-amide Supplementation on In Vitro Matured Porcine Oocytes. *Reprod Domest Anim* , no. doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01344.x
294. Wongsrikeao P, Otoi T, Taniguchi M, KarjaN, Agung B, Nii M, Nagai T (2006) Effects of hexoses on in vitro oocyte maturation and embryo development in pigs. *Theriogenology* 65:332-343.
295. Wood T (1986) Physiological functions of the pentose phosphate pathway. *Cell Biochem Funct* 4:241-247.
296. Wu B, Ignatz G, Currie B, Yang X (1996) Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation in vitro of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 45:560-565.
297. Yamashita Y, Hishinuma M, Shimada M (2009) Activation of PKA, p38MAPK and ERK1/2 by gonadotropins in cumulus cells is critical for induction of EGF-like factor and TACE/ADAM17 gene expression during in vitro maturation of porcine COCs. *J Ovarian Res* 2:20.
298. Yamauchi N, Nagai T (1999) Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after in vitro maturation in the presence of cysteamine. *Biol Reprod* 61:828-33.
299. Yanagimachi R (1988) Mammalian fertilization. In "The Physiology of Reproduction". Eds. Knobil E and Neill J. Raven Press, Ltd., New York. p. 135-185.
300. Yokoo M, Kimura N, Abe H, Sato E (2008) Influence of hyaluronan accumulation during cumulus expansion on in vitro porcine oocyte maturation. *Zygote* 16:309-14.
301. Yonezawa N, Kanai S, Nakano M (2007) Structural significance of N-glycans of the zona pellucida on species-selective recognition of spermatozoa between pig and cattle. *Soc Reprod Fertil Suppl* 63:217-28.

302. York J (2002) Enzymes: classification, kinetics, and control. In "Textbook of biochemistry". Ed. Devlin T. Fifth edition. Wiley-Liss, New York. p. 413-464.
303. Yoshida M, Cran DG, Pursel VG (1993a) Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. *Mol Reprod Dev* 36:462-8.
304. Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishigaki K, Kogima T, Nagai T (1993b) Birth of piglets derived from in vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 39:1303-1311.
305. Zhang M, Ouyang H, Xia G (2009) The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Mol Hum Reprod* 15:399-409.
306. Zhang X, Li XH, Ma X, Wang ZH, Lu S, Guo YL (2006a) Redox-induced apoptosis of human oocytes in resting follicles in vitro. *J Soc Gynecol Investig* 13:451-8.
307. Zhang X, Wu XQ, Lu S, Guo YL, Ma X (2006b) Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. *Cell Res* 16:841-50.
308. Zhu S, Sun Z, Zhang J (2007) Ovine (*Ovis aries*) blastula from an in vitro production system and isolation of primary embryonic stem cells. *Zygote* 15:35-41.
309. Zuelke K, Brackett B (1992) Effects of luteinizing hormone on glucose metabolism in cumulus enclosed bovine oocytes matured in vitro. *Endocrinology* 131:2690-2696.
310. Zuelke K, Brackett B (1993) Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after in vitro maturation with luteinizing hormone. *Biol Reprod* 48:815-820.

## Anexo 1

### Composición del medio 199, sales Earle, L-glutamina, 2,2 mg/l bicarbonato de sodio, GIBCO, Grand Island, NY, USA

| COMPONENTS                                 | Molecular Weight | Concentration (mg/L) | mM        |
|--|------------------|----------------------|-----------|
| <b>Amino Acids</b>                         |                  |                      |           |
| Glycine                                    | 75               | 50                   | 0.667     |
| L-Alanine                                  | 89               | 25                   | 0.281     |
| L-Arginine hydrochloride                   | 211              | 70                   | 0.332     |
| L-Aspartic acid                            | 133              | 30                   | 0.226     |
| L-Cysteine hydrochloride-H <sub>2</sub> O  | 176              | 0.1                  | 0.000568  |
| L-Cystine 2HCl                             | 240              | 26                   | 0.108     |
| L-Glutamic Acid                            | 147              | 75                   | 0.51      |
| L-Glutamine                                | 146              | 100                  | 0.685     |
| L-Histidine hydrochloride-H <sub>2</sub> O | 210              | 21.88                | 0.104     |
| L-Hydroxyproline                           | 131              | 10                   | 0.0763    |
| L-Isoleucine                               | 131              | 40                   | 0.305     |
| L-Leucine                                  | 131              | 60                   | 0.458     |
| L-Lysine hydrochloride                     | 183              | 70                   | 0.383     |
| L-Methionine                               | 149              | 15                   | 0.101     |
| L-Phenylalanine                            | 165              | 25                   | 0.152     |
| L-Proline                                  | 115              | 40                   | 0.348     |
| L-Serine                                   | 105              | 25                   | 0.238     |
| L-Threonine                                | 119              | 30                   | 0.252     |
| L-Tryptophan                               | 204              | 10                   | 0.049     |
| L-Tyrosine disodium salt dihydrate         | 261              | 58                   | 0.222     |
| L-Valine                                   | 117              | 25                   | 0.214     |
| <b>Vitamins</b>                            |                  |                      |           |
| Alpha-tocopherol Phosphate                 | 702              | 0.01                 | 0.0000142 |
| Ascorbic Acid                              | 176              | 0.05                 | 0.000284  |
| Biotin                                     | 244              | 0.01                 | 0.000041  |
| Choline chloride                           | 140              | 0.5                  | 0.00357   |
| D-Calcium pantothenate                     | 477              | 0.01                 | 0.000021  |
| Folic Acid                                 | 441              | 0.01                 | 0.0000227 |

|   |       |       |           |
|---|-------|-------|-----------|
| Menadione (Vitamin K3)  | 172   | 0.01  | 0.0000581 |
| Niacinamide   | 122   | 0.025 | 0.000205  |
| Nicotinic acid (Niacin)   | 123   | 0.025 | 0.000203  |
| Para-Aminobenzoic Acid  | 137   | 0.05  | 0.000365  |
| Pyridoxal hydrochloride   | 204   | 0.025 | 0.000123  |
| Pyridoxine hydrochloride  | 206   | 0.025 | 0.000121  |
| Riboflavin  | 376   | 0.01  | 0.0000266 |
| Thiamine hydrochloride  | 337   | 0.01  | 0.0000297 |
| Vitamin A (acetate)   | 328   | 0.1   | 0.000305  |
| Vitamin D2 (Calciferol)   | 397   | 0.1   | 0.000252  |
| i-Inositol  | 180   | 0.05  | 0.000278  |
| <b>Inorganic Salts</b>  |       |       |           |
| Calcium Chloride (CaCl <sub>2</sub> ) (anhyd.)                                  | 111   | 200   | 1.8       |
| Ferric nitrate (Fe(NO <sub>3</sub> )-9H <sub>2</sub> O)                         | 404   | 0.7   | 0.00173   |
| Magnesium Sulfate (MgSO <sub>4</sub> ) (anhyd.)                                 | 120   | 97.67 | 0.814     |
| Potassium Chloride (KCl)  | 75    | 400   | 5.33      |
| Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )  | 84    | 2200  | 26.19     |
| Sodium Chloride (NaCl)  | 58    | 6800  | 117.24    |
| Sodium Phosphate monobasic (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O) | 138   | 140   | 1.01      |
| <b>Other Components</b>   |       |       |           |
| 2-deoxy-D-ribose  | 134   | 0.5   | 0.00373   |
| Adenine sulfate   | 404   | 10    | 0.0248    |
| Adenosine 5'-phosphate  | 347   | 0.2   | 0.000576  |
| Adenosine 5'-triphosphate   | 605   | 1     | 0.00165   |
| Cholesterol   | 387   | 0.2   | 0.000517  |
| D-Glucose (Dextrose)  | 180   | 1000  | 5.56      |
| Glutathione (reduced)   | 307   | 0.05  | 0.000163  |
| Guanine hydrochloride   | 188   | 0.3   | 0.0016    |
| Hypoxanthine Na   | 136   | 0.4   | 0.00294   |
| Phenol Red  | 376.4 | 20    | 0.0531    |
| Ribose  | 150   | 0.5   | 0.00333   |
| Sodium Acetate  | 82    | 50    | 0.61      |
| Thymine   | 126   | 0.3   | 0.00238   |
| Tween 80®   |       | 20    | ∞         |
| Uracil  | 112   | 0.3   | 0.00268   |
| Xanthine-Na   | 152   | 0.34  | 0.00224   |