Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Regulación de la maduración de ovocitos por factores paracrinos

Lattanzi, Mariano L.

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Lattanzi, Mariano L.. (2010). Regulación de la maduración de ovocitos por factores paracrinos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Lattanzi, Mariano L.. "Regulación de la maduración de ovocitos por factores paracrinos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

REGULACIÓN DE LA MADURACIÓN DE OVOCITOS POR FACTORES PARACRINOS

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Química Biológica

Mariano L. Lattanzi

Director de Tesis: Dr. J. Lino Barañao

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Buenos Aires, 2009

A Pauli

A mis padres

Agradecimientos

A Lino, por darme la oportunidad, la libertad, y el estímulo para desarrollar mi trabajo. Por ser un gran jefe y contagiarme algo de su avidez por la ciencia

A Leo, por su apoyo permanente y sus consejos. Por haberme adoptado como uno de los suyos y haber sido una gran influencia en mi formación

A Claudio, el mejor compañero de trabajo

A Guille, por estar siempre dispuesto a enseñar y de quien aprendí mucho

A Lucho, Juan Manuel, Alf, Ursula e Inés, por los cafés y mates de trabajo

A Adali, Pato, Silvia, María Laura, Mónica, Gri, por las diferentes etapas compartidas en el 243

Al resto del IByME, por hacer del instituto un lugar de trabajo propicio y placentero

A Marta Mudry por su colaboración entusiasta en algunos experimentos

A Daniel Salamone, Tomas Santa Coloma, Michele Bianchini, Vanesa Rawe por su colaboración en diferentes oportunidades

A Andrés, por darme la libertad para terminar esta tesis

A Pauli por la paciencia

A mis viejos

Regulación de la maduración de ovocitos por factores paracrinos

El objetivo de esta tesis fue el estudio de factores regulatorios que controlan la maduración de los ovocitos. Para investigar el papel de las células de la granulosa se caracterizó la línea celular BGC-1, obtenida por inmortalización espontánea de cultivos primarios de células de la granulosa bovinas, como modelo para el mantenimiento del arresto meiótico de ovocitos bovinos *in vitro.* Se determinó que las células BGC-1 inhiben el reinicio de la meiosis y la expansión del cumulus de los complejos cumulus-ovocito de manera mas eficiente que cultivos primarios de células de la granulosa, y que este efecto es específico. Se estableció que las células BGC-1 producen factor/es de naturaleza soluble y lábil, que actúan a través de las células del cumulus para inhibir el reinicio espontáneo de la meiosis *in vitro*. Esta inhibición es completamente reversible y, bajo el efecto inhibitorio de las células BGC-1, el reinicio de la meiosis puede ser inducido por FSH.

En la segunda parte de esta tesis se estudió el rol de los catecolestrógenos, metabolitos endógenos del estradiol, durante la maduración de los ovocitos. Se pudo comprobar que la presencia de 2-metoxiestradiol durante la maduración de los ovocitos afecta el subsecuente desarrollo embrionario temprano. Se estableció que el 2-metoxiestradiol interacciona con los microtúbulos induciendo alteraciones en el huso meiótico de los ovocitos que afectan la normal segregación de los cromosomas luego de la fecundación. Los desbalances cromosómicos generados llevan a la inhibición del desarrollo embrionario en el estadio de mórula. Debido a que el 2-metoxiestradiol puede incrementarse en el fluido folicular en respuesta a ligandos del AHR, concentraciones intraováricas anormalmente altas podrían estar involucradas en los síndromes de infertilidad asociados a algunos contaminantes ambientales que son conocidos activadores de AHR.

Palabras clave: ovocito, maduración, células de la granulosa, reinicio de la meiosis, catecolestrógenos, embriones, bovino.

Paracrine regulation of oocyte maturation

This thesis was aimed at studying the regulation of oocyte maturation by paracrine factors. In order to investigate the role of granulose cells, the BGC-1 cell line, obtained by spontaneous immortalization of bovine granulose cell primary cultures, was characterized as a model of meiotic arrest maintenance of in vitro matured bovine oocytes. BGC-1 cell line inhibits spontaneous meiotic resumption and cumulus expansion of cumulus-oocyte complexes more efficiently than primary granulose cell cultures, and this effect is specific. BGC-1 cells produce soluble, labile factor/s that inhibits spontaneous oocyte meiotic resumption *in vitro*, acting through cumulus cells. This effect is completely reversible and, under the inhibitory effect of BGC-1 cells, the meiotic resumption can be induced by FSH. In the second part of this thesis we studied the role of catecholestrogens, endogenous estradiol metabolites, during oocyte maturation. The presence of during oocyte maturation affects the subsequent early embryonic development. 2-methoxyestradiol interacts with microtubules and induces meiotic spindle aberrations that alter the normal chromosome segregation after fertilization. The ensuing chromosomal unbalances lead to developmental arrest at the morula stage. Because 2-methoxyestradiol could be increased in follicular fluid in response to AHR ligands, abnormally high intraovarian levels could be involved in infertility syndromes associated to some environmental contaminants known to activate AHR.

Key words: oocyte, maturation, granulosa cells, meiotic resumption, catecholestrogens, embryo, bovine.

Los resultados presentados en esta tesis forman parte de los siguientes trabajos:

Exposure of Bovine Oocytes to the Endogenous Metabolite 2-Methoxyestradiol During In Vitro Maturation Inhibits Early Embryonic Development.
Mariano L. Lattanzi, Claudio B. Santos, Marta D. Mudry, and J. Lino Barañao.
Biology of Reproduction 2003 Dec;69(6):1793-1800.

A bovine granulosa cell line maintains meiotic arrest of bovine oocytes.
Mariano L. Lattanzi and J. Lino Barañao.
Manuscrito en preparación.

1. Introducción general 1

1.1. Introducción 2

1.2. Formación de los ovocitos 2

1.3. El folículo ovárico 3

1.4. Desarrollo folicular 5
1.4.1. Formación del folículo primordial 6
1.4.2 Iniciación de la foliculogénesis 7
1.4.3 Crecimiento del folículo preantral 8
1.4.4 Desarrollo del folículo antral 9
1.4.5 Estructura del folículo antral 9
1.4.6 Atresia folicular 11
1.4.7 Ciclo estral y cinética folicular 12
1.4.8 Crecimiento del ovocito 14
1.4.9. Folículo preovulatorio y ovulación 15

1.5. Maduración del ovocito 16
1.5.1. Maduración citoplasmática 17
1.5.1.1 Redistribución de organelas citoplasmáticas 17
1.5.1.2. Dinámica de los filamentos del citoesqueleto 17
1.5.1.3. Maduración molecular 18
1.5.2. Maduración nuclear 18

1.6. Maduración in vitro 20

1.7. Modelo experimental 22
1.7.1. Maduración in vitro 22
1.7.2. Fertilización in vitro 23
1.7.3. Cultivo in vitro de embriones 23

1.8 Objetivos 25
1.8.1 Objetivo general 25
1.8.2 Objetivos particulares 25

2. Módulo I Mantenimiento del arresto meiótico de ovocitos bovinos in vitro por la línea de células de la granulosa BGC-1 26

2.1. Resumen 27

2.2. Introducción 28

2.3. Objetivos 31

2.4. Materiales y métodos 32
2.4.1. Reactivos 32
2.4.2. Cultivos celulares 32
2.4.3. Co-cultivo con ovocitos 33
2.4.4. Obtención y maduración in vitro de ovocitos bovinos 33
2.4.5. Evaluación de la maduración meiótica 34
2.4.6. Evaluación de la expansión del cumulus. 35

2.4.7. Análisis estadístico 35

2.5. Resultados **36**
2.5.1. Efecto del co-cultivo de COC con células BGC-1 o con cultivos primarios de células de la granulosa bovinas sobre la maduración nuclear de los COC. 36
2.5.2. Efecto del co-cultivo de COC con células BGC-1 o con cultivos primarios de células de la granulosa bovinas sobre la expansión del cumulus de los COC. 37
2.5.3 Especificidad del tipo celular 38
2.5.4 Efecto de FSH sobre la acción del co-cultivo 39
2.5.5 Efecto de EGF sobre la acción del co-cultivo 40
2.5.6 Efecto del medio condicionado por células BGC-1 42
2.5.7. Efecto de las células BGC-1 co-cultivadas sin contacto directo con los COC. 44
2.5.8. Efecto del co-cultivo de células BGC-1 con ovocitos denudados de células del cumulus. 45
2.5.9. Reversibilidad del efecto inhibitorio de las células BGC-1 sobre el reinicio de la meiosis 48

2.6. Discusión **50**

3. Módulo II Efecto de los catecolestrógenos sobre la maduración in vitro de ovocitos bovinosI **57**

3.1. Resumen **58**

3.2. Introducción **59**

3.3. Objetivos **61**

3.4. Materiales y métodos **62**
3.4.1. Reactivos 62
3.4.2. Obtención y maduración in vitro de ovocitos bovinos 62
3.4.3. Maduración in vitro de ovocitos bovinos. 62
3.4.4. Fecundación in vitro de ovocitos bovinos. 63
3.4.5. Cultivo in vitro de embriones 63
3.4.6. Inmunocitoquímica 64
3.4.7. Análisis citogenético 65
3.4.8. Ensayo Cometa 65
3.4.9. Análisis estadístico 66

3.5. Resultados **67**
3.5.1. Efecto de los catecolestrógenos sobre la maduración in vitro de ovocitos. 67
3.5.2. Sensibilidad de los ovocitos al 2-MOE2 69
3.5.3. Efecto del estradiol sobre la maduración in vitro de ovocitos. 70
3.5.4. Efecto del suero fetal bovino durante la maduración. 71
3.5.5. Efecto de compuestos antioxidantes sobre la maduración de los ovocitos en presencia de 2-MOE2 72
3.5.6. Efecto del 2-MOE2 durante el cultivo embrionario 73
3.5.7. Efectos comparativos de 2-MOE2 y colchicina 74
3.5.8. Efecto del 2-MOE2 sobre la organización del huso meiótico 75
3.5.9. Análisis citogenético 78
3.5.10. Análisis de integridad del ADN 80
3.5.11. Efecto del 2MOE2 durante la maduración retrasada 81

3.6. Discusión **82**
3.6.1. Efecto del 2-MOE2 durante la maduración de los ovocitos. 82

3.6.2. Efecto del 2-MOE2 durante el cultivo embrionario 85

4. Conclusiones **87**

5. Abreviaturas **90**

6. Referencias **93**

1. Introducción general

1.1. Introducción

La maduración del ovocito es la última de una serie de etapas que debe atravesar una célula germinal femenina para adquirir la capacidad de ser fecundada y dar origen a un nuevo individuo. Durante esta última etapa el ovocito sufre profundos cambios a nivel nuclear y citoplasmáticos que son regulados paracrinamente por una compleja comunicación bidireccional con las células somáticas que lo rodean. Esta regulación local es coordinada por factores endocrinos que son secretados en forma cíclica. Como resultado de la interacción entre los diferentes niveles de regulación, paracrina y endocrina, solamente unos pocos ovocitos son seleccionados para iniciar la etapa de maduración a lo largo de la vida fértil, mientras que la mayor parte degeneran en atresia. Al final de la etapa de maduración ocurre la ovulación, y el ovocito es, durante una corta ventana de tiempo, una célula completamente competente capaz de dar origen a un nuevo individuo si es fecundada en un determinado periodo de tiempo.

1.2. Formación de los ovocitos

Las células germinales primordiales se originan a partir del endodermo del saco vitelino. Estas células proliferan y migran hacia las crestas genitales ubicadas en el mesonefros del embrión donde se diferencian en ovogonias y continúan proliferando formando grupos, los cuales son rodeados por células provenientes del mesonefros formando los cordones sexuales primitivos.

Durante la vida fetal, alrededor del día 80 de gestación en el bovino, las ovogonias comienzan a dejar su ciclo mitótico para entrar en la profase I de la meiosis, convirtiéndose en ovocitos primarios (Byskov and Hoyer, 1994; Russe, 1983). La profase I de la meiosis se divide en cinco etapas: leptonema, cigonema, paquinema, diplonema y diacinesis. Durante el leptonema los cromosomas comienzan a condensarse formando filamentos delgados. Debido a que la meiosis se inicia después de un periodo de síntesis de ADN estos cromosomas contienen dos cromátidas hermanas. Durante el cigonema se inicia el apareamiento de los cromosomas homólogos y se forma el complejo sinaptonémico. Este apareamiento se completa en el paquinema, durante el cual también

se produce la condensación y acortamiento de los cromosomas. En este período los cromosomas homólogos están íntimamente unidos formando tétradas (unidades bivalentes con cuatro cromátidas) y se produce el intercambio de segmentos entre las cromátidas homólogas, la recombinación. Durante el diplonema los cromosomas homólogos comienzan a separarse aunque continúan unidos por uno o más quiasmas. En este punto la meiosis se arresta y los cromosomas se descondensan tomando un aspecto difuso que permite la síntesis de ARN. En este estadio, también conocido como vesícula germinal (GV) (Figura 1.6, A), la progresión de la meiosis es detenida y no será reiniciada hasta que el ovocito sea seleccionado para iniciar la etapa de maduración lo que puede ocurrir meses o años mas tarde.

Durante más de medio siglo se consideró que, en los mamíferos, el ovario posee una población finita de ovocitos al momento del nacimiento que se reduce durante la vida sin posibilidad de renovación. En bovinos, esta población fue calculada en unos 135.000 ovocitos al nacimiento (Erickson, 1966b). Sin embargo este dogma ha sido fuertemente cuestionado durante los últimos anos a partir de la publicación de evidencias sobre la existencia de células madre germinales que permitirían la renovación folicular en ovarios mamíferos adultos (Johnson et al, 2004; Tilly and Telfer, 2009).

1.3. El folículo ovárico

El folículo es la unidad morfológica y funcional del ovario. Está formado por una capa exterior de células tecales que envuelve, por fuera de la membrana basal, capas internas de células de la granulosa. A su vez, las células de la granulosa rodean y confinan al complejo formado por el ovocito y las células del cumulus (Figura 1.1 y 1.4).

En respuesta a la secreción cíclica de gonadotrofinas hipofisiarias, los distintos compartimientos foliculares interactúan de manera integrada para sintetizar esteroides sexuales (estrógenos y progestinas) y para producir un ovocito fertilizable. Aunque las gonadotrofinas son los mayores reguladores del desarrollo del folículo, no todos los folículos en un ovario responden a estas hormonas en un ciclo. Solo un número limitado de folículos seleccionados alcanza la ovulación durante la vida fértil, mientras que la

mayoría degenera en atresia. Luego de la ovulación las células de la granulosa sufren profundos cambios en la respuesta hormonal y en su capacidad de producir esteroides.

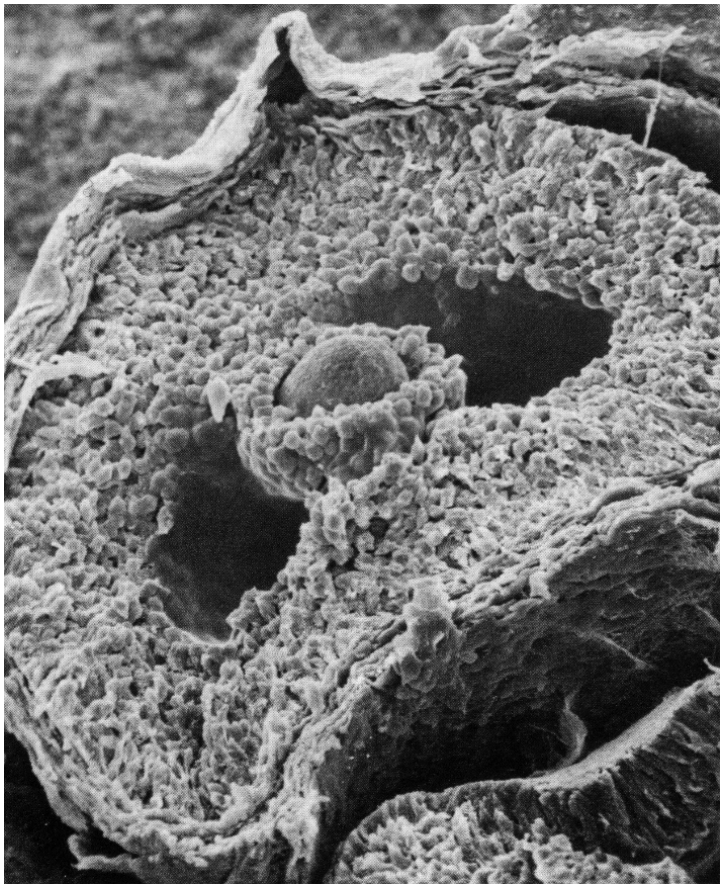

Figura 1.1
Folículo ovárico
Microscopía electrónica de barrido de un folículo ovárico maduro de rata. El ovocito se encuentra rodeado por las células del cumulus, varias capas de células de granulosa que contiene el antro folicular. Por fuera de la membrana basal se observa una capa de células de la teca (Richards, 1979).

1.4. Desarrollo folicular

El crecimiento y diferenciación del ovocito, y la proliferación y diferenciación de las células somáticas que lo rodean ocurren de manera coordinada en las distintas etapas de la foliculogénesis (Figuras 1.2 y 1.3).

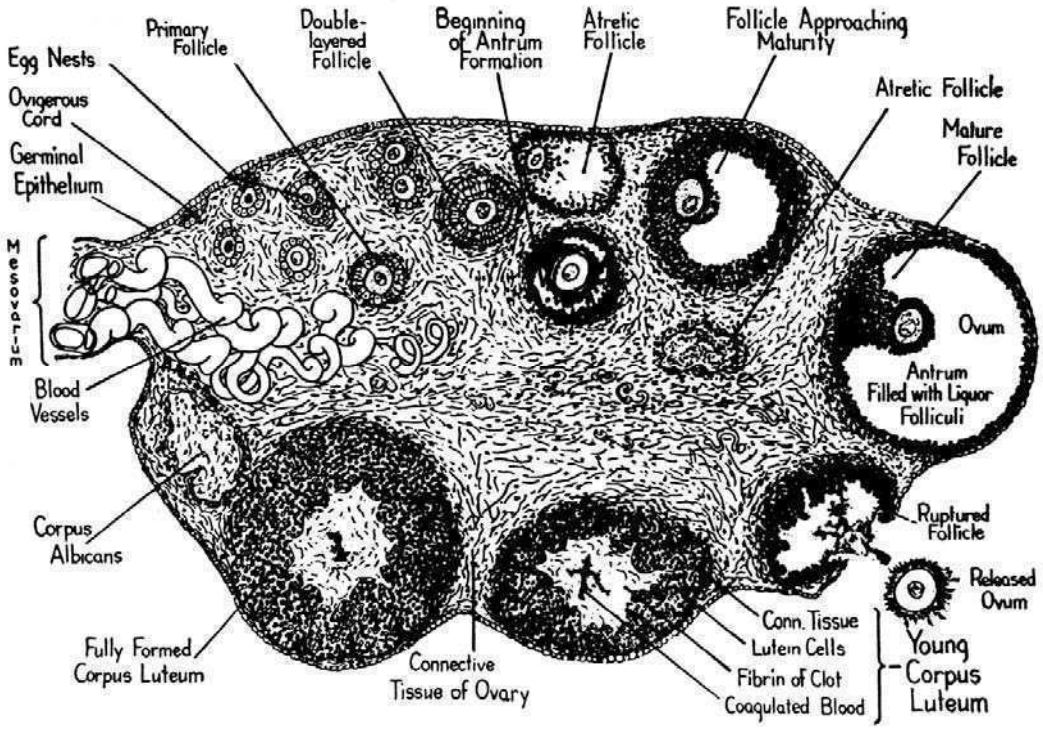

Figura 1.2
Estructura del ovario y desarrollo folicular
Esquema del ovario mostrando los diferentes estadíos del desarrollo folicular (Ham, 1965).

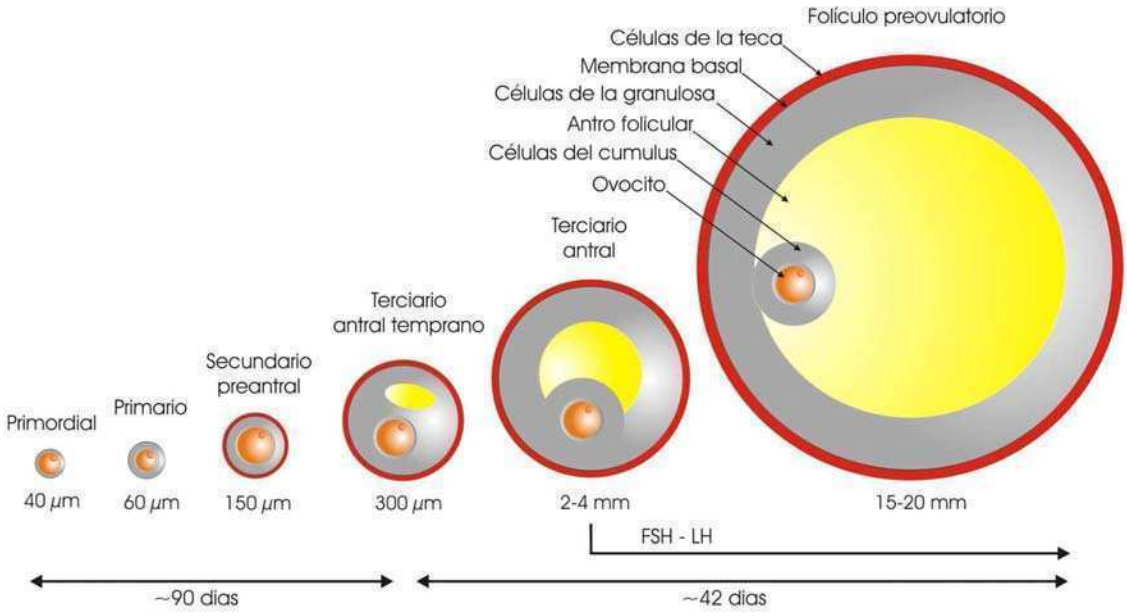

Figura 1.3
Foliculogénesis
Representación esquemática de los cambios morfológicos durante el desarrollo folicular en el bovino. En los bovinos, el crecimiento de los folículos antrales mayores de 2 a 4 mm de diámetro es dependiente de gonadotrofinas.

1.4.1. Formación del folículo primordial

En el estadio temprano de la diferenciación de la gónada femenina, las células de la pregranulosa, provenientes de la rete ovarii y del epitelio superficial, se organizan alrededor de los ovocitos primarios (Byskov and Hoyer, 1994). La unidad resultante constituye el folículo primordial que en bovinos mide unos 40 µm (Braw-Tal and Yossefi, 1997) y esta formado por un ovocito de 30 µm (Picton, 2001) rodeado por una capa de células de la pregranulosa no cuboides y una membrana basal. Este folículo permanece quiescente hasta que se dispara su crecimiento.

1.4.2 Iniciación de la foliculogénesis

La iniciación de la foliculogénesis puede reconocerse en bovinos a partir del día 140 de gestación (Russe, 1983), cuando las células de la granulosa de un folículo primordial muestran una morfología cuboide y un incremento en su número, convirtiéndose en un folículo primario (Hyttel et al, 1997; Russe, 1983).

Una vez comenzado, el crecimiento folicular continúa a lo largo de toda la vida fértil independientemente del estado fisiológico, de la fase del ciclo estral, de los niveles de gonadotrofinas, y aún durante la preñez (Edwards et al, 1977; Pederson, 1970; Pederson and Peters, 1971).

No existen evidencias de la existencia de poblaciones de folículos más grandes de reserva, por lo tanto, una vez que un folículo ha comenzado su etapa de crecimiento y diferenciación culminará en atresia o en la ovulación del ovocito maduro. En la mujer, el agotamiento de la población de los folículos primordiales esta asociado con la menopausia. Por otro lado, a la luz de la recientes evidencias sobre la renovación folicular en adultos (Bukovsky et al, 2005), el conjunto de folículos primordiales en los ovarios adultos representaría una población dinámica y no estática de estructuras en procesos de diferenciación y regresión. La formación de nuevos folículos primordiales durante el período reproductivo podría compensar la atresia de una parte significantiva del total de folículos, preservando el número relativamente constante de folículos tempranos encontrado en mujeres de entre 18 a 38 años (Gougeon et al, 1994). De acuerdo con esta nueva teoría, el comienzo de la menopausia natural o de la falla ovárica prematura se debería no solo al agotamiento de la reserva de folículos primordiales sino también al cese de la renovación folicular. El conocimiento de los mecanismos regulatorios involucrados en la formación de nuevas células germinales y folículos en mujeres adultas podría resultar en aplicaciones clínicas innovadoras relacionadas a la expansión de la reserva de folículos como mecanismo para retrasar la aparición de la falla ovárica prematura, o la menopausia natural (Van den Hurk and Zhao, 2005).

Si bien algunos trabajos indican que el número de folículos que comenzaran a crecer cada día esta ligado al número de folículos arrestados (Krohn, 1967), otros estudios

indican que el número de folículos primordiales en reposo no altera la tasa de iniciación de crecimiento (Hirshfield, 1994). El mecanismo de reclutamiento de folículos primordiales constituye uno de los enigmas fundamentales de la fisiología ovárica.

Coincidente con la transición de las células de la granulosa a morfología cuboide el ovocito comienza la secreción de la matriz glicoproteica extracelular, la zona pelúcida (Fair et al, 1995; Picton, 2001; Russe, 1983). Comienza a la vez un proceso citoplasmático en el cual las células de la granulosa establecen un íntimo contacto con la membrana plasmática del ovocito a través de uniones comunicantes o “gap junctions”. Dada la formación temprana de estos contactos se especula que el acoplamiento entre el ovocito y las células que lo rodean sería importante en el adecuado desarrollo posterior del folículo (Hirshfield, 1991).

1.4.3 Crecimiento del folículo preantral

Cuando el folículo primario entra en la fase de crecimiento el ovocito aumenta de tamaño y las células de la granulosa comienzan a proliferar. Se origina entonces un folículo multilaminado denominado folículo secundario.

Aunque los folículos preantrales son capaces de responder a gonadotrofinas, su crecimiento es independiente de ellas y parece estar regulado por mecanismos intraováricos e intrafoliculares (McGee and Hsueh, 2000) (Figura 1.3). La proliferación de las células de la granulosa, la diferenciación e hipertrofia de las células tecales y el crecimiento del ovocito determinan el incremento en el diámetro del folículo. En bovinos aparecen por primera vez alrededor del día 210 de gestación y alcanzan los 150 µm de diámetro aproximadamente. En estos folículos el ovocito mide entre 50 y 60 µm de diámetro (Hyttel et al, 1997; Russe, 1983).

La capa de células tecales se forma a partir de precursores tipo fibroblasto del estroma cuando el folículo esta conformado por al menos dos capas de células de la granulosa, y constituirá la fuente de andrógenos para la producción folicular de estrógenos (Gore-Langton and Armstrong, 1994). Posteriormente el folículo diferenciado migra hacia la

médula y completa la formación de la teca, evento asociado a la adquisición de una o dos arteriolas en sus adyacencias.

1.4.4 Desarrollo del folículo antral

Durante el desarrollo folicular, la formación del antro folicular representa el comienzo de la transición de la regulación primaria intrafolicular a la regulación extraovárica. El eje hipotálamo-hipófiso-gonadal en la hembra integra señales del cerebro, pituitaria y ovario y produce hormonas que coordinan la maduración folicular con el comportamiento sexual y la preparación fisiológica para la preñez. El hipotálamo produce y secreta GnRH de manera pulsátil directamente en el sistema porta hipofisario (Everett, 1994). La frecuencia de los pulsos de GnRH es modulada por el estado endocrino del animal. Los estrógenos incrementan la frecuencia de los pulsos y la sensibilidad de la hipófisis anterior a GnRH. En respuesta a GnRH la pituitaria anterior libera gonadotrofinas. La baja frecuencia de pulsos favorece la liberación de FSH mientras que una alta frecuencia favorece la liberación de LH.

El crecimiento del folículo antral, a diferencia de lo que ocurre en los estadios anteriores, es rápido, y está caracterizado por la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, la diferenciación de la teca, y la acumulación de fluido folicular (Figuras 1.3 y 1.4).

1.4.5 Estructura del folículo antral

La formación del antro folicular establece la base para la diferenciación de dos poblaciones de células de la granulosa: las células de la granulosa murales, asociadas a la pared folicular, y las células del cumulus asociadas al ovocito (Figura 1.4). Estas poblaciones se diferencian tanto anatómicamente como funcionalmente. Las células del cumulus tienen una alta tasa de proliferación, baja capacidad esteroidogénica, y prácticamente no expresan receptores para LH en comparación con las células de la granulosa murales. Además poseen la capacidad de secretar acido hialurónico lo que

permite la mucificación y expansión del complejo cumulus-ovocito durante la maduración. Durante la ovulación estas células serán eliminadas junto con el ovocito para intervenir en el proceso de fecundación.

Por otro lado, las células de la granulosa murales no constituyen una población homogénea ya que las más cercanas a la membrana basal presentan mayor expresión de receptores para LH y serían más activas esteroidogénicamente que las más cercanas al antro folicular (Channing et al, 1981; Magnusson et al, 1982; Zoller and Weisz, 1979a; Zoller and Weisz, 1979b). A diferencia de las células del cumulus, las células de la granulosa murales luego de la ovulación sufren un proceso de diferenciación terminal, la luteinización. Esta diferenciación de las células de la granulosa en subpoblaciones se explica en gran parte por la formación de gradientes morfogénicos intrafoliculares de factores paracrinos entre el ovocito y la pared folicular (Eppig, 2001). Es aceptado que por defecto las células de la granulosa se diferencian hacia el fenotipo de las murales, mientras que el ovocito secreta factores que promueven el desarrollo del fenotipo de células del cumulus (Gilchrist et al, 2008). El mantenimiento del microambiente entre el ovocito y las células del cumulus por los factores secretados por el ovocito durante el desarrollo antral sería fundamental para que el ovocito alcance la capacidad de desarrollo (Gilchrist et al, 2004).

La cavidad antral, en la que el ovocito ocupa una posición excéntrica rodeado por las células del cumulus, se encuentra llena de fluido folicular. Este fluido contiene hormonas esteroideas libres y unidas a proteínas ligadoras, proteínas derivadas del plasma y de producción local, proteoglicanos y electrolitos (Edwards, 1974).

Los primeros folículos antrales aparecen en el bovino alrededor del día 230 de gestación (Russe, 1983) y miden entre 120 y 280 µm (Lussier et al, 1987; Monniaux et al, 1997). En los folículos antrales el ovocito sigue creciendo hasta los 120um de diámetro.

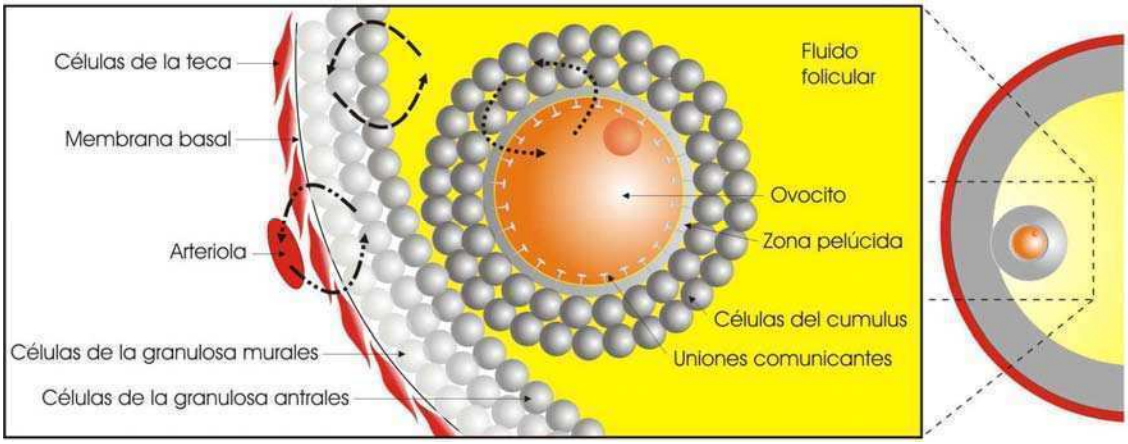

Figura 1.4
Esquema de un folículo antral
La línea de puntos representa la comunicación bidireccional entre el ovocito y las células del cúmulus. El ovocito secreta factores que inducen el fenotipo de las células del cumulus, mientras que estas le proveen factores necesarios para su crecimiento y desarrollo.
La línea de guiones representa la influencia de la pared folicular sobre la comunicación entre el ovocito y las células del cumulus.
La línea de guiones y puntos representa los factores endocrinos que modulan la comunicación intrafolicular.

1.4.6 Atresia folicular

La atresia folicular es el proceso a través del cual degeneran los folículos que no fueron seleccionados para ovular (Hirshfield, 1991), y ocurre a través de muerte celular por apoptosis (Hsueh et al, 1994; Tilly, 1996).

La atresia folicular debe diferenciarse del otro proceso de degeneración celular que ocurre en el ovario, denominado “attririon”, que es responsable de la pérdida del mayor numero de ovocitos y ocurre en la etapa prenatal (Reynaud and Driancourt, 2000). En los bovinos este proceso es responsable de la pérdida del 95% del máximo número de ovocitos presentes en el ovario, ya que se reducen de 2,7 millones, presentes al día 110 de gestación, a unos 135,000 al nacimiento (Erickson, 1966a). Posteriormente al nacimiento, la población de folículos permanece relativamente estable durante los primeros 5 o 6 años

de vida después de los cuales comienza a declinar hasta depletarse casi completamente a los 20 años (Erickson, 1966b). Se calcula que durante la vida no mas de 100 ovocitos van a madurar y ovular, por lo que más del 99% degeneran en atresia.

Los folículos pueden volverse atrésicos en cualquier estadio del desarrollo, aunque en la mayoría de los mamíferos la mayor eliminación ocurre entre los estadios preovulatorios (Fortune, 1994). Este es el momento cuando el crecimiento continuo es dependiente de gonadotrofinas y se ha demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que la exposición a FSH es necesaria para evitar la atresia (Chun et al, 1994; Tilly et al, 1992; Tilly et al, 1995) (Figuras 1.3 y 1.5). Por otro lado, los estrógenos son indispensables para el crecimiento y maduración del folículo. El estradiol y los andrógenos regulan la apoptosis en células de la granulosa actuando como factores de supervivencia o atretogénicos respectivamente (Billig et al, 1993).

Los primeros signos de atresia folicular se manifiestan en las células de la granulosa, las cuales pierden la actividad aromatasa (Gordon and Lu, 1990), mientras que el ovocito es afectado mas tardíamente (Kruip and Dieleman, 1982; Leibfried and First, 1979). En folículos de mas de 3 mm de diámetro, el ovocito puede mantener la capacidad de desarrollo aunque la atresia folicular haya comenzado (Hazeleger et al, 1995). Mas aún, ha sido propuesto que el estadio inicial de la atresia folicular sería un microambiente favorable para que el COC adquiera la capacidad de desarrollo (Blondin et al, 1997a; Blondin et al, 1997b; de Wit et al, 2000; Hagemann et al, 1999) ya que las condiciones serían similares a las encontradas en el folículo justo antes de la ovulación (Espey, 1994). Curiosamente, los COC con signos de atresia sufren una reorganización de las organelas y cambios nucleares similares a los observados durante la maduración final en los folículos dominantes (Assey et al, 1994).

1.4.7 Ciclo estral y cinética folicular

El crecimiento de los folículos antrales involucra tres eventos principales: reclutamiento, selección y dominancia (Figura 1.5). (Ginther et al, 2001b; Ginther et al, 2001a).

Reclutamiento es el término dado al crecimiento de los folículos mas allá del estadio en el que la mayor parte de los folículos degenera en atresia, o sea cuando su crecimiento se hace dependiente de gonadotrofinas. Los folículos son reclutados en grupos de crecimiento sincronizado, llamados cohortes, en respuesta a un incremento moderado en el nivel de FSH plasmática. Los folículos reclutados en un momento dado serían los más sensibles a dicho incremento debido a la mayor expresión de receptores para FSH en las células de la granulosa (Fortune, 1994).

La selección es el proceso por el cual un solo folículo continúa el crecimiento mientras que el resto de los folículos reclutados cesa el crecimiento y degenera en atresia. Este proceso tiene una primera fase de crecimiento común durante la cual la concentración de FSH plasmática declina paulatinamente debido a la inhibición que ejercen sobre la hipófisis hormonas secretadas por la cohorte de folículos en crecimiento (estradiol e inhibinas). Luego, las tasas de crecimiento de los folículos más grandes comienzan a diferenciarse apareciendo un folículo de mayor tamaño o dominante. Este folículo ejerce dominancia sobre el resto porque es más sensible a la FSH y produce más hormonas que inhiben la secreción de FSH, cuya concentración plasmática disminuye a niveles insuficientes para el desarrollo del resto de los folículos subordinados que degeneran en atresia.

Este patrón de crecimiento de los folículos antrales (reclutamiento, selección y dominancia) no ocurre en forma continua ni al azar, sino en ciclos llamados ondas. En el bovino usualmente se pueden observar dos o tres ondas foliculares por cada ciclo estral, que se caracterizan por el reclutamiento de entre 5 y 10 folículos de 3 a 4 mm de diámetro (Van den Hurk and Zhao, 2005) de los cuales solo uno alcanzará el estadio preovulatorio, mientras que el resto degenera en atresia. Cada onda folicular termina con la atresia o la ovulación del folículo dominante, dependiendo en la fase del ciclo estral en que se haya iniciado (Figura 1.5).

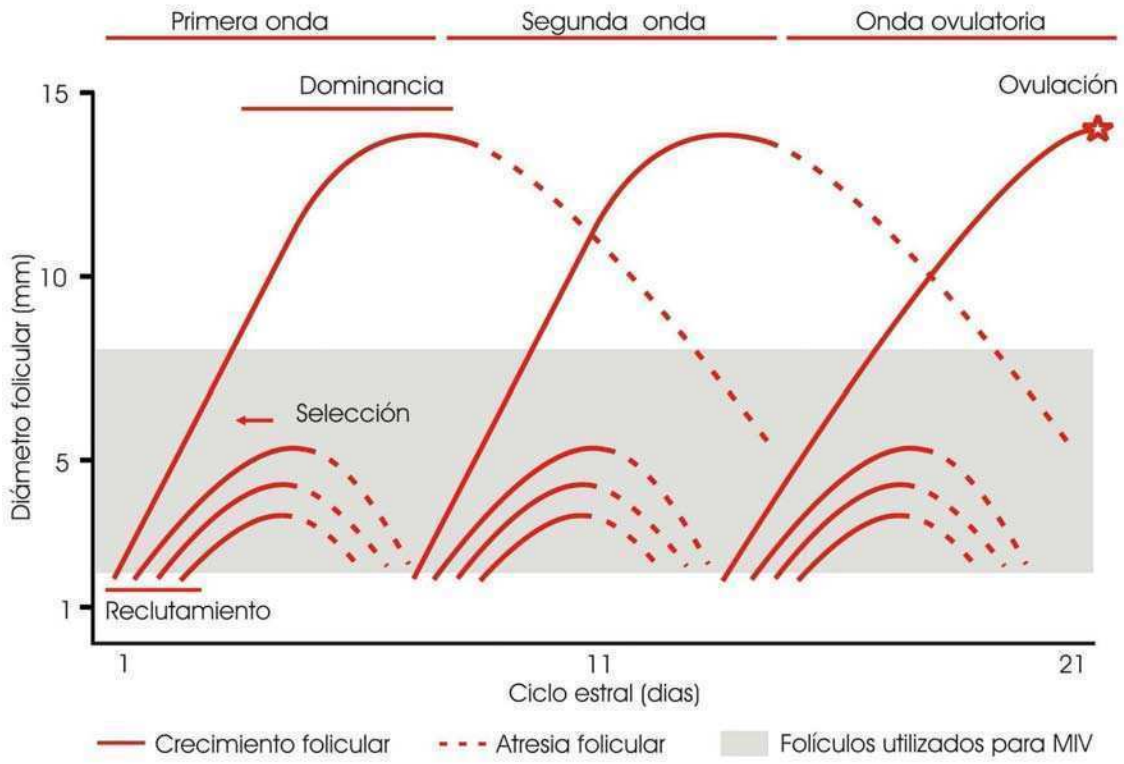

Figura 1.5
Esquema de la cinética folicular durante el ciclo estral
Diagrama esquemático del crecimiento folicular en el ciclo estral del bovino

1.4.8 Crecimiento del ovocito

El folículo ovárico bovino crece unas 300 veces en diámetro desde el estadio de folículo primario (50um) hasta el estadio preovulatorio (15mm), y este proceso tarda entre 130 y 180 dias aproximadamente (Lussier et al, 1987; Webb et al, 2004). Este periodo de tiempo permite al ovocito el crecimiento y la acumulación de factores requeridos para la fertilización y el desarrollo embrionario temprano.

Mientras que durante el pasaje de folículo primordial a folículo primario el ovocito crece muy poco, durante el pasaje al estadio folicular preantral el ovocito entra en una etapa de activo crecimiento (Van den Hurk and Zhao, 2005).

El ovocito debe crecer para ser competente para poder ser fecundado e iniciar el desarrollo embrionario temprano. Durante el aumento de tamaño, el ovocito también se diferencia. Esto requiere una compleja organización citoplasmática que incluye la formación de nuevos productos y organelas, y la replicación y redistribución de las existentes (Picton et al, 1998). Junto al gran incremento en la síntesis de ARN y proteínas, el número de ribosomas, mitocondrias y otras organelas celulares aumenta significativamente en los ovocitos en crecimiento. La acumulación de numerosas vesículas asociadas a la membrana, gránulos de glucógeno, proteínas, lípidos y cuerpos multivesiculares es indicativa de almacenamiento y transporte molecular a través de la membrana del ovocito (Van den Hurk and Zhao, 2005). La síntesis de ARN es muy activa en ovocitos de folículos de 0,5 a 3 mm pero disminuye gradualmente a medida que el ovocito alcanza el tamaño final, siendo casi nula en ovocitos de mas de 110 µm encontrados en folículos de mas de 3 mm. En este punto el ovocito alcanza la capacidad para reiniciar la meiosis. Sin embargo, la capacidad del ovocito para reiniciar y completar la meiosis e iniciar el desarrollo embrionario temprano luego de la fecundación va a ser marcadamente incrementada durante la dominancia folicular, especialmente después de la luteolisis, mediante un proceso llamado capacitación. Por lo tanto, después de finalizada la transcripción el ovocito no entra en quiescencia sino que se prepara para continuar el desarrollo como embrión después de la fecundación (Van den Hurk and Zhao, 2005).

La adquisición de la capacidad de desarrollo es un proceso gradual durante el desarrollo folicular. Mientras que una proporción de ovocitos de folículos de 3 mm de diámetro tiene la completa capacidad de desarrollo, esta proporción no aumenta durante el desarrollo hasta los folículos de 7 mm. Parecería que el resto de los ovocitos requieren además una etapa adicional de pre maduracion, o capacitación, que ocurre en el folículo preovulatorio, antes del pico ovulatorio de LH (Hendriksen et al, 2000).

1.4.9. Folículo preovulatorio y ovulación

El folículo preovulatorio o folículo de de Graaf es el que presenta una esteroidogénesis mas activa y el que presenta una mayor respuesta a gonadotrofinas. Las células tecales

producen mayor cantidad de andrógenos en respuesta a LH y las células de la granulosa incrementan su actividad aromatasa en respuesta a FSH, sintetizando cantidades máximas de estradiol. La acción conjunta de FSH y estradiol induce la expresión de receptores de LH en las células de la granulosa.

El pico preovulatorio de LH juega un papel central en el desencadenamiento de la cascada de eventos en los folículos preovulatorios, esencial para la ovulación de un ovocito fertilizable (Hsieh et al, 2007). Los receptores para LH se expresan casi exclusivamente en las células tecales durante los estadios tempranos de desarrollo folicular, apareciendo en las células de la granulosa murales en los estadios finales. Aunque estos receptores están acoplados a proteínas G y su activación estimula la adenilato ciclasa para producir AMPc que activa la proteína quinasa A, otras vías metabólicas también son activadas como MAPK, proteína quinasa B (AKT) y quinasa inducible por suero y glucocorticoide (Conti et al, 2006). Como resultado se reprograma el perfil de expresión genética en las células tecales y de la granulosa murales (Hsieh et al, 2007), suprimiéndose la actividad aromatasa e incrementándose la expresión de los genes responsables de la ruptura de la pared del folículo y del inicio de la maduración del ovocito.

1.5. Maduración del ovocito

La LH estimula la producción de factores similares a EGF en las células de la granulosa murales que transmiten la señal en forma paracrina y/o yuctacrina a las células de la granulosa del cumulus desencadenando, a través de diferentes vías metabólicas, el inicio de la maduración (Conti et al, 2006).

La maduración se puede dividir en dos eventos separados, la maduración nuclear y la citoplasmática, aunque ambos eventos ocurren simultáneamente y en forma interconectada.

1.5.1. Maduración citoplasmática

La maduración citoplasmática involucra la redistribución de las organelas citoplasmáticas, los cambios en la dinámica de los filamentos del citoesqueleto, y la maduración molecular (Ferreira et al, 2009).

1.5.1.1 Redistribución de organelas citoplasmáticas

Durante la maduración, la posición de las mitocondrias cambia desde una localización periférica a una distribución dispersa en todo el citoplasma. La cantidad de ribosomas aumenta a partir del inicio de la maduración, observándose también un aumento de la síntesis de proteínas.

En el estadio de GV el retículo endoplásmico se encuentra uniformemente distribuido en el citoplasma, pero al final de la maduración se localiza en la zona cortical, aumentando también su sensibilidad para la liberación de Ca^{2+} que ocurre durante la fecundación y que induce el comienzo del desarrollo embrionario.

Los gránulos corticales son organelas derivadas del aparato de golgi que están presentes solamente en ovocitos. En los ovocitos inmaduros están distribuidos en el citoplasma pero durante la maduración se relocalizan en la zona cortical muy próximos a la membrana. En respuesta a la entrada de un espermatozoide al citoplasma, el retículo endoplásmico libera Ca^{2+} que lleva a la exocitosis de los gránulos corticales, lo que induce cambios en la zona pelúcida que previenen la polispermia. La entrada de más de un espermatozoide en el ovocito lleva a alteraciones cromosómicas incompatibles con el desarrollo embrionario temprano.

1.5.1.2. Dinámica de los filamentos del citoesqueleto

Los filamentos que componen el citoesqueleto son los microtúbulos, los filamentos de actina y los filamentos intermedios, y son los responsables de la segregación de los cromosomas durante la meiosis, de la división celular durante la citocinesis y del movimiento y transporte de moléculas y organelas dentro de la célula.

Los microtúbulos cumplen un papel fundamental durante la meiosis ya que son los componentes principales del huso meiótico encargado de alinear y segregar correctamente los cromosomas homólogos en la anafase I, y las cromátidas hermanas en la anafase II.

1.5.1.3. Maduración molecular

La maduración molecular ocurre durante el crecimiento y maduración del ovocito y se refiere a la transcripción, almacenamiento y procesamiento del ARN mensajero que va a ser traducido en proteínas por los ribososmas. Estas proteínas estarán involucradas tanto en la maduración del ovocito como en los eventos subsiguientes como la fecundación, la formación de pronúcleos y el desarrollo embrionario temprano.

Después del reinicio de la meiosis no hay expresión génica por lo que todo el ARN mensajero debe ser almacenado antes del inicio de la maduración. De gran importancia es el almacenamiento de ARN mensajero de las proteínas reguladoras del ciclo celular como el Factor Promotor de Maduración (MPF), MOS y MAPK. La síntesis de estas proteínas en las primeras horas de la maduración precede el reinicio de la meiosis. MPF es un heterodímero compuesto por la subunidad reguladora ciclina B1 y la subunidad catalítica $p34^{cdc2}$. MOS activa la cascada de MAPK la cual modula la actividad de MPF que lleva al reinicio de la meiosis (Van den Hurk and Zhao, 2005).

El glutatión es otra proteína sintetizada y acumulada durante la maduración y tiene un papel importante en la protección contra el estrés oxidativo y también esta relacionada a la descondensación de la cabeza del espermatozoide y la formación del pronúcleo masculino. La acumulación de glutatión durante la maduración esta relacionada también a la presencia de las células del cumulus.

1.5.2. Maduración nuclear

Cuando la meiosis se reinicia después de un pico preovulatorio de LH y entra en la etapa de diacinesis, los cromosomas vuelven a condensarse, el número de quiasmas disminuye y los cromosomas homólogos quedan unidos solo por sus extremos. Al término de la

profase I se produce la ruptura de la envoltura nuclear, también conocida como ruptura de la gesícula germinal y los microtúbulos del huso se unen a los cinetocoros. En la metafase I (Figura 1.6, B), los cromosomas homólogos se hallan dispuestos en el plano ecuatorial, unidos entre si por los extremos, mientras que son traccionados hacia los polos opuestos por los centrómeros. En la anafase I los cromosomas homólogos se separan dirigiéndose a los respectivos polos. Una vez que llegan a los polos, en la telofase I, uno de los grupos de cromosomas homólogos es expulsado del ovocito como corpúsculo polar mientra que el otro grupo continúa con la segunda división meiótica. Al llegar al estadio de metafase II (Figura 1.6, C) los cromosomas se encuentran dispuestos en el plano ecuatorial con cada cromátida hermana unida por el centrómero a polos opuestos del huso. En este punto la meiosis se arresta nuevamente y se reiniciará cuando el ovocito sea fecundado por un espermatozoide.

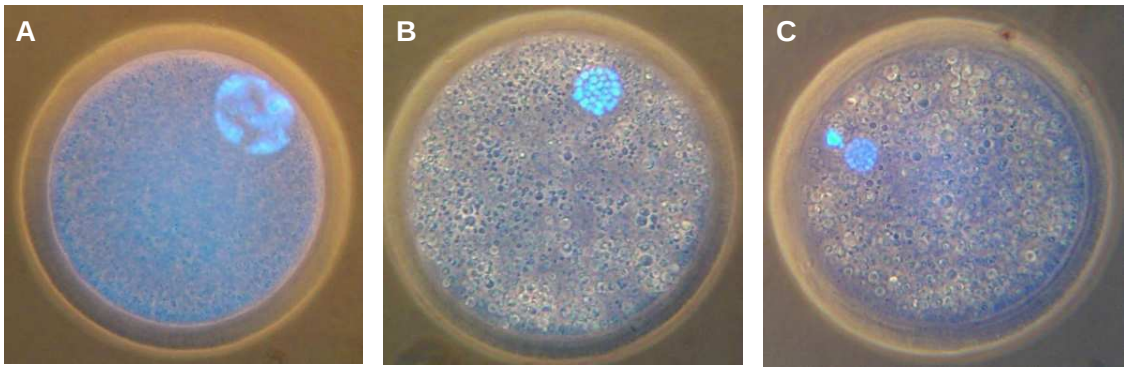

Figura 1.6
Maduración nuclear
Las fotografías muestran ovocitos en diferentes estadios de la maduración nuclear: Vesícula Germinal (A), Metafase I (B), y Metafase II (C)

La entrada de un espermatozoide en el citoplasma del ovocito maduro induce el segundo reinicio de la meiosis. Durante la anafase II los grupos de cromátidas hermanas se dirigen hacia los polos opuestos y durante la telofase II uno de los grupos es expulsado como el segundo corpúsculo polar. A continuación los cromosomas del ovocito y los del

espermatozoide se descondensan y forman los pronúcleos femenino y masculino respectivamente. A medida que se acercan ambos pronúcleos atraviesan una fase de síntesis de ADN para replicar las cromátidas. Finalmente establecen un contacto íntimo entre si, pierden las envolturas nucleares y los cromosomas maternos y paternos se disponen en el huso conformando una sola metafase mitótica. Esta primera mitosis resulta en la formación de las dos primeras células del nuevo embrión.

1.6. Maduración in vitro

La maduración de ovocitos *in vitro* es la base de muchas tecnologías aplicadas a la reproducción. En bovinos permite aumentar el potencial reproductivo de las hembras y el desarrollo de otras tecnologías como la clonación y la generación de animales transgénicos. Por otro lado, como modelo experimental para la investigación del desarrollo embrionario temprano, permite la producción en el laboratorio de gran número de embriones a bajo costo, a partir de ovocitos extraídos de ovarios de animales sacrificados para consumo humano.

A pesar de que los ovocitos madurados *in vitro* muestran tasas de maduración nuclear, fecundación y clivaje similares a los ovocitos madurados *in vivo*, su capacidad de desarrollo es significativamente menor. Mientras que el 85% de los ovocitos madurados *in vivo* son capaces de ser fecundados y dar origen a un embrión, solo un tercio de los ovocitos madurados *in vitro* obtienen esa capacidad. Esta diferencia se debería fundamentalmente al origen de los ovocitos (Blondin et al, 2002). La maduración *in vivo* ocurre en folículos preovulatorios, luego de una etapa de selección y dominancia que dura unos 5 días, durante los cuales crecen desde los 2 mm hasta los 15 mm de diámetro (Driancourt, 1991). En contraposición, el origen de los ovocitos madurados *in vitro* es muy heterogéneo ya que se obtienen de folículos subordinados o en crecimiento que pueden estar a entre 4 y 10 días de una posible ovulación (Figura 1.5). Estos ovocitos no completarían la pre maduración, o capacitación, que ocurre *in vivo* en los folículos dominantes y mediante la cual alcanzarían la capacidad de desarrollo completa (Hyttel et al, 1997).

El tamaño de los folículos está directamente relacionado con la capacidad de desarrollo ya que un mayor porcentaje de ovocitos obtenidos de folículos mayores de 6 mm son capaces de dar origen a embriones en comparación con los obtenidos de folículos de entre 2 y 6 mm (Lonergan et al, 1994). Por otro lado, esto también significa que existe una proporción de ovocitos que adquiere la capacidad de desarrollo en el estadio folicular de 3 mm sin necesidad de la premaduración en el folículo preovulatorio.

El origen de los ovocitos que pueden completar exitosamente la maduración *in vitro* sería bastante flexible ya que se han producido embriones viables de ovocitos obtenidos a partir de un amplio rango de estados fisiológicos y endocrinológicos (Van den Hurk and Zhao, 2005). Muchos estudios han evaluado diferentes características foliculares como tamaño y estado del folículo (Blondin and Sirard, 1995; Hagemann et al, 1999; Lonergan et al, 1994; Pavlok et al, 1992), perfil hormonal (Oussaid et al, 1999), y estado del ovario (de Wit et al, 2000; Hagemann et al, 1999) para tratar de determinar los factores asociados a la capacidad de desarrollo. A pesar de que estos estudios relacionan factores foliculares a la capacidad de desarrollo, el porcentaje embriones que se pueden obtener a partir de ovocitos obtenidos de ovarios de matadero y madurados *in vitro* no ha podido ser incrementado significativamente. Esto podría sugerir que una gran parte de los ovocitos de folículos entre 3 y 6 mm de una cohorte podrían ser incapaces de adquirir la capacidad de desarrollo, pero estudios recientes han demostrado que la mayor parte de estos ovocitos tienen el potencial para adquirir la capacidad de desarrollo ya que mediante la manipulación del crecimiento folicular *in vivo* se pudo incrementar la proporción de ovocitos madurados *in vitro* capaces de dar origen a embriones hasta tasas similares a las de los ovocitos madurados *in vivo* (Blondin et al, 2002).

1.7. Modelo experimental

El modelo experimental utilizado para el estudio de la maduración del ovocito fue la técnica de producción *in vitro* de embriones bovinos, la cual comprende tres etapas: maduración *in vitro* de ovocitos (MIV), fecundación *in vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* de embriones (CIV). Mientras que al final de la MIV es posible medir la maduración nuclear (Figura 1.6), las etapas de FIV y CIV son indispensables para evaluar la maduración citoplasmática y la capacidad de desarrollo de los ovocitos madurados.

1.7.1. Maduración in vitro

Los ovocitos bovinos se obtienen por aspiración de folículos antrales de 2 a 8 mm de diámetro de ovarios obtenidos en mataderos. Luego son seleccionados morfológicamente por homogeneidad de citoplasma y presencia de un cumulus de células de la granulosa compacto y que rodee completamente al ovocito conformando el complejo cumulus–ovocito (COC) (Figura 1.7, A). Estos parámetros son indicadores de capacidad de desarrollo (Leibfried and First, 1979).

In vitro, los COC bovinos reinician la meiosis espontáneamente luego de ser retirados del ambiente folicular. Al cabo de 24 hs alcanzan el estadio de metafase II donde se arrestan nuevamente hasta el momento de la fecundación. Durante este período también se produce la expansión del cumulus el cual es uno de los indicadores morfológicos de maduración citoplasmática (Figura 1.7, B). Esta expansión se ve favorecida por el agregado de FSH y de un 5% de suero fetal bovino durante la maduración.

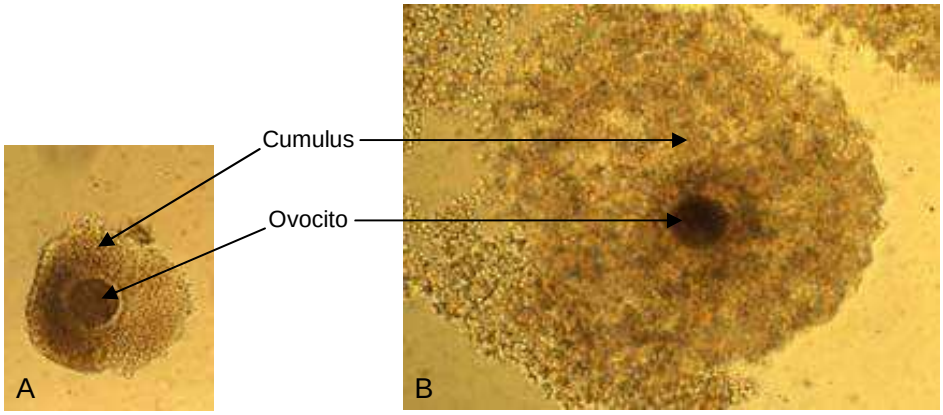

Figura 1.7
Expansión del cumulus
Las fotografías muestran un ovocito rodeado por un cumulus compacto al inicio de la MIV (A), y un ovocito rodeado por un cumulus completamente expandido después de un periodo de 24 hs de MIV (B).

1.7.2. Fertilización in vitro

Luego de la maduración los ovocitos son co-incubados con espermatozoides bovinos previamente capacitados, durante unas 18hs, al cabo de las cuales los presuntos cigotos son lavados, denudados de las células del cumulus remanente, y colocados en el medio de cultivo de embriones.

Durante la fecundación un espermatozoide penetra en el citoplasma del ovocito, a través de la zona pelúcida, desencadenando una serie de eventos que llevan a la activación del desarrollo embrionario.

1.7.3. Cultivo in vitro de embriones

Durante las primeras etapas del desarrollo el embrión utiliza el ARN mensajero y las proteínas que el ovocito acumuló a lo largo de su crecimiento y maduración. Luego, este

material de origen materno comienza a degradarse y el desarrollo embrionario pasa a depender de la activación de la transcripción del genoma embrionario. Esta transición materno-embrionaria se produce durante el estadio de 8 a 16 células por lo que las diferentes causas que pueden llevar a inhibir la activación del genoma embrionario produce el bloqueo del desarrollo es este estadio (Figura 1.8, A).

Los embriones son cultivados por 8 días, al cabo de los cuales llegan al estadio de blastocisto (Figura 1.8, B), donde se puede observar la primera diferenciación celular entre las células del macizo celular interno, que darán origen a los tejidos fetales, y las células del trofoblasto que darán origen a los tejidos placentarios. El desarrollo hasta el estadio de blastocisto es el indicador utilizado en este modelo experimental para medir la capacidad de desarrollo alcanzada por los ovocitos luego de la maduración.

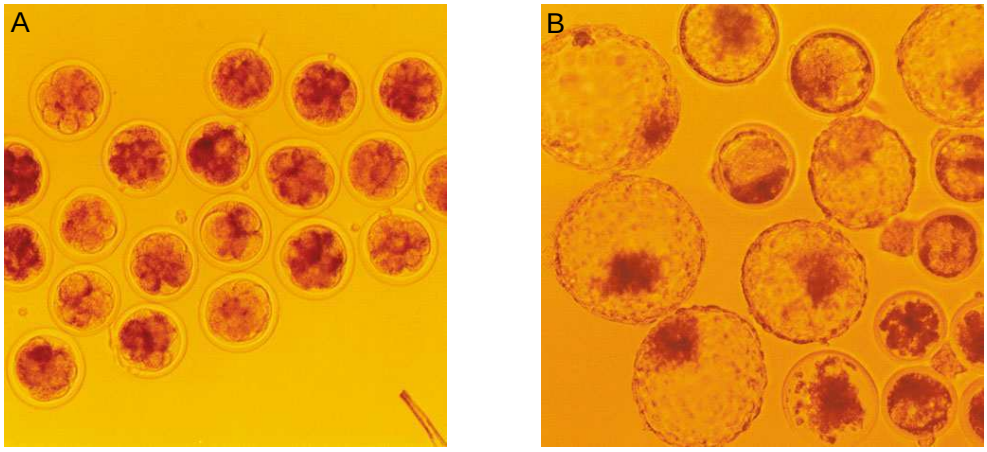

Figura 1.8
Cultivo de embriones
Las fotografías muestran embriones de 8 a 16 células al día 4 de cultivo (A), y blastocistos al día 8 de cultivo (B).

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo general

La maduración del ovocito es un proceso regulado por una compleja comunicación bidireccional entre el ovocito y las células somáticas que lo rodean. Solo algunos factores involucrados han sido identificados.

El objetivo general de esta tesis fue el estudio de algunos mecanismos responsables del control de la maduración de los ovocitos.

1.8.2 Objetivos particulares

Esta tesis ha sido dividida en dos módulos correspondientes a distintos factores estudiados.

Los objetivos particulares son:

I. Determinar y caracterizar la capacidad de la línea celular BGC-1 para mantener el arresto meiótico de los ovocitos bovinos *in vitro*.

II. Determinar los posibles efectos y el mecanismo de acción de los catecolestrógenos durante la maduración de los ovocitos y el desarrollo embrionario temprano.

2. Módulo I

Mantenimiento del arresto meiótico de ovocitos bovinos in vitro por la línea de células de la granulosa BGC-1

2.1. Resumen

Las células de la granulosa han sido involucradas en el mantenimiento del arresto meiótico. Sin embargo su papel específico no ha sido completamente dilucidado. Debido a que los cultivos primarios de células de la granulosa se luteinizan espontáneamente, sus efectos sobre la maduración de los ovocitos son altamente dependientes de las condiciones de cultivo. El objetivo fue determinar la factibilidad de usar la línea celular BGC-1 como modelo para estudiar los mecanismos que controlan el mantenimiento del arresto meiótico de los ovocitos bovinos. Se determinó que las células BGC-1 inhiben el reinicio de la meiosis y la expansión del cumulus de los complejos cumulus-ovocito (COC) de manera mas eficiente que cultivos primarios de células de la granulosa, mientras que otros tipos celulares, como fibroblastos fetales y células Swiss 3T3, no produjeron ningún efecto. La inhibición de la meiosis no fue afectada por la falta de contacto entre las células BGC-1 y las células del cumulus, indicando la participación de factores solubles. Por otro lado, el efecto inhibitorio fue reducido cuando se incrementó la distancia entre los COC y la monocapa de células BGC-1, o cuando los COC fueron cultivados en medio condicionado por células BGC-1, sugiriendo que el posible factor inhibitorio sería lábil y/o liberado en pequeñas cantidades. Las células BGC-1 no inhibieron el reinicio de la meiosis en ovocitos denudados (DO) aunque si inhibieron la expansión de los cumulus aislados a partir de los DO, implicando a las células del cumulus como mediadoras del efecto inhibitorio. FSH revirtió parcialmente el efecto inhibitorio de las células BGC-1. La inhibición fue completamente revertida durante un segundo período de maduración en condiciones control con FSH. Este es el primer reporte de una línea celular estable capaz de reproducir el efecto inhibitorio de las células de la granulosa sobre la maduración de ovocitos. Consecuentemente, la línea celular BGC-1 parecería ser un modelo apropiado para estudiar la regulación bidireccional entre las células de la granulosa y el ovocito durante el desarrollo folicular.

2.2. Introducción

Después de adquirir la capacidad para reiniciar la meiosis, el mantenimiento de los ovocitos mamíferos arrestados en la profase I depende de un complejo balance entre factores intracelulares y la comunicación intercelular con las células somáticas circundantes.

Es ampliamente reconocido que las células foliculares son la fuente de los factores inhibitorios porque cuando los ovocitos son retirados del ambiente folicular reinician la meiosis espontáneamente *in vitro* (Pincus and Enzmann, 1935). *In vivo*, la meiosis es reiniciada después del pico de LH, que desencadena una cascada de eventos que lleva a la ovulación de un ovocito fertilizable (Conti et al, 2006).

En los mamíferos, las células del cumulus juegan un papel fundamental en el control de la maduración del ovocito. Las células del cumulus participan en el mantenimiento del arresto meiótico transfiriendo AMPc al ovocito a través de las uniones comunicantes o en hendidura (gap junction) (Thomas et al, 2004b), manteniendo un alto nivel de AMPc intracelular que previene el reinicio espontáneo de la meiosis (Conti et al, 2002). Alternativamente, las células del cumulus podrían estimular la generación de AMPc por el propio ovocito mediante factores paracrinos o yuctacrinos, a través de receptores acoplados a proteínas Gs (Freudzon et al, 2005; Hinckley et al, 2005; Kalinowski et al, 2004; Mehlmann et al, 2004). Por otro lado, las células del cumulus también mediarían el reinicio de la meiosis inducido por gonadotrofinas ya sea a través del cese de la transferencia de señales inhibitorias (Thomas et al, 2004a), o mediante la producción de señales positivas (Byskov et al, 2002; Coticchio et al, 2004; Fan et al, 2004). Estas señales positivas podrían anular el arresto meiótico por vías de señalización alternativas (Fan et al, 2004; Su et al, 2001; Su et al, 2002). Sin embargo, para poder producir las señales estimuladoras del reinicio de la meiosis las células del cumulus deberían ser licenciadas por el ovocito previamente (Su et al, 2003). En contraposición, el reinicio espontáneo de la meiosis *in vitro* ocurre independientemente de la presencia o ausencia de células del cumulus circundantes.

La regulación bidireccional entre el ovocito y las células del cumulus que controla la maduración nuclear del ovocito está supeditada al control ejercido por las células de la pared folicular. Ha sido demostrado que el co-cultivo con componentes de la pared folicular mantiene el arresto meiótico en ovocitos rodeados por células del cumulus, pero no en ovocitos denudados. Este efecto inhibitorio ha sido atribuido específicamente a células de la granulosa y células tecales ya que otros tipos celulares fueron incapaces de inhibir la maduración de ovocitos (Carbonneau and Sirard, 1994; Centola et al, 1981; De Loos et al, 1994; Fouladi Nashta et al, 1998; Kotsuji et al, 1994; Richard and Sirard, 1996a; Richard and Sirard, 1996b; Sirard and Bilodeau, 1990b; Sirard and Coenen, 1993; Tsafriri and Channing, 1975; Van Tol et al, 1996; Van Tol and Bevers, 1998b).

Ha sido demostrado que el co-cultivo de COC en contacto o en ausencia de contacto con monocapas o explantes de células tecales mantiene el arresto meiótico (Richard and Sirard, 1996a; Richard and Sirard, 1996b; Van Tol and Bevers, 1998b). En cambio, con respecto a células de la granulosa, los resultados reportados han sido variables. El arresto meiótico fue mantenido cuando los COC fueron co-cultivados en contacto directo con altas concentraciones de células de la granulosa en suspensión, pero fue inhibido solo transitoriamente cuando bajas concentraciones fueron usadas (Richard and Sirard, 1996b; Sirard and Bilodeau, 1990b; Sirard and Bilodeau, 1990a; Tsafriri and Channing, 1975). Cuando los COC fueron cultivados conectados a un fragmento de membrana granulosa la meiosis fue retrasada en comparación con ovocitos rodeados solo por células del cumulus (Aktas et al, 2003; Van Tol and Bevers, 1998a). Mientras algunos estudios apoyan la necesidad de contacto directo entre células de la granulosa y los COC (Aktas et al, 2003; Sirard and Bilodeau, 1990b), también ha sido sugerido que la inhibición del reinicio de la meiosis podría ser mediada por factores solubles (Van Tol and Bevers, 1998a).

En comparación con las células tecales, el efecto inhibitorio de las células de la granulosa fue mas débil y susceptible de ser anulado por FSH (Aktas et al, 2003; Van Tol and Bevers, 1998a; Van Tol et al, 1996). Por lo tanto se especuló con que las células de la granulosa y las células tecales producirían diferentes factores inhibitorios (Van Tol and Bevers, 1998a). Otra explicación sugiere que las células de la granulosa serían incapaces de liberar el factor inhibitorio en las condiciones de cultivo *in vitro* (Richard and Sirard, 1996a). En este sentido, cuando las células de la granulosa fueron cultivadas en

monocapas, su capacidad inhibitoria fue reducida (Richard and Sirard, 1996a; Sirard and Bilodeau, 1990a; Sirard and Bilodeau, 1990b). Este efecto fue atribuido al conocido proceso de diferenciación que ocurre durante los primeros días de cultivo *in vitro*, cuando las células de la granulosa desarrollan una actividad semejante a la luteinización (Richard and Sirard, 1996a). En consecuencia, los cultivos primarios de células de la granulosa parecerían no ser un modelo apropiado para el estudio de los factores involucrados en el mantenimiento del arresto meiótico debido a las variables respuestas observadas en diferentes sistemas de cultivo *in vitro*, lo que puede ser debido, al menos en parte, a diferentes grados de luteinización.

La línea de células de la granulosa BGC-1 fue obtenida en nuestro laboratorio por inmortalización espontánea de cultivos primarios de células de la granulosa bovinas obtenidas de folículos antrales de 3 a 5 mm de diámetro (Bernath et al, 1990). Esta línea fue seleccionada originalmente por el mantenimiento de la expresión del gen de fibronectina regulado hormonalmente, que es una característica bien documentada de las células de la granulosa (Bernath et al, 1990). Estudios comparativos entre cultivos primarios de células de la granulosa y células BGC-1 en cuanto a secreción de proteínas, metabolismo esteroideo y respuesta a factores de crecimiento han demostrado que la línea celular BGC-1 parece representar células de la granulosa inmaduras y sería un modelo apropiado para estudiar la función de las células de la granulosa durante el período antral previo al estadio preovulatorio del desarrollo folicular (Bernath et al, 1990; Colman-Lerner et al, 1999; Lanuza et al, 1998; Lerner et al, 1995). Además, las células BGC-1 han mostrado responder a factores promotores de crecimiento producidos por el ovocito (Lanuza et al, 1998). Por consiguiente, las células BGC-1 podrían ser una herramienta útil para investigar la compleja comunicación bidireccional entre las células de la granulosa y los ovocitos durante el desarrollo folicular.

2.3. Objetivos

Las células de la granulosa deben ser capaces de mantener el arresto meiótico antes de que el ovocito adquiera la capacidad de reiniciar la meiosis, en el estadio folicular antral temprano. Por lo tanto el presente estudio fue destinado a determinar y caracterizar la capacidad de la línea celular BGC-1 para mantener el arresto meiótico de los ovocitos bovinos *in vitro*.

2.4. Materiales y métodos

2.4.1. Reactivos

La FSH ovina se obtuvo del National Hormone and Pituitary Program. El resto de los reactivos fueron provistos por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), excepto donde se especifica lo contrario.

2.4.2. Cultivos celulares

La línea de células de la granulosa bovinas (BGC-1) fue obtenida en nuestro laboratorio por inmortalización espontánea a partir de cultivos primarios de células de la granulosa bovinas (Bernath et al, 1990). Cultivos de células Swiss 3T3 y de fibroblastos fetales bovinos fueron utilizados como control.

Las células BGC-1, Swiss 3T3, y los fibroblastos fetales bovinos fueron cultivados en placas de 10 cm de diámetro (Nunc, Roskilde, Denmark), en medio DMEM:F12 (1:1) suplementado con bicarbonato de sodio (2,2 g/L, pH 7,4), conteniendo 5% de suero fetal bovino (FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY) y gentamicina (50 µg/ml). Dos días previos al experimento, las células BGC-1, Swiss 3T3, y los fibroblastos fetales bovinos fueron sembrados a una densidad de 9 x 10^4 células/posillo en placas de 4 posillos (Nunc), en 500 µl del mismo medio de cultivo, y cultivadas a 38,5℃ en atmósfera húmeda con 5% de CO_2.

Los cultivos primarios de células de la granulosa bovinas fueron establecidos 72 hs antes del experimento, según fue descripto previamente (Lerner et al, 1995). Las células de la granulosa fueron aisladas de folículos pequeños (2-8 mm) por aspiración mediante aguja 18-G y jeringa de 5 ml. Los glóbulos rojos se eliminaron por medio de una exposición breve (20 segundos) en agua destilada. Las células fueron sembradas a una densidad de 1 x 10^5 células/posillo en placas de 4 posillos (Nunc), en 500 µl de DMEM:F12 (1:1) suplementado con bicarbonato de sodio, 10% de FBS y gentamicina. Las células fueron

cultivadas a 38,5℃ en atmósfera húmeda con 5% de CO_2. A las 24 hs el medio de cultivo fue renovado totalmente para eliminar las células no adheridas, y el cultivo fue incubado por 48 hs.

2.4.3. Co-cultivo con ovocitos

Todos los cultivos celulares mencionados anteriormente alcanzaron confluencia entre 12 y 24 hs antes del experimento. El medio de cultivo fue renovado totalmente 12 hs antes del experimento. Una hora antes del comienzo de co-cultivo se agregaron a cada posillo 500 µl de TCM199 suplementado con bicarbonato de sodio, glucosa (2,15 mg/ml), piruvato de sodio (55 µg/ml), 5% de FBS y gentamicina. Por lo tanto, el medio para el co-cultivo consistió en 50% DMEM:F12 (1:1) suplementado con bicarbonato de sodio, 5% FBS, y gentamicina, condicionado durante 12 hs por cultivos confluentes de células BGC-1, Swiss 3T3, fibroblastos fetales bovinos, o cultivos primarios de células de la granulosa bovinas, y 50% de medio fresco TCM199 suplementado con bicarbonato de sodio, glucosa, piruvato de sodio, 5% FBS y gentamicina.

2.4.4. Obtención y maduración in vitro de ovocitos bovinos

Los ovocitos fueron obtenidos a partir de ovarios bovinos provenientes de animales sacrificados para consumo en un frigorífico cercano (Frigorífico Rioplatense, Gral. Pacheco, Buenos Aires). Los ovarios recién extraídos se transportaron hasta el laboratorio en un termo con solución fisiológica a 30℃ y fuero n procesados en un lapso menor a dos horas.

Los complejos cumulus-ovocito (COC) fueron obtenidos por punción de folículos antrales de 2 a 8 mm de diámetro, utilizando jeringas de 5 ml con agujas 18G. Se seleccionaron solamente ovocitos con citoplasma homogéneo, rodeados por 3 o mas capas de células del cumulus no expandidas. Luego se lavaron en medio de maduración e inmediatamente se transfirieron los posillos de maduración. Para algunos experimentos, los ovocitos fueron denudados completamente de células de cumulus mediante la aspiración y

expulsión repetida de los COC a través de una pipeta de vidrio de diámetro levemente inferior al de los ovocitos.

Los COC y los ovocitos denudados (DO) fueron madurados en grupos de 30 a 40 por posillo, en placas de 4 posillos (Nunc), en 1 ml de medio de maduración fresco sin células (Grupo Control), o sobre monocapas de células de la granulosa bovinas (Granulosa), células BGC-1, células Swiss 3T3, o fibroblastos fetales bovinos, o en medio condicionado por 36 hs por células BGC-1 (BGC-1 MC). FSH ovina (oFSH; NIDDK-oFSH-20; NIH; 20 ng/ml) y EGF humano recombinante (rhEGF; 10ng/ml) fueron agregados al medio de maduración donde se indica. La maduración *in vitro* se realizó durante 20 hs, a 38,5℃ en atmósfera húmeda con 5% de CO_2.

2.4.5. Evaluación de la maduración meiótica

Al finalizar el periodo de maduración los COC fueron denudados completamente de células de cumulus en buffer fosfato salino (PBS) conteniendo 0,2% de hialuronidasa. Los ovocitos fueron lavados en PBS, fijados en formaldehído 3,7% por 20 minutos y permeabilizados con triton X-100 0,1% por 20 min. El ADN fue teñido con Hoechst 33342 (1 µg/ml PBS) por 20 minutos y los ovocitos fueron montados en portaobjetos con glicerol:PBS (1:1).

La maduración nuclear fue evaluada con un microscopio de epifluorescencia. Los ovocitos con cromatina difusa o levemente condensada fueron clasificados como en estadio de vesícula germinal (GV). Los ovocitos con cromatina condensada formando una red (prometafase), o con una metafase sin cuerpo polar fueron clasificados como estadio metafase I (MI). Los ovocitos con una metafase y un cuerpo polar, o con dos puntos de cromatina condensada fueron clasificados en estadio metafase II (MII) (Izadyar et al, 1997). Ovocitos en estadios anafase I (dos grupos de cromosomas separándose), o telofase I (dos grupos de cromosomas separados formando dos placas metafásicas) fueron observados en bajo porcentaje en todos los grupos experimentales. Como esto se debe a que después del estadio metafase I la separación de los cromosomas homólogos y la extrusión del cuerpo polar ocurren rápidamente (Suss et al, 1988), los ovocitos en

anafase I o telofase I fueron clasificados como MII para simplificar la interpretación de los gráficos. Los ovocitos con una configuración anormal de cromatina o sin cromatina fueron observados en baja proporción (5%) en todos los grupos experimentales. Estos ovocitos fueron considerados anormales o degenerados y no fueron incluidos en la evaluación.

2.4.6. Evaluación de la expansión del cumulus.

Los COC fueron fotografiados al inicio y al final del periodo de maduración. Comparando ambas fotografías, la expansión de cada COC fue evaluada subjetivamente de acuerdo a la siguiente escala: 1, sin o muy leve expansión; 2, expansión moderada; 3, máxima expansión (Calder et al, 2001). Luego se calculó un índice de expansión de cumulus (CEI), promediando el valor de expansión de todos los COC dentro de cada grupo experimental (Fagbohun and Downs, 1990).

2.4.7. Análisis estadístico

Los datos fueron presentados como la media de tres o más experimentos independientes. La variación entre experimentos se ilustró usando el error estándar de la media (ES).

Para la evaluación de las diferencias en la maduración meiótica entre los tratamientos los datos de tres o mas repeticiones fueron sometidos a un análisis de homogeneidad y luego fueron agrupados y analizados mediante el test Chi-cuadrado. Los datos de expansión de cumulus fueron comparados mediante el test Kruskal-Wallis y el test Dunn de comparaciones múltiples. Diferencias de $p<0,05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

2.5. Resultados

2.5.1. Efecto del co-cultivo de COC con células BGC-1 o con cultivos primarios de células de la granulosa bovinas sobre la maduración nuclear de los COC.

Los ovocitos bovinos de folículos antrales de 2 a 8 mm de diámetro se encuentran arrestados en el estadio GV. Cuando los COC son aislados del ambiente folicular la meiosis se reinicia espontáneamente. Aproximadamente el 50% de los COC sufre la ruptura de la vesícula germinal a las 6 h, llega al estadio MI a las 9 h y alcanza el estadio MII a las 18hs de cultivo *in vitro* (Sirard et al, 1989)

El efecto del co-cultivo sobre la cinética de la maduración nuclear fue evaluado a las 20 hs de cultivo ya que es un punto intermedio entre las 15 hs y las 24 hs, donde se observan un 10% y un 90 % respectivamente de COC en estadio MII (Sirard et al, 1989). Así, la observación del estadio nuclear a las 20 hs tiene mayor sensibilidad para detectar variaciones en la cinética de maduración.

Después de un período de 20 hs de cultivo *in vitro* en condiciones control la mayoría de los COC reinició la meiosis ya que solamente el 9% permaneció en estadio GV, mientras que el 59% alcanzó el estadio MII (Figura 2.1).

Por otro lado, el co-cultivo con células de la granulosa bovinas inhibió parcialmente el reinicio de la meiosis ya que el 47% de los COC permaneció en estadio de GV mientras que solamente el 23% alcanzó el estadio de MII después de las 20 hs de cultivo. (Figura 2.1).

Sin embargo, cuando los COC fueron co-cultivados con células BGC-1, una proporción aún mayor permaneció arrestada en estadio de GV (84%) mientras que ninguno alcanzó el estadio MII (Figura 2.1). La inhibición del reinicio de la meiosis por las células BGC-1 fue significativamente mayor que la producida por cultivos primarios de células de la granulosa bovinas.

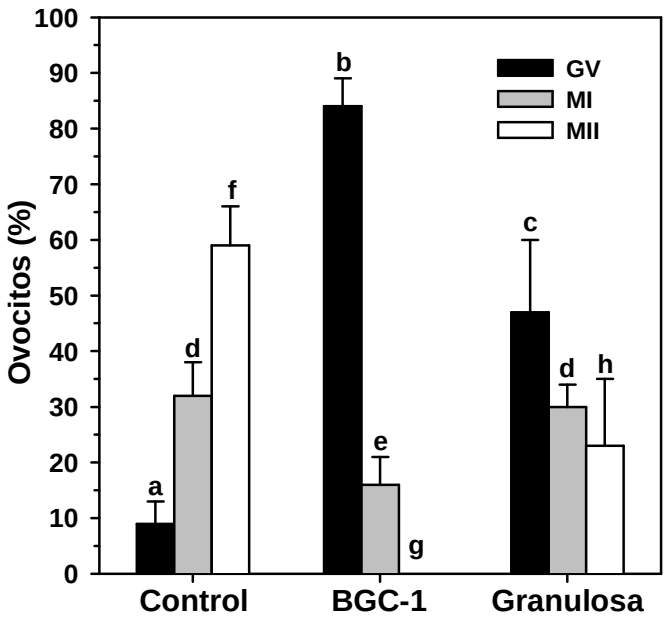

Figura 2.1
Maduración meiótica de COC co-cultivados con células BGC-1 o con cultivos primarios de células de la granulosa bovinas.
Los COC fueron cultivados por 20 hs en condiciones control (Control), o co-cultivados con células BGC-1 (BGC-1) o con cultivos primarios de células de la granulosa bovinas (Granulosa). Después de 20 hs de cultivo se evaluó la progresión de la meiosis y los COC fueron clasificados según el estadio en GV, MI, o MII. Los datos son presentados como la media ± ES de cuatro experimentos independientes. El número total de ovocitos evaluados en cada grupo experimental varió entre 145 y 155. Para cada estadio meiótico, las barras sin letras en común son significativamente diferentes ($p<0.05$).

2.5.2. Efecto del co-cultivo de COC con células BGC-1 o con cultivos primarios de células de la granulosa bovinas sobre la expansión del cumulus de los COC.

La maduración nuclear *in vivo* esta asociada a la expansión del cumulus y a la pérdida de conexión entre las células del cumulus y el ovocito. El reinicio espontáneo de la meiosis *in vitro* puede ocurrir sin que se observe expansión del cumulus. Por el contrario, la expansión del cumulus implica la pérdida de la integridad de las uniones comunicantes necesarias para el mantenimiento del arresto meiótico, por lo que es un indicador del reinicio de la meiosis.

Como se muestra en la Tabla 2.1, una moderada expansión del cumulus fue observada en los COC cultivados en condiciones control. Por otro lado, el co-cultivo de COC con células de la granulosa inhibió la expansión del cumulus en el 51% de los COC, mientras que la mayoría (95%) de los COC co-cultivados con células BGC-1 no mostraron signos de expansión después de 20 hs de cultivo.

Tratamiento	n[a]	Grado de expansión			CEI[b]
		1	2	3	
Control	158	20 (13)	126 (80)	12 (7)	1.95 ± 0.03[c]
BGC-1	153	146 (95)	7 (5)	0 (0)	1.05 ± 0.03[d]
Granulosa	158	80 (51)	76 (48)	2 (1)	1.50 ± 0.17[e]

Tabla 2.1
Expansión del cumulus de COC co-cultivados con células BGC-1 o con cultivos primarios de células de la granulosa bovinas (n [%]).
[a] Número total de COC analizados en cuatro experimentos independientes. [b] Indice de expansión del cumulus (media ± ES de cuatro experimentos independientes). [c,d,e] Los valores sin letras en común son significativamente diferentes ($p<0.05$).

2.5.3 Especificidad del tipo celular

Para analizar si el efecto inhibitorio sobre el reinicio de la meiosis resultaba ser específico del tipo celular, se analizó el efecto del co-cultivo sobre distintos tipos celulares. El co-cultivo de COC con fibroblastos fetales bovinos, o con células Swiss 3T3 no afectó significativamente el reinicio de la meiosis o su progresión hasta MII (Figura 2.2).

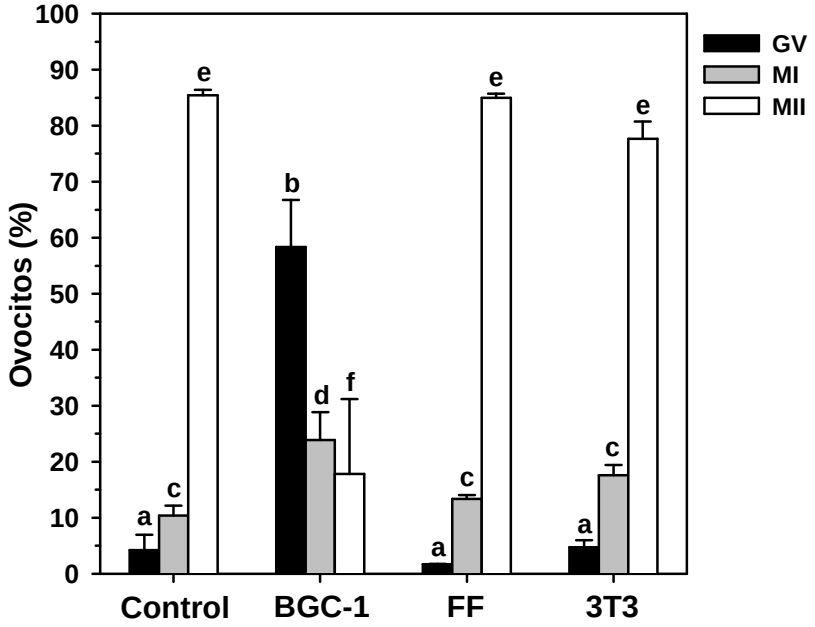

Figura 2.2
Maduración meiótica de COC co-cultivados con células BGC-1, fibroblastos fetales bovinos (FF) o con células Swiss 3T3.
Los COC fueron cultivados por 20 hs en condiciones control (Control), o co-cultivados con células BGC-1 (BGC-1), con fibroblastos fetales bovinos (FF) o con células Swiss 3T3. Después de 20 hs de cultivo se evaluó la progresión de la meiosis y los COC fueron clasificados según el estadio en GV, MI, o MII. Los datos son presentados como la media ± ES de tres experimentos independientes. El número total de ovocitos evaluados en cada grupo experimental varió entre 110 y 120. Para cada estadio meiótico, las barras sin letras en común son significativamente diferentes ($p<0.05$).

2.5.4 Efecto de FSH sobre la acción del co-cultivo

Los COC aislados del ambiente folicular y cultivados *in vitro* reinician la meiosis espontáneamente. Cuando este reinicio es prevenido por agentes inhibitorios, como análogos de AMPc, inhibidores de fosfodiesterasas y purinas, o por el co-cultivo con componentes foliculares, el reinicio de la meiosis puede ser inducido por gonadotrofinas (Downs et al, 1988; Downs, 1993; Richard et al, 1997; Van Tol et al, 1996).

Dado que el co-cultivo con células BGC-1 previene el reinicio espontáneo de la meiosis en la mayoría de los COC, se analizó si bajo estas condiciones inhibitorias la maduración nuclear podría ser inducida por FSH.

Con este objetivo se co-cultivaron COC con células BGC-1, con o sin el agregado de FSH. Se observó que FSH produjo una estimulación del reinicio de la meiosis tanto en condiciones control como en COC co-cultivados con células BGC-1. Sin embargo, aún en presencia de FSH, el efecto inhibitorio de las células BGC-1 fue evidente en comparación con el grupo control (Figura 2.3, A).

El agregado de FSH también estimuló la expansión completa del cumulus bajo condiciones control, y una expansión moderada de los COC co-cultivados con células BGC (Tabla 2.2).

2.5.5 Efecto de EGF sobre la acción del co-cultivo

Dado que EGF es capaz de inducir el reinicio de la meiosis en ovocitos cultivados dentro de folículos (Conti et al, 2006; Smitz et al, 1998), se analizó si también era capaz de hacerlo en COC mantenidos en arresto meiótico durante el co-cultivo con células BGC-1. Con este objetivo se co-cultivaron COC con células BGC-1, con o sin el agregado de EGF.

Como se muestra en la Figura 2.3 (B), el agregado de EGF estimuló el reinicio de la meiosis tanto en condiciones control como en COC co-cultivados con células BGC-1. El efecto sobre el reinicio de la meiosis fue similar al de FSH, aunque de menor magnitud. Por otro lado, a diferencia de FSH, EGF no estimuló significativamente el pasaje del estadio MI al estadio MII tanto en condiciones control como en el co-cultivo con células BGC.

Al igual que FSH, EGF estimuló la expansión completa del cumulus de los COC cultivados en condiciones control, y una expansión moderada en los COC co-cultivados con células BGC-1 (Tabla 2.2).

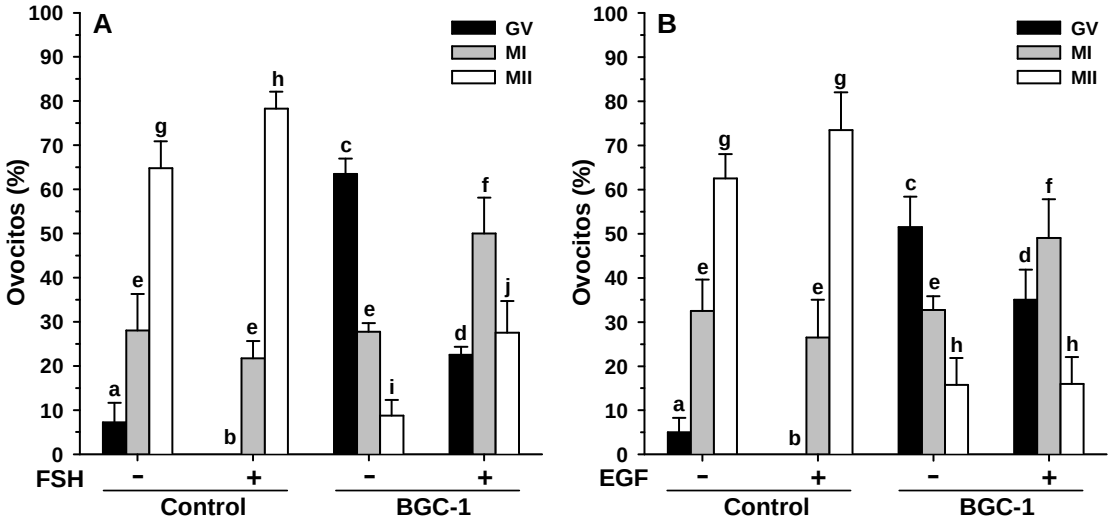

Figura 2.3
Maduración meiótica inducida por hormonas en COC co-cultivados con células BGC-1.
Los COC fueron cultivados solos (Control) o co-cultivados con células BGC-1 (BGC-1); con o sin el agregado de FSH (20ng/ml) (Panel A); con o sin el agregado de EGF (10ng/ml) (Panel B). Después de 20 hs de cultivo se evaluó la progresión de la meiosis y los COC fueron clasificados según el estadio en GV, MI, o MII. Los datos son presentados como la media ± ES de cuatro experimentos independientes. El número total de ovocitos evaluados en cada grupo experimental varió entre 100 y 120. Para cada estadio meiótico, las barras sin letras en común son significativamente diferentes ($p<0.05$).

Tratamiento	n[a]	Grado de expansión			CEI[b]
		1	2	3	
Control	104	25 (24)	73 (70)	6 (6)	1.81 ± 0.08[c]
Control + FSH	112	0 (0)	2 (2)	110 (98)	2.98 ± 0.01[d]
BGC-1	112	107 (96)	5 (4)	0 (0)	1.04 ± 0.03[e]
BGC-1 + FSH	107	6 (6)	75 (70)	26 (24)	2.18 ± 0.09[f]
Control	71	20 (28)	50 (71)	1 (1)	1.73 ± 0.08[c]
Control + EGF	70	3 (4)	19 (27)	48 (69)	2.64 ± 0.15[d]
BGC-1	74	73 (99)	1 (1)	0 (0)	1.01 ± 0.01[e]
BGC-1 + EGF	72	16 (22)	38 (53)	18 (25)	1.98 ± 0.23[c]

Tabla 2.2
Efecto de FSH y EGF sobre la expansión del cumulus de COC co-cultivados con células BGC-1 (n [%]).
[a] Número total de COC analizados en tres experimentos independientes. [b] Indice de expansión del cumulus (media ± ES de tres experimentos independientes). [c,d,e,f] Los valores sin letras en común son significativamente diferentes ($p<0.05$).

2.5.6 Efecto del medio condicionado por células BGC-1

Con el objetivo de analizar si la acción inhibitoria las células BGC-1 era producida a través de factores solubles se ensayó el efecto de medio condicionado por células BGC-1 (MC BGC-1) sobre el reinicio de la meiosis de los COC. En la Figura 2.4 se puede observar que el medio condicionado inhibió el reinicio de la meiosis en una proporción significativa de COC. Sin embargo esta proporción fue menor en comparación con la inhibición producida por el co-cultivo con células BGC-1.

La expansión del cumulus también fue inhibida por el MC BGC-1 aunque, al igual que la meiosis, el grado de inhibición fue menor en comparación con la producida por el co-cultivo con células BGC-1 (Tabla 2.3).

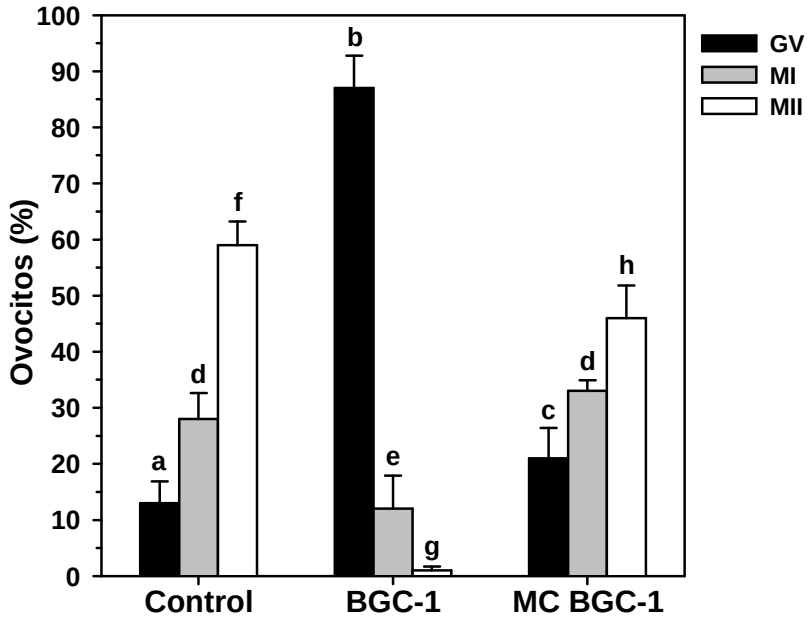

Figura 2.4
Efecto de medio condicionado por células BGC-1 sobre la progresión de la meiosis.
Los COC fueron cultivados en condiciones control (Control), co-cultivados con células BGC-1 (BGC-1) o cultivados en medio condicionado por células BGC-1 (MC BGC-1).
Después de 20 hs de cultivo se evaluó la progresión de la meiosis y los COC fueron clasificados según el estadio en GV, MI, o MII. Los datos son presentados como la media ± ES de seis experimentos independientes. El número total de ovocitos evaluados en cada grupo experimental varió entre 165 y 195. Para cada estadio meiótico, las barras sin letras en común son significativamente diferentes ($p<0.05$).

Tratamiento	n[a]	Grado de expansión			CEI[b]
		1	2	3	
Control	123	16 (13)	99 (80)	8 (7)	1.94 ± 0.04[c]
BGC-1	120	115 (96)	5 (4)	0 (0)	1.04 ± 0.02[d]
MC BGC-1	123	52 (42)	68 (55)	3 (3)	1.61 ± 0.10[e]

Tabla 2.3
Efecto del medio condicionado por células BGC-1 sobre la expansión del cumulus (n [%]).
[a] Número total de COC analizados en tres experimentos independientes. [b] Indice de expansión del cumulus (media ± ES de tres experimentos independientes). [c,d,e] Los valores sin letras en común son significativamente diferentes ($p<0.05$).

2.5.7. Efecto de las células BGC-1 co-cultivadas sin contacto directo con los COC.

El reducido efecto inhibitorio del medio condicionado por células BGC-1 observado en comparación con el producido por el co-cultivo con células BGC-1 sugiere que el efecto podría ser mediado por factores solubles de naturaleza lábil, o que sería ejercido a través del contacto directo entre las células BGC-1 y las células del cumulus de los COC. Existen reportes que indican que el arresto meiótico puede ser mantenido por medio condicionado por células foliculares (Van Tol and Bevers, 1998b), mientras que otros reportes señalan que el contacto directo entre las células del cumulus y las células foliculares sería imprescindible para el mantenimiento del arresto meiótico (Aktas et al, 2003; Sirard and Bilodeau, 1990b).

Para determinar si el contacto directo entre las células BGC-1 y las células del cumulus es necesario para la inhibición del reinicio de la meiosis, los COC fueron cultivados sobre una membrana que separó la monocapa de células BGC-1 de los COC, evitando el contacto directo entre células. Se utilizó una membrana de 125 µm de espesor y con poros de 0.22 µm (Figura 2.5).

Como se puede observar en la Figura 2.6, la ausencia de contacto directo entre las células BGC-1 y las células del cumulus de los COC no afectó el mantenimiento del arresto meiótico. Sin embargo, cuando la separación entre los COC y las células fue de 2 mm el efecto inhibitorio de las células BGC-1 fue reducido significativamente (Figura 2.6).

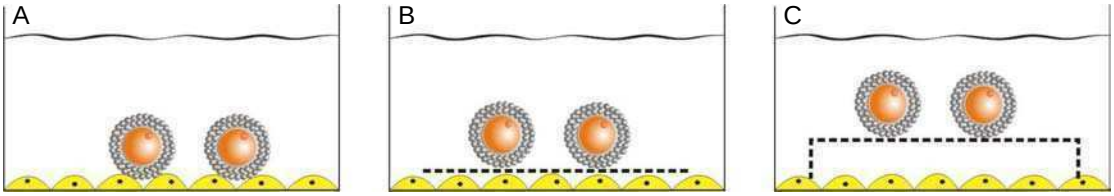

Figura 2.5
Ilustración del co-cultivo de COC con células BGC-1 en contacto directo (A), separados por una membrana de 125 µm de espesor con poros de 0.22 µm (B), o separadas 2mm mediante el plegado de los bordes de la misma membrana (C).

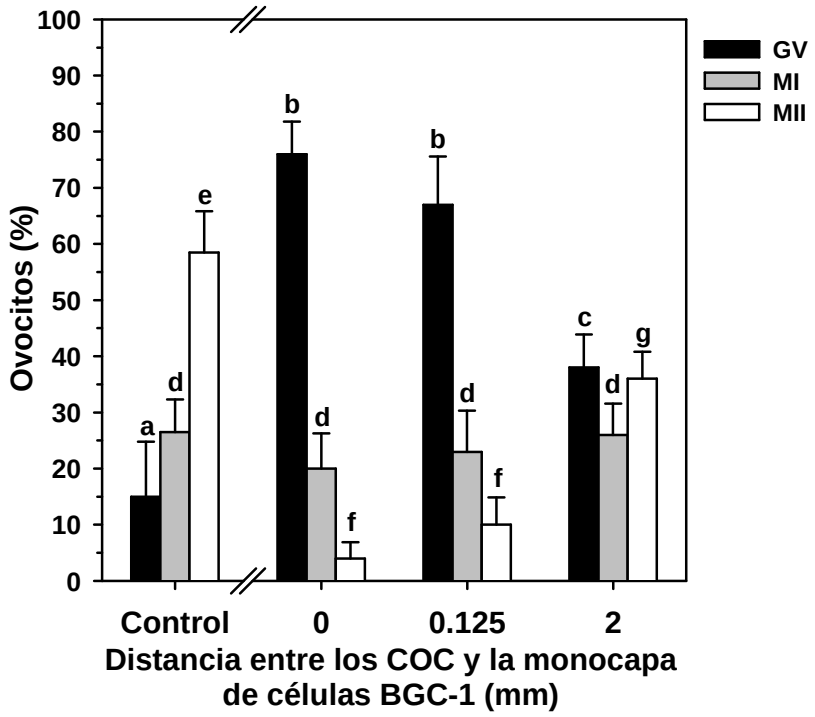

Figura 2.6
Inhibición de reinicio de la meiosis en COC co-cultivados en contacto o en ausencia de contacto con células BGC-1
Los COC fueron cultivados en contacto con células BGC-1 (0 mm); sin contacto con las células BGC-1, separadas por una membrana de 125 µm de espesor (0.125 mm); o separadas 2 mm mediante el plegado de los bordes de la membrana (2 mm). Un grupo adicional fue de COC fue cultivado en condiciones control (Control). Después de 20 hs de cultivo se evaluó la progresión de la meiosis y los COC fueron clasificados según el estadio en GV, MI, o MII. Los datos son presentados como la media ± ES de seis experimentos independientes. El número total de ovocitos evaluados en cada grupo experimental varió entre 170 y 180. Para cada estadio meiótico, las barras sin letras en común son significativamente diferentes ($p<0.05$).

2.5.8. Efecto del co-cultivo de células BGC-1 con ovocitos denudados de células del cumulus.

El rol de las células del cumulus en el mantenimiento del arresto meiótico fue evaluado co-cultivando células BGC-1 con ovocitos previamente denudados de células de cumulus (DO). Los ovocitos fueron denudados dentro del posillo de maduración por lo que las células del cumulus estuvieron presentes durante la MIV (Figura 2.8). Cuando fueron cultivados en condiciones control, las tasas reinicio de meiosis y MII fueron mayores en DO que en COC (Figura 2.7). El efecto inhibitorio de las células BGC-1 sobre los DO fue

drásticamente reducido ya que el 85% de estos reinició la meiosis (Figura 2.7). Esto significa las células BGC-1 no son capaces de inhibir efectivamente el reinicio de la meiosis cuando las uniones comunicantes entre las células del cumulus y los ovocitos son interrumpidas. Por otro lado, después de 20 hs de co-cultivo la mayor parte de los DO fue encontrado en estadio MI, mientras que solamente un 21% alcanzó el estadio MII (Figura 2.7). Esto indica que a pesar de que el reinicio de la meiosis fue pobremente inhibida en DO, el pasaje de MI a MII fue notablemente afectado por el co-cultivo con células BGC-1.

Los cumulus de los DO cultivados en condiciones control mostraron una expansión moderada (Figura 2.8, C), mientras que los cumulus de los DO co-cultivados con células BGC-1 no mostraron signos de expansión (Figura 2.8, D). Esto significa que las células BGC-1 son capaces de inhibir la expansión del cumulus, pero no el reinicio de la meiosis, cuando las células del cumulus están separadas de los ovocitos.

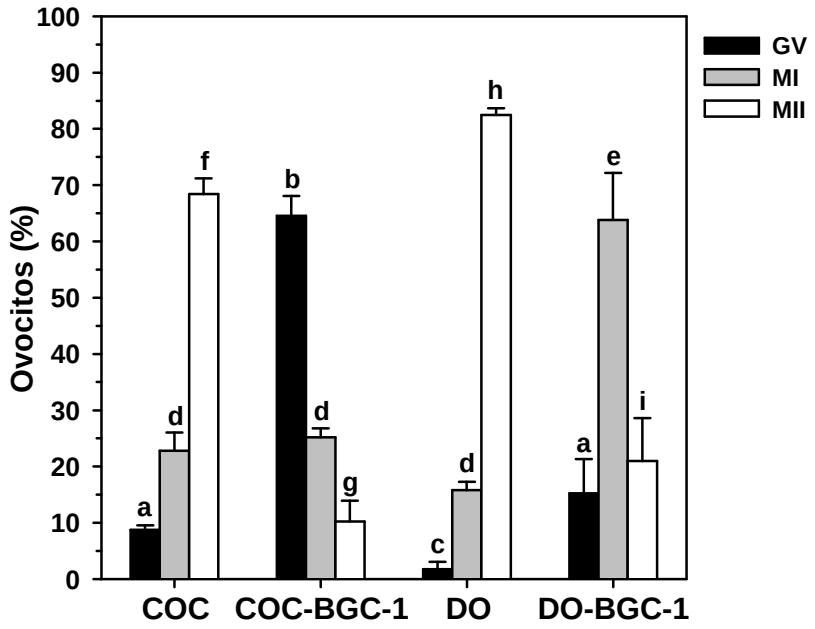

Figura 2.7
Co-cultivo de DO con células BGC-1 en presencia de células del cumulus.
Los DO fueron cultivados en presencia de células del cumulus en condiciones control (DO) o en co-cultivo con células BGC-1 (DO BGC-1). Grupos adicionales de COC fueron cultivados en condiciones control (COC), o co-cultivdos con células BGC-1 (COC BGC-1). Después de 20 hs de cultivo se evaluó la progresión de la meiosis y los DO y los COC fueron clasificados según el estadio en GV, MI, o MII. Los datos son presentados como la media ± ES de cinco experimentos independientes. El número total de ovocitos evaluados en cada grupo experimental varió entre 105 y 125. Para cada estadio meiótico, las barras sin letras en común son significativamente diferentes ($p<0.05$).

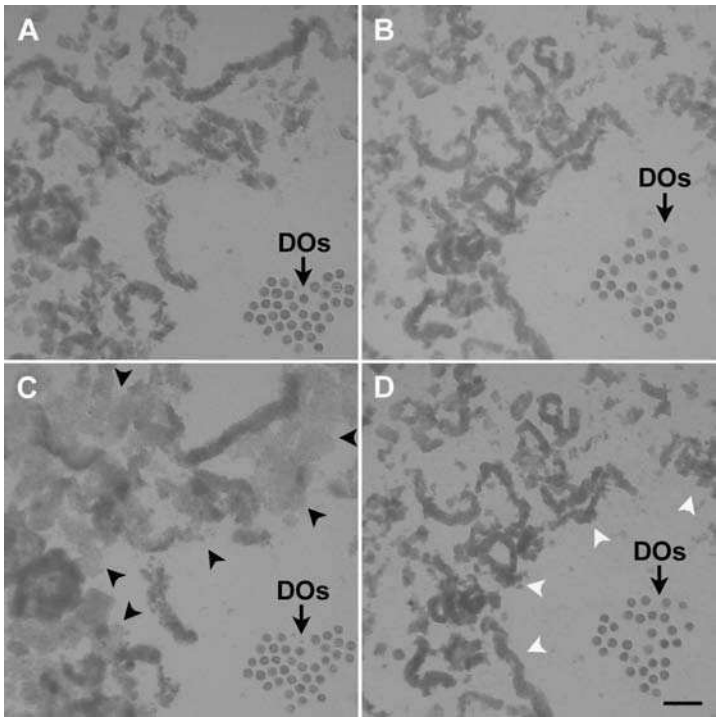

Figura 2.8
Efecto de las células BGC-1 sobre la expansión de los cumulus aislados de los DO.
Los DO y los cumulus aislados a partir de ellos fueron co-cultivados con células BGC-1 y fueron fotografiados al inicio (B) y al final (D) de las 20hs de MIV. Un grupo control de DO y cumulus cultivados en condiciones control también fue fotografiado al inicio (A) y al final (C) de las 20 hs de MIV. Estas fotografías son representativas de cinco experimentos independientes que repetidamente mostraron que después de 20 hs de cultivo en condiciones control los cumulus aislados se expandieron (C, flechas negras) en comparación con la morfología observada al inicio de la MIV (A). En cambio los cumulus co-cultivados con células BGC-1 por 20 hs no mostraron signos de expansión (D, flechas blancas) en comparación con la morfología observada al inicio de la MIV (B). Escala: barra = 500 µm.

2.5.9. Reversibilidad del efecto inhibitorio de las células BGC-1 sobre el reinicio de la meiosis

Con el fin de determinar si la naturaleza del arresto meiótico inducido por las células BGC-1 era permanente o si podía ser revertido, los COC fueron co-cultivados con células BGC-1 por 20 hs, lavados y cultivados por un periodo adicional de 20 hs en condiciones control con el agregado de FSH. Después del segundo período de cultivo en condiciones control el 100% de los COC arrestados reinició la meiosis (Figura 2.9), mientras que la expansión del cumulus pudo ser completamente inducida por FSH (Tabla 2.4).

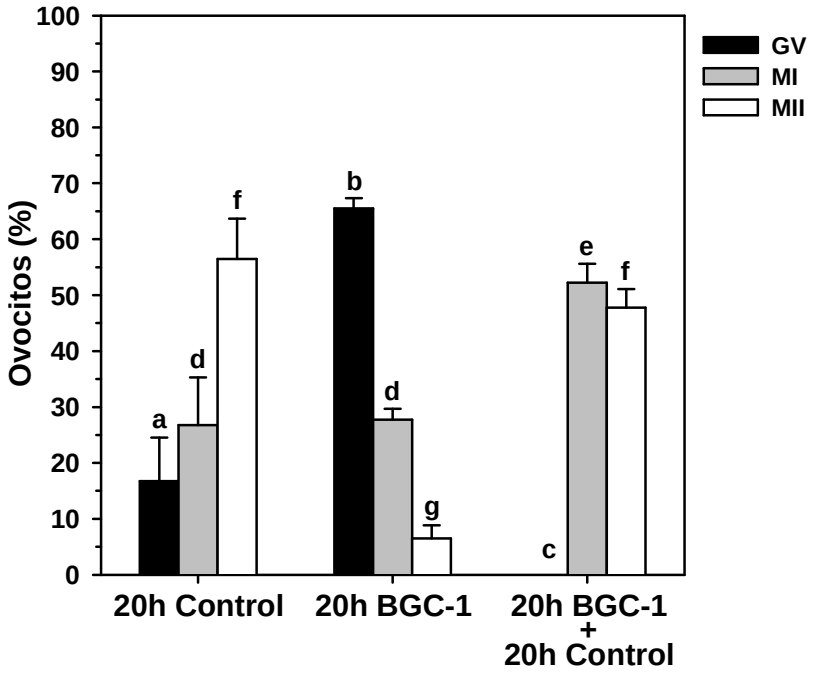

Figura 2.9
Reversibilidad del arresto meiótico inducido por células BGC-1
Los COC fueron cultivados por 20 hs en condiciones control (20h Control) o en co-cultivo con células BGC-1 (20h BGC-1). Luego, la mitad de los COC del grupo 20h BGC-1 fueron lavados y cultivados por un segundo período de 20 hs en condiciones control (20h BGC-1 + 20h Control). Al final de los respectivos periodos de maduración se evaluó la progresión de la meiosis y los COC fueron clasificados según el estadio en GV, MI, o MII. Los datos son presentados como la media ± ES de cuatro experimentos independientes. El número total de ovocitos evaluados en cada grupo experimental varió entre 105 y 110. Para cada estadio meiótico, las barras sin letras en común son significativamente diferentes ($p<0.05$).

Tratamiento	n[a]	Grado de expansión			CEI[b]
		1	2	3	
20h Control	80	15 (19)	59 (74)	6 (7)	1.89 ± 0.02[c]
20h BGC-1	84	81 (96)	3 (4)	0 (0)	1.03 ± 0.02[d]
20h BGC-1 + 20h Control	86	0 (0)	10 (12)	76 (88)	2.88 ± 0.06[e]

Tabla 2.4
Inducción de la expansión del cumulus en COC co-cultivados 20 hs con células BGC-1 y un segundo periodo de 20 hs en condiciones control con FSH (n[%]).
[a] Número total de COC analizados en tres experimentos independientes. [b] Indice de expansión del cumulus (media ± ES de tres experimentos independientes). [c,d,e] Los valores sin letras en común son significativamente diferentes ($p<0.05$).

2.6. Discusión

Trabajos previos han demostrado que el reinicio de la meiosis *in vitro* es inhibido cuando los COC son co-cultivados con mitades de paredes foliculares, explantes de células tecales, monocapas de células tecales, o con medio condicionado por células tecales (Carbonneau and Sirard, 1994; De Loos et al, 1994; Fouladi Nashta et al, 1998; Richard and Sirard, 1996a; Richard and Sirard, 1996b; Sirard and Coenen, 1993; Van Tol and Bevers, 1998b). En contraposición, los resultados reportados en cuanto a la capacidad de las células de la granulosa para inhibir el reinicio de la meiosis *in vitro* fueron variables y altamente dependientes de las condiciones de cultivo utilizadas en los diferentes estudios. Mientras que células de la granulosa recién aisladas o fragmentos de membrana granulosa tomadas de folículos por disección mantuvieron el arresto meiótico en una gran proporción de COC (Richard and Sirard, 1996b; Sirard and Bilodeau, 1990b; Van Tol et al, 1996), células de la granulosa aisladas y cultivadas en forma de monocapa por 7 días mostraron una capacidad de inhibición muy reducida (Richard and Sirard, 1996a; Sirard and Bilodeau, 1990a; Sirard and Bilodeau, 1990b). Nuestros resultados demostraron que en las condiciones de cultivo utilizadas en nuestro estudio, monocapas de células de la granulosa cultivadas por 3 días *in vitro* fueron capaces de inhibir el reinicio de la meiosis en una significativa proporción de COC (48%). Comprobamos que el efecto inhibitorio fue específico de las células de la granulosa bovinas, y no debido al sistema de cultivo, ya que otros tipos celulares como fibroblastos fetales bovinos, o células Swiss 3T3 no tuvieron ningún efecto en la maduración nuclear de los COC.

El cultivo *in vitro* modifica el metabolismo de las células de la granulosa. Ha sido demostrado que la síntesis de estradiol, una característica bioquímica clave de las células de la granulosa, depende no solo de la ubicación dentro del folículo (mural o antral) y del tamaño del folículo del cual se obtienen las células, sino también de las condiciones de cultivo *in vitro* como la concentración de oxígeno, la presencia de hormonas o suero, y la duración del cultivo (Roberts and Echternkamp, 1994; Rouillier et al, 1998). De hecho, a menos que el cultivo se realice en condiciones específicas de cultivo sin suero según ha sido reportado (Gutierrez et al, 1997), la actividad de aromatasa es dramáticamente reducida después del primer día de cultivo *in vitro*, aumentando al mismo tiempo la síntesis de progesterona, indicando que las células de la granulosa se diferencian, en

cultivo, de células productoras de estradiol a células productoras de progesterona en un proceso similar a la luteinización (Skinner and Osteen, 1988). De la misma forma, podría ser posible que las células de la granulosa pierdan la capacidad de inhibir la meiosis debido a la diferenciación durante el cultivo *in vitro*, tal como ha sido propuesto anteriormente (Richard and Sirard, 1996a). De acuerdo con esta hipótesis, en las condiciones en que realizamos los experimentos los cultivos primarios de células de la granulosa pudieron haber comenzado a diferenciarse aunque fueron capaces de inhibir el reinicio de la meiosis, parcialmente, después de tres días de cultivo *in vitro*. Estos datos son coherentes con la hipótesis de que las células de la granulosa participan en el mantenimiento del arresto meiótico de los COC dentro de los folículos antrales.

Subsecuentemente, hemos demostrado que una línea de células de la granulosa, células BGC-1, cultivada en las mismas condiciones inhibió el reinicio de la meiosis en la mayoría de los COC (84%). La línea celular BGC-1 fue obtenida en nuestro laboratorio por inmortalización espontánea de cultivos primarios de células de la granulosa bovinas obtenidas de folículos antrales de 3 a 5 mm, y ha sido bien caracterizada (Bernath et al, 1990; Lerner et al, 1995). A pesar de que ha perdido la actividad aromatasa, mantiene algunas características distintivas como la regulación hormonal de la expresión de fibronectina y del “splicing” alternativo de su ARNm, semejando células de la granulosa de folículos antrales pequeños donde la inclusión del exón ED-1 de fibronectina es alta, e inversamente relacionada con la concentración de estradiol en el fluido folicular (Colman-Lerner et al, 1999). Las células BGC-1 también muestran producción de activina-A regulada por TGF beta (Fazzini et al, 2006), lo que parecería estar involucrado en el retraso del proceso de luteinización (Knight and Glister, 2003). Además, con respecto al metabolismo de esteroides, las células BGC-1 no secretan cantidades sustanciales de progesterona y, en cambio, presentan una incrementada actividad 5-alfa reductasa que sería reminiscente del patrón de metabolismo esteroideo asociado a células de la granulosa de folículos inmaduros (Lerner et al, 1995). También han demostrado tener bajos requerimientos de factores de crecimiento ya que pueden crecer con 5% de suero de ternero neonato como único suplemento, y pueden ser estimuladas por IGF y EGF (Lerner et al, 1995). Interesantemente, también se demostró que las células BGC-1 son capaces de responder a factores no identificados, secretados por ovocitos, que estimulan la síntesis de ADN específicamente en células de la granulosa (Lanuza et al, 1998).

Todas estas características, que son representativas de células de la granulosa inmaduras, sumadas a la capacidad de inhibir el reinicio de la meiosis en COC, convierten a la línea celular BGC-1 en un modelo muy interesante para estudiar la comunicación bidireccional que existe entre las células de la granulosa y los ovocitos durante el desarrollo folicular, sin la variabilidad que presentan los cultivos primarios de células de la granulosa *in vitro*. Por lo tanto, se realizaron experimentos para caracterizar aún más este modelo, y el papel de las células de la granulosa durante la maduración meiótica de los ovocitos.

Trabajo previos han demostrado que FSH revierte la acción inhibitoria de las células de la granulosa (Van Tol et al, 1996), pero no la inducida por la pared folicular (Carbonneau and Sirard, 1994) o por células de la teca (Van Tol and Bevers, 1998b). Sin embargo, el efecto inhibitorio de las células de la granulosa puede ser potenciado por células de la teca, o por medio condicionado por células de la teca, resultando en una menor sensibilidad a la inducción del reinicio de la meiosis estimulada FSH (Kotsuji et al, 1994; Van Tol and Bevers, 1998b). El efecto inhibitorio de las células BGC-1 fue parcialmente revertido por FSH, semejando lo que se observa cuando células de la granulosa son co-cultivadas con células tecales (Van Tol and Bevers, 1998b).

EGF también estimuló el reinicio de la meiosis y la expansión del cumulus aunque no en la misma magnitud que FSH. Además, a diferencia de FSH, EGF no estimuló significativamente al pasaje de MI a MII en COC co-cultivados con células BGC-1 o en condiciones control en tanto que si lo hizo FSH. Esta diferencia de efectos entre FSH y EGF ha sido observada en algunos modelos de inducción de reinicio de meiosis en COC de ratón mantenidos en arresto meiótico por dbAMPc (Coticchio et al, 2004).

El hecho de que EGF no estimule en mayor medida el reinicio de la meiosis en COC co-cultivados con BGC-1 podría cuestionar la validez del modelo ya que hay evidencia de que EGF o factores similares a EGF serían estímulos fisiológicos que mediarían los efectos de LH sobre la maduración meiótica. Esto ha sido observado tanto en COC aislados como en COC cultivados dentro de folículos intactos *in vitro* (Conti et al, 2006). Sin embargo, el efecto de EGF no fue tan marcado cuando se probó en otro modelo de cultivo de folículos donde, a diferencia de los trabajos anteriores, los folículos fueron

obtenidos de animales no estimulados hormonalmente. En este modelo el reinicio de la meiosis puede ser inducido efectivamente por simple denudamiento de los COC (90%) o por HCG (95%), mientras que el efecto de EGF sobre el reinicio de la meiosis es muy reducido (45%) (Smitz et al, 1998). En este sentido, los trabajos anteriormente citados que demuestran que los factores similares a EGF son imprescindibles en la transmisión de la señal de LH desde la pared folicular hacia el COC no descartan en ningún momento la necesidad de otras señales ya que utilizan modelos de cultivo de folículos obtenidos de animales estimulados con PMSG (Conti et al, 2006). Estos datos remarcan la importancia de la elección del sistema de cultivo, o modelo, la cual debe ser realizada en base al objetivo del trabajo (Smitz and Cortvrindt, 2002).

La complejidad de la regulación del reinicio de la meiosis en el ovocito involucra no solo la producción de señales inhibitorias y estimulatorias por los diferentes componentes celulares del folículo, sino también los diferentes mecanismos implicados en la transmisión de esas señales entre los diferentes tipos celulares (Gilchrist et al, 2004). Mientras que algunos trabajos mostraron que el medio condicionado por células de la granulosa puede inhibir la meiosis, sugiriendo la participación de factores solubles como mediadores del efecto inhibitorio (Van Tol and Bevers, 1998b), otros indicaron que el efecto inhibitorio fue solamente evidente cuando existió contacto directo entre las células de la granulosa y las células del cumulus de los COC (Aktas et al, 2003; Sirard and Bilodeau, 1990b). Las células BGC-1 inhibieron el reinicio de la meiosis de la misma manera cuando fueron co-cultivadas tanto en contacto como en ausencia de contacto directo con las células del cumulus de los COC, indicando que el efecto inhibitorio de las células BGC-1 fue mediado por factor/es soluble/s. Sin embargo, este efecto fue reducido cuando la distancia de separación entre las células BGC-1 y los COC fue incrementada, sugiriendo que el, o los factores involucrados serían muy lábiles, o secretados en pequeñas cantidades al medio de cultivo. Cualquiera sea el caso, presumimos que se formaría un gradiente de concentración del factor activo, siendo mas concentrado en el fondo del posillo de maduración, donde está la monocapa de células BGC-1, y menos concentrado en la parte superior del posillo de maduración, donde se observó un efecto inhibitorio mas débil (Figura 3, 2 mm). De acuerdo con esta hipótesis el factor inhibidor activo estaría diluido, o mayormente degradado en el medio condicionado por células BGC-1. Cuando los COC se cultivaron en este medio condicionado, el efecto inhibitorio

fue muy leve ya que el 79% de los COC reinició la meiosis. La naturaleza lábil de los factores paracrinos involucrados en la comunicación bidireccional entre el ovocito y las células del cumulus ha sido observada por otros (Gilchrist et al, 2008).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, y de acuerdo con estudios previos (Richard and Sirard, 1996b), nuestros experimentos también remarcan la importancia de considerar las variables distancia y dilución cuando se analiza la comunicación entre células *in vitro*. Por otro lado, un factor soluble y lábil ya ha sido propuesto como el mediador del efecto inhibidor de las células tecales sobre la maduración meiótica de ovocitos (Richard and Sirard, 1996b). Una vida media corta del putativo factor soluble sería consistente con el efecto inhibitorio transitorio del fluido folicular observado sobre la maduración meiótica (Ayoub and Hunter, 1993; Sirard and Bilodeau, 1990b; Sirard and First, 1988; Tsafriri and Channing, 1975).

El papel de las células del cumulus en el mantenimiento del arresto meiótico ha sido estudiado previamente y la presencia de un cumulus intacto y no expandido que rodee completamente el ovocito ha demostrado ser imprescindible para que el reinicio de la meiosis pueda ser inhibido por células de la teca (Richard and Sirard, 1996a) o por la pared folicular (Carbonneau and Sirard, 1994). De la misma forma, las células BGC-1 fueron incapaces de inhibir el reinicio de la meiosis en ovocitos denudados (DO). Sin embargo, la progresión de la meiosis fue retrasada ya que después de 20 hs de cultivo la mayor parte de los DO fue encontrado en estadio MI mientras que una proporción menor alcanzó el estadio MII. Debido a que las células del cumulus estuvieron presentes en el posillo durante el co-cultivo, no podemos discriminar si las células BGC-1 inhibieron la progresión de la meiosis en los DO directamente, o si las células del cumulus pudieron haber mediado este efecto a través de factores parácrinos. En cambio, podemos afirmar que las células BGC-1 tuvieron un efecto directo sobre las células del cumulus ya que la expansión de los cumulus aislados fue totalmente inhibida (Figura 2.8, D).

In vivo, la maduración nuclear y la expansión del cumulus se desarrollan en forma íntimamente relacionada en respuesta al pico de LH. En realidad, ambos procesos parecen compartir los mismos pasos de diferentes vías de transducción de señales como la activación de MAPK en las células del cumulus (Su et al, 2003; Su et al, 2002). Estos

dos procesos también están correlacionados temporalmente con la desaparición de las uniones estrechas entre las células del cumulus y el ovocito (Thomas et al, 2004a). Aún no ha sido determinado fehacientemente si la causa del reinicio de la meiosis es la interrupción de la transferencia de factores inhibitorios debida a la separación de las uniones estrechas (Sela-Abramovich et al, 2005), o si existen señales adicionales que acoplan la expansión del cumulus con la maduración nuclear (Conti et al, 2006). En nuestros experimentos la inhibición de la maduración meiótica estuvo siempre asociada a una significativa inhibición de la expansión del cumulus en COC intactos. Sin embargo la ruptura de las uniones estrechas y la separación impuesta entre los DO y los cumulus permitió disociar ambos efectos durante el co-cultivo con células BGC-1. Consecuentemente el reinicio de la meiosis en DO señala la necesidad imprescindible de una comunicación muy estrecha entre los ovocitos y las células del cumulus para el mantenimiento del arresto meiótico durante el co-cultivo con células BGC-1, mientras que la concomitante inhibición de la expansión de los cumulus aislados sugiere que las células del cumulus serían el blanco primario de los factores secretados por las células BGC-1. Esta evidencia implica a las células del cumulus como mediadoras de la inhibición del reinicio de la meiosis, pareciendo ser las encargadas de transmitir la señal inhibitoria al ovocito, ya sea a través de las uniones estrechas, o a través de factores paracrinos/yuxtacrinos. A pesar de que ambos mecanismos parecieran estar implicados en la regulación del arresto meiótico en diferentes especies (Conti et al, 2002; Hinckley et al, 2005; Kalinowski et al, 2004; Mehlmann et al, 2004; Thomas et al, 2004b), la relevancia de cada uno aún es controvertida (Freudzon et al, 2005).

Por último, se demostró que el efecto inhibitorio de las células BGC-1 sobre los COC durante el co-cultivo puede ser revertido cuando los COC son retirados del ambiente inhibitorio y cultivados por un segundo período de 20 hs en condiciones control con el agregado de FSH. En estas condiciones, todos los COC mantenidos en estadio de GV durante el co-cultivo con células BGC-1 mostraron reinicio de la meiosis y expansión del cumulus luego de un segundo período de cultivo en condiciones control.

Nuestros resultados demuestran que las células BGC-1 son capaces de inhibir el reinicio de la meiosis y la expansión del cumulus en COC intactos, mostrando una mayor potencia en comparación con cultivos primarios de células de la granulosa bovina. Los efectos

inhibitorios de las células BGC-1 fueron reversibles y mediados por factor/es solubles, que podrían ser lábiles y/o secretados en pequeñas cantidades. También fue demostrado que las células del cumulus están involucradas en el mantenimiento del arresto meiótico, como posibles mediadoras del efecto inhibitorio de las células BGC-1 sobre el ovocito.

No hemos encontrado reportes en la literatura sobre líneas celulares capaces de inhibir el reinicio de la meiosis, y por lo tanto la línea celular BGC-1 representa un nuevo abordaje para el estudio del mecanismo de mantenimiento del arresto meiótico. Esto es particularmente importante ya que a pesar de la gran cantidad de estudios realizados con cultivos primarios de células de la granulosa, el o los factores responsables del mantenimiento del arresto meiótico siguen siendo desconocidos.

Sumado a las características previamente demostradas, los resultados presentados aquí refuerzan la relevancia de las células BGC-1 como modelo para el estudio de la regulación de la función de las células de la granulosa y de la regulación bidireccional entre estas células y el ovocito durante el desarrollo folicular.

3. Módulo II

Efecto de los catecolestrógenos sobre la maduración in vitro de ovocitos bovinos

3.1. Resumen

Los catecolestrógenos son metabolitos endógenos del estradiol que han demostrado modular la función de las células de la granulosa, tecales y luteales en varias especies. Nuestro objetivo fue determinar el posible rol de estos esteroides durante la maduración de los ovocitos. Los COC fueron madurados por 24 hs, fecundados y cultivados por 8 días. Mientras que el estradiol no produjo efectos, el agregado de catecolestrógenos (2-hidroxiestradiol, 4-hidroxiestradiol, y 2-metoxiestradiol) al medio de maduración no afectó la tasa de clivaje pero produjo una reducción en el porcentaje de blastocistos al día 8 de cultivo. Aunque el 2-metoxiestradiol (2-MOE2) también inhibió el desarrollo de blastocistos cuando fue agregado durante el cultivo, el efecto fue de menor magnitud que cuando fue agregado durante la maduración de los ovocitos. En concordancia con la capacidad del 2-MOE2 de unirse a la tubulina en el sitio de unión a colchicina, en ovocitos expuestos a 2-MOE2 durante la maduración se observaron marcadas alteraciones en el huso meiótico que causaron anomalías cromosómicas posteriores a la fecundación que llevaron a la inhibición del desarrollo embrionario temprano en el estadio de mórula. Además, cuando el reinicio de la meiosis es retrasada por 24 hs con roscovitina, el agregado de 2-MOE2 no tiene efecto sobre el desarrollo embrionario temprano, lo que es consistente con que la causa de la inhibición del desarrollo embrionario temprano es una alteración en la maduración nuclear del ovocito. Debido a que el 2-MOE2 puede incrementarse en el fluido folicular en respuesta a ligandos del AHR, nuestros resultados demuestran que niveles intraováricos anormalmente altos podrían estar involucradas en los síndromes de infertilidad asociados a algunos contaminantes ambientales que son conocidos activadores de AHR.

3.2. Introducción

Para que el ovocito adquiera la capacidad de ser fecundado e iniciar el desarrollo embrionario temprano se requiere una estrecha coordinación entre la proliferación y diferenciación de las células foliculares y el crecimiento y la maduración del ovocito. Entre los factores que modulan el desarrollo folicular han sido identificados varias hormonas pituitarias así como también factores paracrinos y autocrinos producidos por las células foliculares y por el ovocito (Lanuza et al, 1998).

Los catecolestrógenos, metabolitos endógenos del estradiol, han sido propuestos como factores paracrinos intraováricos (Figura 3.1). Se ha demostrado que modulan la diferenciación y proliferación de las células de la granulosa, tecales y luteales de varias especies (Shang et al, 2001; Spicer and Hammond, 1989; Tekpetey and Armstrong, 1994). Si embargo no hay reportes de efectos de catecolestrógenos en el ovario bovino. Las dos hidroxilasas que transforman estradiol en 2-hidroxiestradiol (2-OHE2) y 4-hidroxiestradiol (4-OHE2), CYP1A1 y CYP1B1 respectivamente, así como también el receptor de aril hidrocarburos (AHR), que las regula a nivel transcripcional, han sido identificadas en el ovario (Robles et al, 2000; Spicer and Hammond, 1989). El AHR no tiene ligando endógeno conocido pero puede ser activado por contaminantes ambientales (Denison et al, 2002). Otra enzima, la catecol-O-metil transferasa (COMT) que convierte el 2-OHE2 en 2-metoxiestradiol (2-MOE2), también es expresada en el folículo ovárico (Spicer and Hammond, 1989). Finalmente cantidades sustanciales de catecolestrógenos han sido cuantificados por cromatografía de gas / espectrometría de masa en fluido folicular humano y equino (Dehennin et al, 1984; Silberzahn et al, 1985).

Ha sido demostrado que tanto 2-OHE2 como 4-OHE2 imitan o modulan los efectos del estradiol (Dubey et al, 2001). Sin embargo, estos efectos no son mediados por el receptor de estrógenos clásico y el mecanismo de acción de los catecolestrógenos no es claro. Con respecto al 2-MOE2, es conocido que inhibe el crecimiento de células tumorales y la angiogénesis, y dos posibles mecanismos han sido propuestos para explicar estos efectos: inhibición de la enzima superóxido dismutasa que llevaría al consecuente incremento intracelular de radicales libres y a la apoptosis (Huang et al, 2000), y la inhibición de la polimerización de la tubulina mediante la interacción en el sitio de unión a colchicina (D'Amato et al, 1994; Klauber et al, 1997).

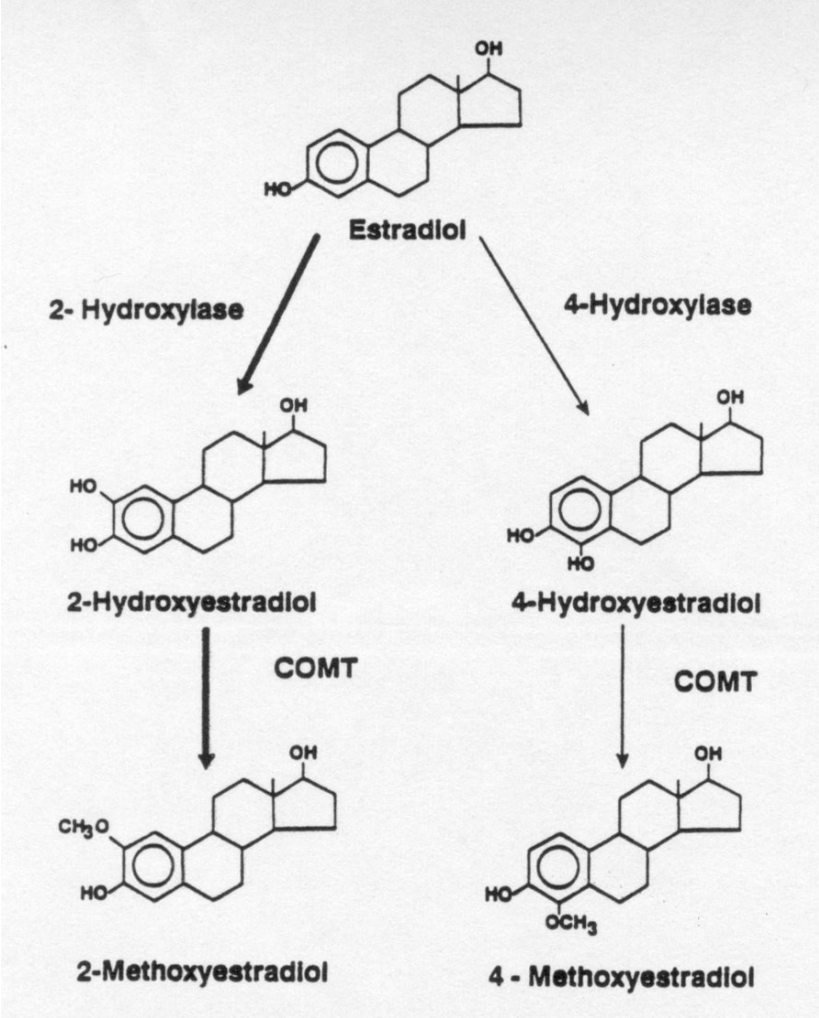

Figura 3.1

Transformación de estradiol en catecolestrógenos

3.3. Objetivos

Debido a que son metabolitos endógenos del estradiol y que se encuentran presentes en el fluido folicular, el objetivo de este trabajo fue determinar los posibles efectos y el mecanismo de acción de los catecolestrógenos durante la maduración de los ovocitos y el desarrollo embrionario temprano.

3.4. Materiales y métodos

3.4.1. Reactivos

La FSH ovina se obtuvo del National Hormone and Pituitary Program. Los catecolestrógenos 2-hidroxiestradiol, 4-hidroxiestradiol, y 2-metoxiestradiol fueron provistos por Steraloids, INC (Newport, USA). El resto de los reactivos fueron provistos por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), excepto donde se especifica lo contrario.

3.4.2. Obtención y maduración in vitro de ovocitos bovinos

Los ovocitos fueron obtenidos a partir de ovarios bovinos provenientes de animales sacrificados para consumo, que fueron donados por un frigorífico cercano (Frigorífico Rioplatense, Gral. Pacheco, Buenos Aires). Los ovarios se transportaron hasta el laboratorio en un termo con solución fisiológica a 30-35℃ y fueron procesados en un lapso menor a cuatro horas.

Los complejos cumulus-ovocito (COC) inmaduros fueron obtenidos por punción de folículos antrales de 2 a 8 mm de diámetro, utilizando jeringas de 5 cc y agujas 18G. El material colectado se dejó decantar 5 minutos en tubos cónicos de 50 ml. Luego se tomó 1 ml del material decantado y se lo colocó en una placa de 100 mm de diámetro, donde se realizó la selección y recolección de los ovocitos. Solamente fueron seleccionados ovocitos con citoplasma homogéneo, y completamente rodeados por 3 o más capas de células de la granulosa.

3.4.3. Maduración in vitro de ovocitos bovinos.

La maduración de los ovocitos se realizó en placas de 4 posillos (Nunc, Denmark) durante 24 horas a 38.5℃, en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 y 95% de aire, con o sin el agregado de catecolestrógenos según se indique. Se colocaron grupos de 40 a 50 COC en 500µl de medio TCM199 con Earle salts (Gibco BRL, NY, USA), suplementado con

bicarbonato (2.2 g/l, pH 7.4), 5% de suero fetal bovino (FBS, Gibco BRL, NY, USA), 20 ng/ml oFSH (ovine FSH, NIDDK-oFSH-20, NIH) y gentamicina (50 μg/ml). El medio de cultivo fue recubierto con una capa de 150μl de aceite mineral.

Cuando se utilizó roscovitina para inhibir la progresión de la meiosis *in vitro*, en el estadio de GV, los COC fueron incubados en TCM199 con Earle salts y bicarbonato (2.2 g/l, pH 7.4) suplementado con roscovitina (25 μM) por 24 hs. Luego fueron lavados y madurados por un segundo periodo en condiciones control, como se detalló mas arriba.

3.4.4. Fecundación in vitro de ovocitos bovinos.

La fecundación *in vitro* se realizó con semen congelado en pajuelas de 0.25 ml, que fue donado por el Centro de Inseminación Artificial La Elisa (CIALE). El semen fue descongelado y lavado dos veces por centrifugación (260 x g por 5 minutos) en medio Brackett-Oliphant (BO) (Brackett and Oliphant, 1975) suplementado con teofilina (5 mM). Luego de descartar el sobrenadante, el semen se resuspendió en medio BO suplementado con teofilina (5 mM), heparina (10 μg/ml), y albúmina bovina (BSA, 5 mg/ml). Luego se ajustó la concentración a 1 X 10^7 espermatozoides/ml (Salamone et al, 1995). Los ovocitos madurados son lavados dos veces en medio BO y colocados en grupos de 20 a 25 ovocitos en microgotas de 100μl de semen diluido, en placas de 35mm (Nunc, Denmark), cubiertas con aceite mineral. La incubación se realizó durante 7 horas a 38℃ en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 y 95% de aire.

3.4.5. Cultivo in vitro de embriones

Luego de la fecundación, los presuntos cigotos fueron recuperados de las microgotas de semen y lavados en medio TCM199 suplementado con 5% FBS y Hepes (10mM). Luego los ovocitos fueron denudados de las células del cumulus mediante el pipeteo repetido a través de una pipeta de vidrio de diámetro levemente inferior al de los ovocitos y fueron colocados en grupos de 40 a 50 en 500μl de Fluido Oviductal Sintético (SOF) (Tervit et al, 1972) suplementado con aminoácidos esenciales y no esenciales (Liu and Foote, 1995) y albúmina bovina libre de ácidos grasos (8 mg/ml) (medio SOFaa-BSA), en placas de 4

posillos. El medio de cultivo fue cubierto con una capa de 150µl de aceite mineral, y los embriones fueron cultivados por 8 días a 38.5℃ en atmósfera húmeda con 5% CO_2, 5% O_2 y 90% N_2.

Al día 2 de cultivo se evaluó la tasa de clivaje, que es el porcentaje de ovocitos que iniciaron las divisiones mitóticas, y tienen 2 o mas células 48 horas después de la fecundación *in vitro*. La tasa de clivaje es un indicador de la eficiencia de la fecundación *in vitro*.

Al día 8 de cultivo se evaluó el porcentaje de blastocistos, que es el porcentaje de ovocitos que son fecundados y se desarrollan hasta el estadio de blastocisto. Es un indicador de la capacidad de desarrollo de los ovocitos.

3.4.6. Inmunocitoquímica

Para la observación de la morfología del huso meiótico de los ovocitos se realizó la técnica de inmunofluorescencia descripta por Navara y col. (1994), con algunas modificaciones. Después de las 24 horas de maduración *in vitro*, los COC expandidos se denudaron de las células del cumulus agregando hialuronidasa (0.2%) al medio de maduración, y mediante el pipeteo repetido a través de una pipeta de vidrio de diámetro levemente inferior al de los ovocitos. La zona pelúcida se quitó mediante un breve tratamiento con pronasa (0.2%). A continuación, los ovocitos sin zona pelúcida fueron fijados y permeabilizados en un una solución buffer estabilizadora de microtúbulos (100mM Pipes, 5mM $MgCl_2$ $6H_2O$, 2.5 mM EGTA, 2% formaldehído, 0.5% Triton X-100 y 1 µM Taxol, pH 7.0) por 40 minutos a 38.5℃. Las union es inespecíficas de los anticuerpos primarios y secundarios fueron bloqueadas mediante una incubación de 40 minutos con solución de bloqueo (2% BSA, 2% leche descremada en polvo, 2% suero normal de cabra, 100mM glicina, 0.01% Triton X-100 en PBS) antes de la aplicación de cada anticuerpo.

Para localizar los microtúbulos, los ovocitos se incubaron con anticuerpos monoclonales de ratón contra α-tubulina (B-5-1-2) durante 40 minutos a 38.5℃. Lu ego se lavaron en

solución de bloqueo y se incubaron por otros 40 minutos a 38.5℃ con anticuerpos de cabra contra ratón, conjugados con FITC.

Para detectar los cromosomas, los ovocitos fueron incubados por 20 minutos en PBS con bromuro de etidio (4 μg/ml). Luego se montaron en portaobjetos y se observaron y analizaron con un microscopio de fluorescencia confocal Zeiss LSM 510.

3.4.7. Análisis citogenético

El análisis citogenético se realizó en embriones en estadio de 2 a 10 células (día 2 de cultivo). Se agregó colchicina (1μg/ml) al medio de cultivo (SOFaa-BSA medium) y los embriones se incubaron 6 horas a 38.5°C en atmósfera húmeda con 5% CO_2, 5% O_2 y 90% N_2. Luego, cada embrión fue incubado citrato de sodio 1% por 10 minutos a temperatura ambiente, colocado en un portaobjetos, y fijado y disgregado con una gota de metanol:acido acético (1:1). Después de secados, los preparados fueron teñidos con una solución de Giemsa 3% (Merck, USA) por 10 minutos. Las metafases fueron examinadas a 400x y 1000x y fotografiadas con un microscopio Leica DM LB con película AGFAPAN APX 25.

Los estadios nucleares fueron clasificados como interfase, metafase, y metafases no analizables (cromosomas muy aglutinados o demasiado dispersos). Cada metafase analizable fue clasificada de acuerdo al número de cromosomas como diploide (2n=60), haploide (n=30), o aneuploide. Cada embrión fue clasificado de acuerdo a la ploidía de sus blastómeros como diploide, haploide, mixoploide (embriones con blastómeros diploides y aneuploides), y aneuploides (embriones con todos los blastómeros analizables aneuploides)

3.4.8. Ensayo Cometa

La determinación de daño en el ADN en embriones individuales se realizó mediante el ensayo Cometa o electroforesis en gel de células individuales según Takahashi y col. (2000) con algunas modificaciones. Los embriones fueron lavados dos veces en PBS con

polivinilpirrolidona (4 mg/ml), mezclados con agarosa de bajo punto de fusión (1% en PBS) a 39℃, y colocados en un portaobjetos previamente recubierto con agarosa de alto punto de fusión (1% en PBS). Después de la solidificación fueron incubados en buffer de lisis (10 mM Tris, 1% N-Lauroylsarcosine, 2.5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA, 1% Triton X-100, 10 μg/ml proteinasa K) por 3 h a 4℃. Luego los portaobjetos fueron colocados en la cuba de electroforesis y se dejaron equilibrar con el buffer (300 mM NaOH, 1 mM Na_2EDTA) por 20 minutos. La electroforesis se realizó por 20 minutos a 25 V. Después de la electroforesis los portaobjetos fueron neutralizados con 0.4 M Tris-HCl (pH 7.5). El ADN se tiñó con una gota de 20 μl de bromuro de etidio (4 μg/ml) colocada sobre cada portaobjeto. El grado de daño del ADN fue cuantificado midiendo la longitud de la traza de ADN con un microscopio confocal Zeiss LSM 510.

3.4.9. Análisis estadístico

Los datos fueron presentados como la media de al menos tres experimentos independientes. La variación entre experimentos se ilustró usando el error estándar de la media (ES).

Para la evaluación de las diferencias entre los tratamientos los datos de al menos tres repeticiones fueron sometidos a un análisis de homogeneidad y luego fueron agrupados y analizados mediante el test Chi-cuadrado. Diferencias de $p<0,05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

3.5. Resultados

3.5.1. Efecto de los catecolestrógenos sobre la maduración in vitro de ovocitos.

Con el objeto de determinar si los catecolestrógenos modifican la capacidad de desarrollo que los ovocitos adquieren durante el periodo de maduración, se ensayó el efecto del agregado de estos compuestos durante la maduración sobre el subsecuente desarrollo embrionario temprano. Los ovocitos fueron madurados por 24hs en condiciones control o en presencia 1 µg/ml de 2-MOE2, 2-OHE2 o 4-OHE2. Luego fueron fecundados y cultivados por 8 días en condiciones control.

Como puede observarse en la Figura 3.2, la tasa de clivaje de los ovocitos expuestos a catecolestrógenos durante la maduración, evaluada al día 2 de cultivo, fue similar a la de los ovocitos madurados en condiciones control. Esto indica que la presencia de catecolestrógenos durante la maduración no modificaría la capacidad de estos ovocitos para iniciar las divisiones mitóticas y el desarrollo embrionario temprano durante las 48hs posteriores a la fecundación. No obstante, estos ovocitos madurados en presencia de 2-MOE2, 2-OHE2, o 4-OHE2 mostraron una capacidad significativamente menor para desarrollarse hasta el estadio de blastocisto, evaluada al día 8 de cultivo (Figura 3.2), observándose una marcada inhibición del desarrollo embrionario en el estadio de mórula (Figura 3.3, D).

En los subsiguientes experimentos, orientados a determinar el mecanismo de acción a través del cual los catecolestrógenos afectan la capacidad de desarrollo que los ovocitos adquieren durante su maduración, se utilizó el 2-MOE2 debido a que mostró una mayor potencia para inhibir el desarrollo embrionario temprano (Figura 3.2).

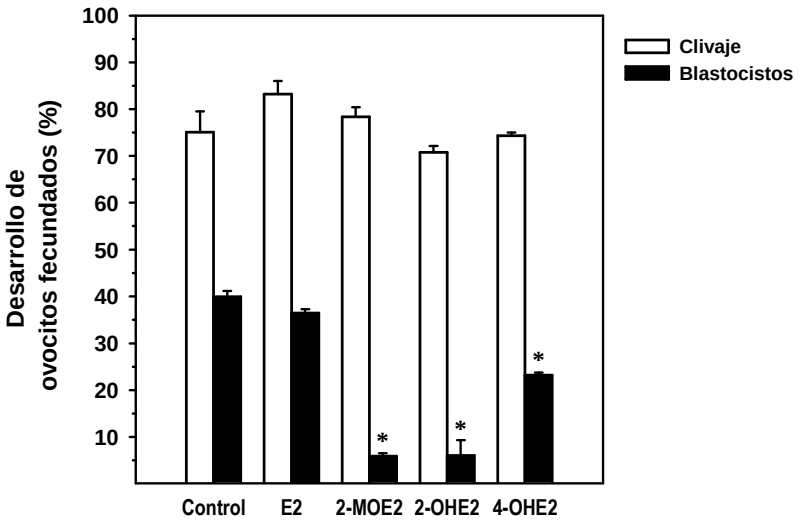

Figura 3.2
Desarrollo embrionario de ovocitos fecundados expuestos a diferentes catecolestrógenos, o estradiol (3µM) durante la maduración in vitro.
El desarrollo hasta el estadio de 4 células (día 2 posfecundación, barras blancas), y hasta el estadio de blastocisto (día 8 posfecundación, barras negras), es expresado como el porcentaje de ovocitos fecundados. Los datos son presentados como la media ± ES de tres experimentos independientes, con al menos 65 ovocitos en cada grupo. (*) $P < 0.05$ comparado con el grupo control.

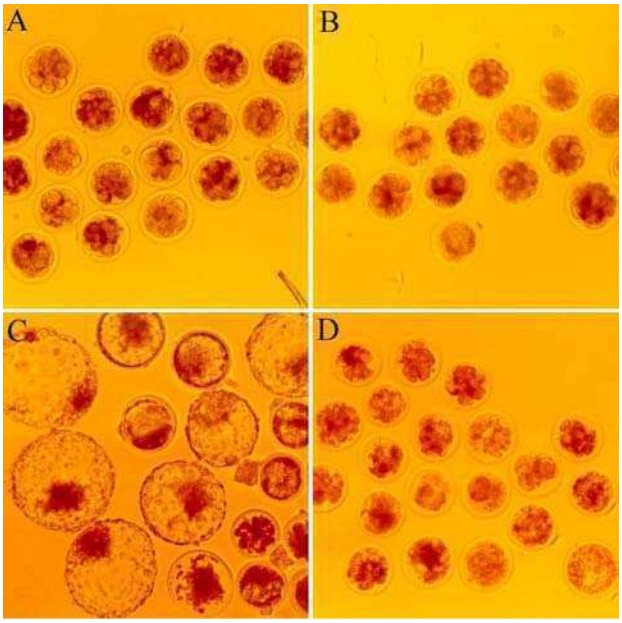

Figura 3.3
Apariencia morfológica de un grupo de embriones desarrollados a partir de ovocitos expuestos a 2-MOE2 (3µM) durante la maduración, al día 4 de cultivo (B) y al día 8 de cultivo (D).
Las fotografías A y C corresponden a un grupo de embriones control al día 4 y 8 de cultivo respectivamente. (X40). En la fotografía C se observan blastocistos, mientras que en la D los embriones parecen estar en el mismo estadio que en la foto B, aunque degenerados.

3.5.2. Sensibilidad de los ovocitos al 2-MOE2

Con el objeto de determinar la concentración mínima que reduce significativamente la capacidad de desarrollo, los ovocitos fueron madurados en presencia de dosis crecientes de 2-MOE2 (10, 100, 1000 ng/ml). Debido a que los catecolestrógenos son compuestos hidrofóbicos, y que consecuentemente la concentración efectiva en el volumen de medio de cultivo (500 µl) puede verse afectada por la capa de aceite mineral (150 µl) con la que se recubre al medio de cultivo, este experimento se realizó sin el agregado de aceite mineral durante la maduración.

Como se observa en la Figura 3.4, el efecto inhibitorio del 2-MOE2 sobre el desarrollo embrionario fue significativo cuando los ovocitos fueron expuestos a concentraciones de 100 ng/ml (300 nM) o superiores.

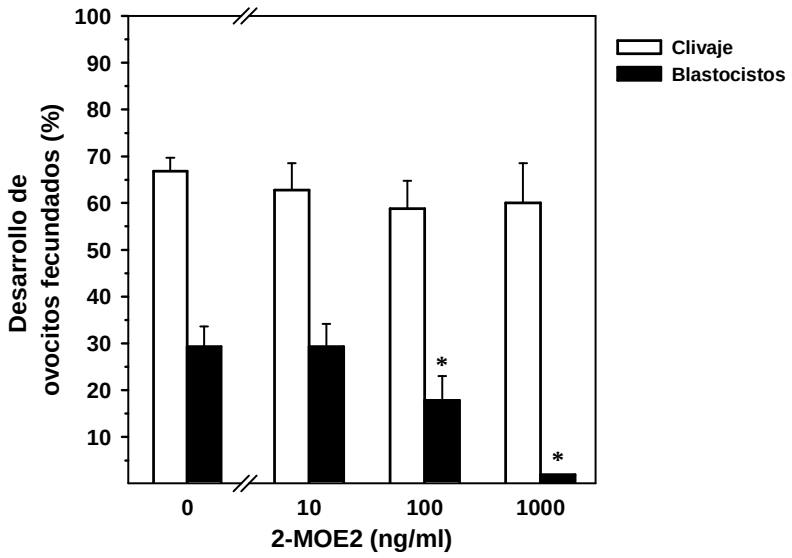

Figura 3.4
Inhibición del desarrollo de blastocistos a partir de ovocitos expuestos a diferentes dosis de 2-MOE2 durante la maduración in vitro en ausencia de aceite mineral.
El desarrollo hasta estadio de 4 células (día 2 posfecundación, barras blancas), y hasta el estadio de blastocisto (día 8 posfecundación, barras negras), es expresado como el porcentaje de ovocitos fecundados. Los datos son presentados como la media ± ES de tres experimentos independientes, con al menos 75 ovocitos en cada grupo. (*) $P < 0.05$ comparado con el grupo control.

3.5.3. Efecto del estradiol sobre la maduración in vitro de ovocitos.

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que los catecolestrógenos son capaces de unirse con gran afinidad (Schutze et al, 1994; Van Aswegen et al, 1989) a los receptores de estradiol. Para evaluar si la menor capacidad de desarrollo embrionario producida por los catecolestrógenos esta mediada por receptores de estradiol se ensayó el efecto del agregado de estradiol, o de estradiol y 2-MOE2 durante la maduración.

No se observaron diferencias en el desarrollo embrionario temprano entre ovocitos madurados en condiciones control y ovocitos madurados en presencia de estradiol (1 μg/ml), en cuanto a tasa de clivaje y porcentaje de desarrollo de blastocistos. El agregado de estradiol durante la maduración no revirtió el efecto inhibitorio del 2-MOE2 sobre el desarrollo embrionario temprano (Figura 3.5).

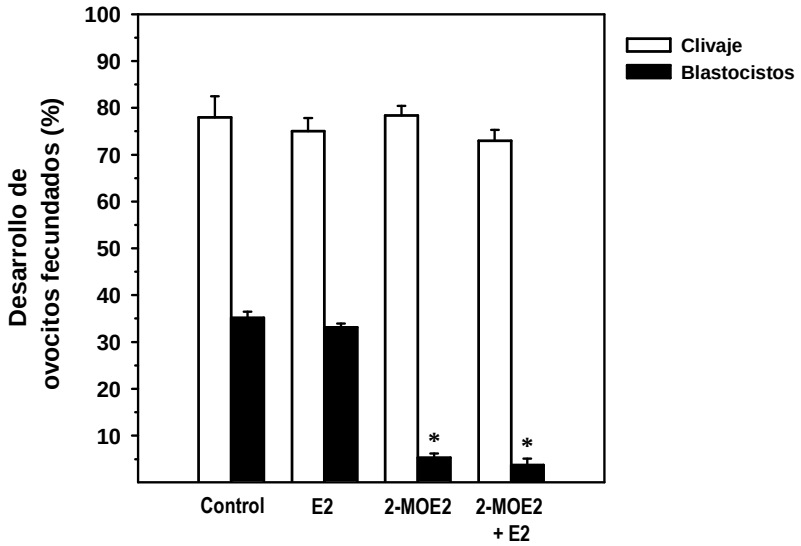

Figura 3.5
Efecto del estradiol sobre la maduración
El desarrollo hasta estadio de 4 células (día 2 posfecundación, barras blancas), y hasta el estadio de blastocisto (día 8 posfecundación, barras negras), es expresado como el porcentaje de ovocitos fecundados. Los datos son presentados como la media ± error estándar de tres experimentos independientes, con al menos 70 ovocitos en cada grupo. (*) $P < 0.05$ comparado con el grupo control.

3.5.4. Efecto del suero fetal bovino durante la maduración.

Ha sido propuesto que 2-MOE2 puede interactuar con proteínas plasmáticas como la globulina ligadora de hormonas sexuales (SHBG), la cual se une a su receptor y desencadena respuestas celulares específicas (Rosner et al, 1991). Para evaluar si el efecto del 2-MOE2 era mediado por la unión a proteínas plasmáticas se decidió ensayar el efecto de 2-MOE2 sobre la maduración de ovocitos en ausencia de suero.

En la Figura 3.6 se observa que los porcentajes de clivaje y de blastocistos del grupo control son reducidos debido a las condiciones subóptimas de maduración sin suero fetal bovino. Sin embargo el efecto de 2-MOE2 fue evidente aún cuando la maduración se realizó en ausencia de suero fetal bovino.

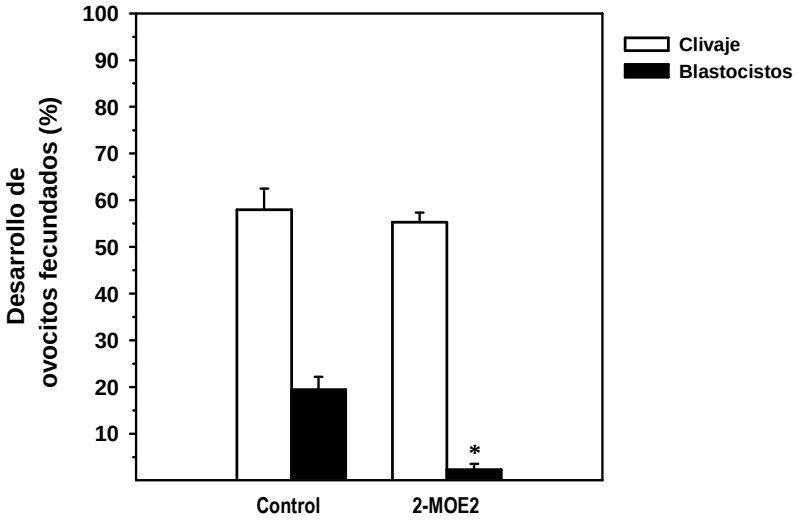

Figura 3.6
Efecto del 2-MOE2 sobre la maduración de los ovocitos en ausencia de suero fetal bovino
El desarrollo hasta estadio de 4 células (día 2 posfecundación, barras blancas), y hasta el estadio de blastocisto (día 8 posfecundación, barras negras), es expresado como el porcentaje de ovocitos fecundados. Los datos son presentados como la media ± ES de tres experimentos independientes, con al menos 65 ovocitos en cada grupo. (*) $P < 0.05$ comparado con el grupo control.

3.5.5. Efecto de compuestos antioxidantes sobre la maduración de los ovocitos en presencia de 2-MOE2

Se ha reportado que el 2-MOE2 inhibe la proliferación de células de leucemia humana y que este efecto puede ser revertido por compuestos antioxidantes como ambroxol o N-acetylcysteine, sugiriendo que la enzima superóxido dismutasa sería el blanco del 2-MOE2 (Huang et al, 2000). La resultante acumulación de radicales libres (O_2^-) induciría daño de las membranas mitocondriales, liberación de citocromo c y apoptosis. Por otro lado, ha sido demostrado que ciertos compuestos antioxidantes, como la cisteamina, agregados durante la maduración *in vitro* pueden incrementar las tasas de desarrollo embrionario en algunos sistemas de producción *in vitro* de embriones (De Matos et al, 2002). Por lo tanto, se decidió determinar si el agregado de agentes antioxidantes durante la maduración de ovocitos expuestos a 2-MOE2 es capaz de revertir la inhibición del desarrollo embrionario temprano.

Como puede se puede observar en la Tabla 3.1, tanto la cisteamina como el ambroxol fueron incapaces de modificar la inhibición del desarrollo embrionario inducida por 2-MOE2.

Tratamiento	n[a]	Clivaje día 2 (%)[b]	Blastocistos día 8 (%)[b]
Control	146	74.8 ± 6.3	37.4 ± 2.6
Cisteamina (100µM)	196	72.1 ± 4.5	30.7 ± 0.3
2-MOE2 (3µM)	130	81.7 ± 7.1	1.1 ± 1.1*
2-MOE2 (3µM) + Cisteamina (100µM)	193	75.4 ± 4.8	2.6 ± 0.4*
Control	135	69.6 ± 3.9	23.0 ± 0.9
Ambroxol (100µM)	60	64.6 ± 12.7	23.5 ± 0.6
2-MOE2 (3µM)	86	63.2 ± 10.8	3.3 ± 3.3*
2-MOE2 (3µM) + Ambroxol (100µM)	91	68.5 ± 1.8	4.3 ± 4.3*

Tabla 3.1
Efecto de compuestos antioxidantes sobre el desarrollo de ovocitos expuestos a 2-MOE2 durante la maduración
* $P < 0.05$ comparado con el control. [a] Número total de ovocitos analizados en tres experimentos independientes. [b] Porcentaje de los ovocitos fecundados (media ± ES).

3.5.6. Efecto del 2-MOE2 durante el cultivo embrionario

La exposición de los ovocitos a 2-MOE2 reduce la capacidad de desarrollo embrionario temprano que estos adquieren progresivamente durante la maduración. Con el objeto de determinar si el 2-MOE2 también afecta el desarrollo embrionario temprano de ovocitos madurados en condiciones control se agregó 2-MOE2 (1µg/ml) a los 2, 4, o 6 días de cultivo, y se evaluó el desarrollo hasta el estadio de blastocisto.

En la Figura 3.7 se muestra que el 2-MOE2 produjo una significativa inhibición del desarrollo embrionario cuando fue agregado al día 2 o al día 4 de cultivo. Cuando el 2-MOE2 fue agregado al día 6 de cultivo, se observó una leve reducción del porcentaje de blastocistos, aunque no fue estadísticamente significativa. El efecto inhibitorio mostró una tendencia a ser más marcado cuando el 2-MOE2 fue agregado en las etapas más tempranas del desarrollo embrionario, pero menor al observado cuando la exposición al 2-MOE2 ocurre durante la maduración de los ovocitos.

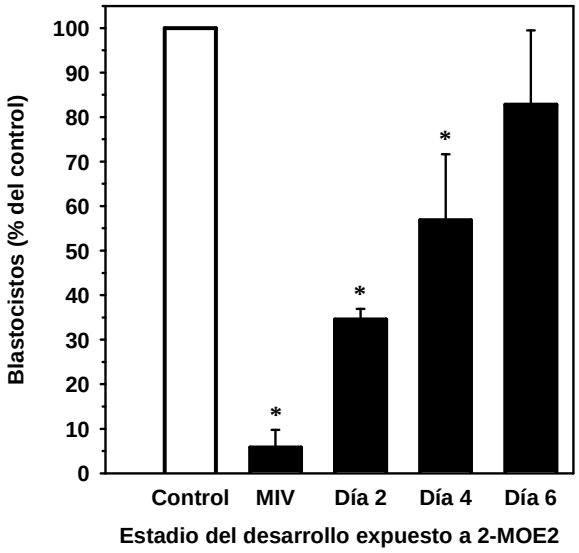

Figura 3.7
Inhibición del desarrollo de blastocistos según el estadio embrionario expuesto a 2-MOE2.
El 2-MOE2 (3µM) fue agregado durante la maduración de los ovocitos (MIV), o durante el cultivo embrionario, en los días 2, 4, o 6 pos fecundación. El desarrollo de blastocistos de los grupos expuestos a 2-MOE2 (barras negras) esta expresado como porcentaje del grupo control, tomando a este como 100% (barra blanca). Los datos son presentados como la media ± ES de tres experimentos independientes, con al menos 80 ovocitos en cada grupo. (*) $P < 0.05$ comparado con el grupo control.

3.5.7. Efectos comparativos de 2-MOE2 y colchicina

La colchicina se une con gran afinidad a la tubulina en sitios específicos e inhibe su polimerización. El 2-MOE2 también es capaz de unirse con gran afinidad a la tubulina en los mismos sitios de unión de colchicina debido a su similitud estructural (Figura 3.8) (D'Amato et al, 1994), y esta característica ha sido propuesta como la responsable de la inhibición del crecimiento de células tumorales (Klauber et al, 1997). Por lo tanto se decidió ensayar el agregado de colchicina durante la maduración de ovocitos, o durante el cultivo de embriones y comparar los efectos con los observados para el 2-MOE2.

Cuando la colchicina fue agregada durante la maduración *in vitro* produjo una inhibición del desarrollo embrionario similar a la inducida por 2-MOE2 (Tabla 3.2). En cambio, a diferencia del 2-MOE2, la colchicina bloqueó completamente el desarrollo cuando fue agregada durante el cultivo embrionario (Tabla 3.2).

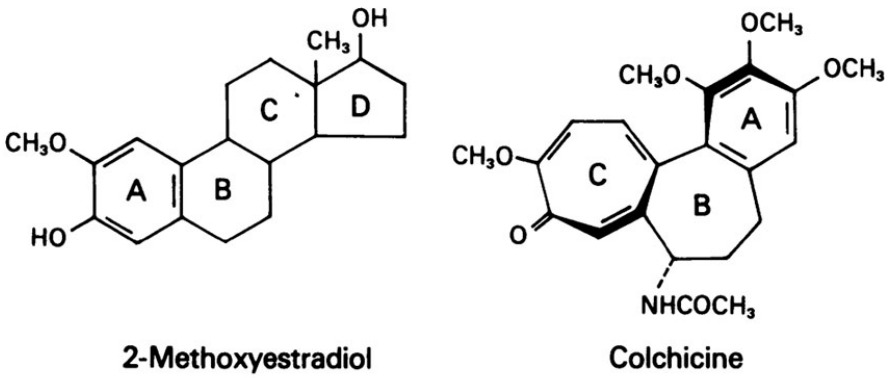

Figura 3.8
Comparación de las estructuras de 2-MOE2 y colchicina.
Tomado de D'Amato y col. (1994)

Tratamiento	n[a]	Clivaje (%)[b]	Blastocisto (%)[b]
Control	120	68.8 ± 3.3	25.9 ± 6.0
Colchicina (3µM) durante la MIV	110	68.5 ± 2.6	0.0 ± 0.0*
Control	104	74.6 ± 1.3	27.4 ± 4.4
Colchicina (3µM) al día 6	97	74.2 ± 4.5	0.0 ± 0.0*

Tabla 3.2
Efecto de la colchicina durante la maduración y el desarrollo embrionario temprano.
* $P < 0.05$ comparado con el control. [a]Número total de ovocitos analizados en tres experimentos independientes. [b] Porcentaje de los ovocitos fecundados (media ± ES).

3.5.8. Efecto del 2-MOE2 sobre la organización del huso meiótico

La similitud entre los efectos observados para el 2-MOE2 y la colchicina cuando fueron agregados durante la maduración *in vitro* de los ovocitos sugiere que ambos compuestos podrían actuar a través de un mecanismo de acción similar. Con el objeto de comprobar esta hipótesis se analizó la estructura del huso meiótico de ovocitos expuestos a 2-MOE2, o a colchicina, a través una técnica inmunocitoquímica, usando anticuerpos específicos para tubulina.

Como se mencionó anteriormente, al inicio de la maduración *in vitro* de los ovocitos la meiosis se encuentra detenida en el estadio GV (profase I). Durante la maduración la meiosis es reiniciada y avanza hasta alcanzar el estadio MII, donde se arresta nuevamente hasta el momento de la fecundación. En la Figura 3.9 (A) se puede observar la configuración normal del huso meiótico de un ovocito arrestado en MII luego de 24hs de maduración *in vitro*, en donde los cromosomas se encuentran alineados en el centro y conectados a los dos polos opuestos del huso.

En cambio, en ovocitos expuestos a 2-MOE2 durante la maduración se observaron alteraciones muy marcadas en la morfología estructural del huso meiótico y en la alineación de los cromosomas. Las alteraciones observadas fueron husos multipolares formados por haces de microtúbulos proyectados en múltiples direcciones (Figura 3.9, B,D,E,F,G), y en algunos casos, múltiples husos en un mismo ovocito (Figura 3.9, C).

Por otro lado, los ovocitos expuestos a colchicina también mostraron alteraciones aunque, a diferencia de las encontradas para los expuestos a 2-MOE2, no se observaron formaciones de haces de microtúbulos, sino que la marca para tubulina apareció de una forma mas difusa, sin polaridades definidas (Figura 3.9, H,I,J,K,L).

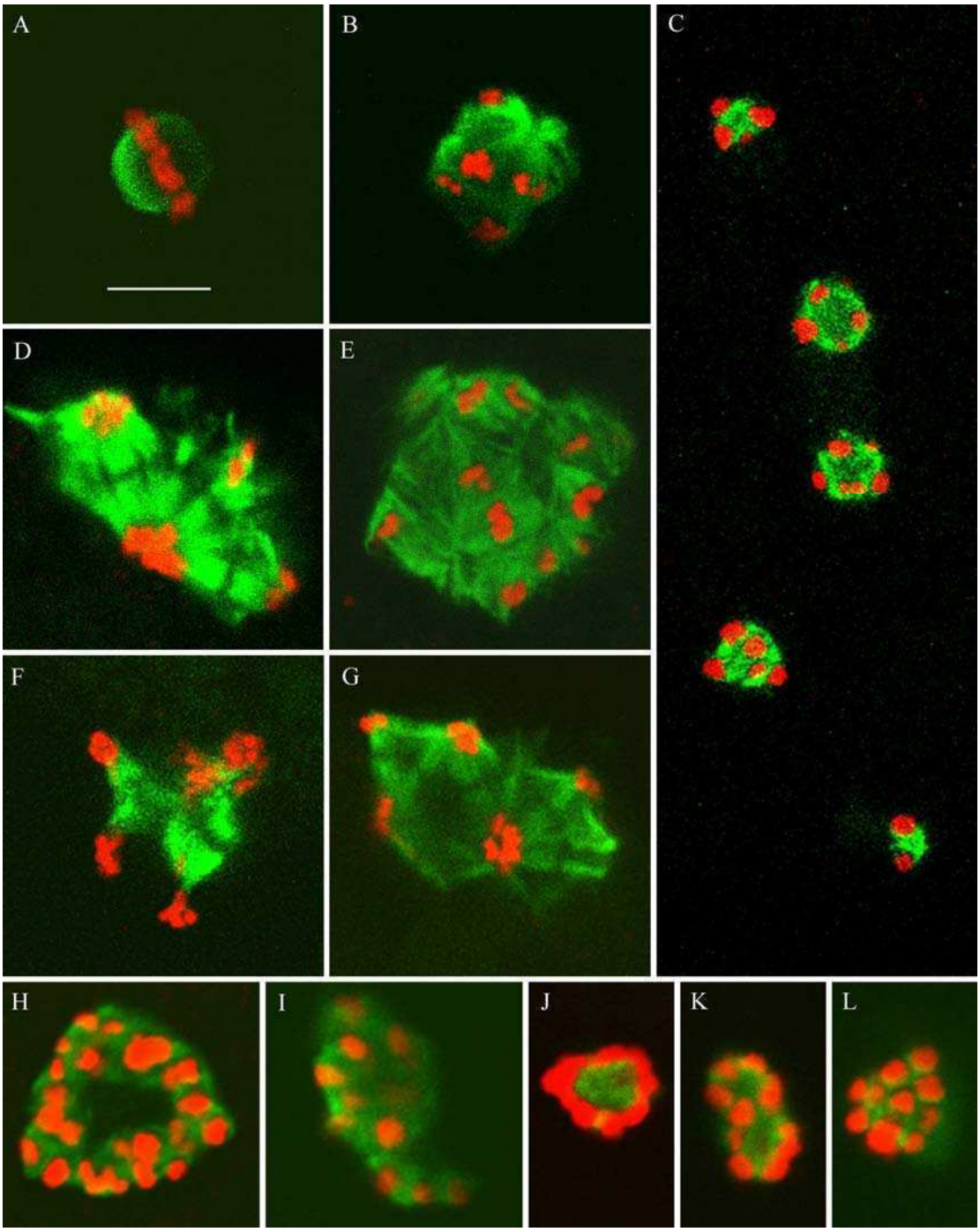

Figura 3.9
Microscopía confocal de ovocitos bovinos después de 24hs de maduración in vitro.
Los ovocitos expuestos a 2-MOE2 (3µM) durante la maduración (B-G) mostraron marcadas alteraciones del huso meiótico en comparación con ovocitos madurados en condiciones control (A). En algunos ovocitos se observaron múltiples husos (C). Los ovocitos expuestos a colchicina (3µM) durante la maduración (H-L) también mostraron alteraciones en el huso meiótico, aunque diferentes de las observadas en los ovocitos expuestos a 2-MOE2. Los microtúbulos se observan de color verde y los cromosomas, rojos. Barra = 10 µm. Todas las fotos están en la misma escala.

3.5.9. Análisis citogenético

Las alteraciones observadas en la organización del huso meiótico y en la distribución de los cromosomas podrían ser las causas de la baja capacidad de desarrollo embrionario de los ovocitos madurados en presencia de 2-MOE2, debido a que la fecundación de estos ovocitos podría resultar en embriones aneuploides incapaces de desarrollarse hasta el estadio de blastocisto.

Con el objeto de comprobar esta hipótesis se analizó la ploidía de 189 embriones en el estadio de 2 a 10 células, al día 2 de cultivo (Tabla 3.3). Se obtuvieron 289 metafases analizables a partir de 124 embriones, mientras que 65 embriones mostraron núcleos interfásicos o metafases no analizables (Figura 3.10). En la Tabla 3.3 se puede observar que los embriones originados de ovocitos expuestos a 2-MOE2 tuvieron una proporción mayor de metafases aneuploides en comparación con el grupo control, y solamente un 8% de metafases diploide. Cuando se clasificó a los embriones de acuerdo a la ploidía de sus blastómeros se encontró que el 82% de los embriones originados de ovocitos expuestos a 2-MOE2 durante la maduración mostraron solo metafases aneuploides (embriones aneuploides), el 10% mostró tanto metafases diploides como aneuploides (embriones mixoploides), y solamente el 3% mostró solo metafases diploides (embriones diploides) (Tabla 3.4). Por el contrario, solo el 20 % de los embriones del grupo control fue aneuploide, mientras que el 36% fue mixoploide y el 40 % fue diploide (Tabla 3.4). Cabe agregar que las tasas de embriones aneuploides y mixoploides reportadas para embriones producidos *in vitro* son mayores que para embriones desarrollados *in vivo* (Viuff et al, 1999), y muy variables (entre 14 y 80 %), dependiendo de los diferentes protocolos de cultivo utilizados (Viuff et al, 2000).

Por último, un porcentaje de las metafases observadas no pudieron ser analizadas debido mayormente a que la cromatina aparecía muy compactada y no se podían individualizar los cromosomas (Figura 3.10, C). Dicho porcentaje fue significativamente mayor para los embriones originados a partir de ovocitos expuestos a 2-MOE2 (23%, n=92), en comparación con el grupo control (1%, n=97) ($p<0.01$).

Tratamiento	n [a]	Cromosomas por metafase				
		< 30	n=30	31-59	2n=60	>60
Control	161	3 (2)	20 (12)	24 (15)	96 (60)	18 (11)
2-MOE2 (3µM)	128	22 (17)*	13 (10)	46 (36)*	10 (8)*	37 (29)*

Tabla 3.3
Distribución (%) de metafases según su número de cromosomas, en embriones al día 2 de cultivo.
n=30: metafase haploide ; 2n=60: metefase diploide ; <30, 31-59, >60: metafases aneuploides. * $P < 0.01$ comparado con el control. [a] Número total de metafases analizadas.

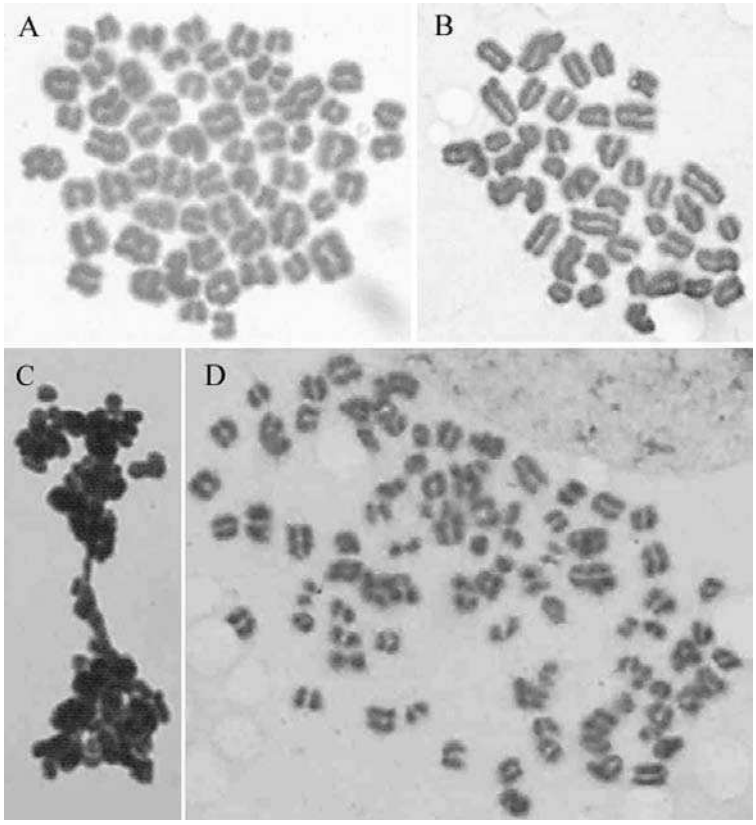

Figura 3.10
Análisis citogenético y morfología cromosómica de embriones en estadio de 4 a 8 células (Día 2 de cultivo).
En las fotografías se observan extendidos de cromosomas de metafases de un embrión control, normal, con 60 cromosomas (A), y extendidos de embriones expuestos a 2-MOE2 durante la maduración de los ovocitos que muestran aneupliodías (B, 40 cromosomas; D, 87 cromosomas), y cromosomas agrupados (C). Magnificación1000x.

Tratamiento	n [a]	Diploide	Mixoploide	Haploide	Aneuploide
Control	63	25 (40)	23 (36)	2 (3)	13 (21)
2-MOE2 (3µM)	61	2 (3)*	6 (10)*	3 (5)	50 (82)*

Tabla 3.4
Distribución (%) de los embriones al día 2 de cultivo según la ploidía de sus blastómeros.
* $P < 0.01$ comparado con el control.[a] Número de embriones con metafases analizables.

3.5.10. Análisis de integridad del ADN

Existe evidencia de que graves alteraciones cromosómicas en embriones preimplantatorios conducen al arresto del desarrollo (Hyttel et al, 2000;Liu et al, 2002;Viuff et al, 2000). También existe evidencia que indica que el mecanismo de apoptosis es funcional desde estadios tempranos del desarrollo embrionario (Gjorret et al, 2003). Por lo tanto se decidió realizar un ensayo de cometa para analizar la integridad del ADN de los embriones originados a partir de ovocitos expuestos a 2-MOE2. El ensayo de cometa, o electroforesis en gel de células individuales, posibilitó cuantificar daño en el ADN de los embriones en forma individual, midiendo la longitud de la migración del ADN luego de la electroforesis (Figura 3.11). Al día 6 de cultivo, los embriones originados a partir de ovocitos expuestos a 2-MOE2 mostraron una migración de ADN significativamente mayor (138 ± 18 µm, n=58) que los embriones del grupo control (37 ± 9 µm, n=61) (Figura 3.11).

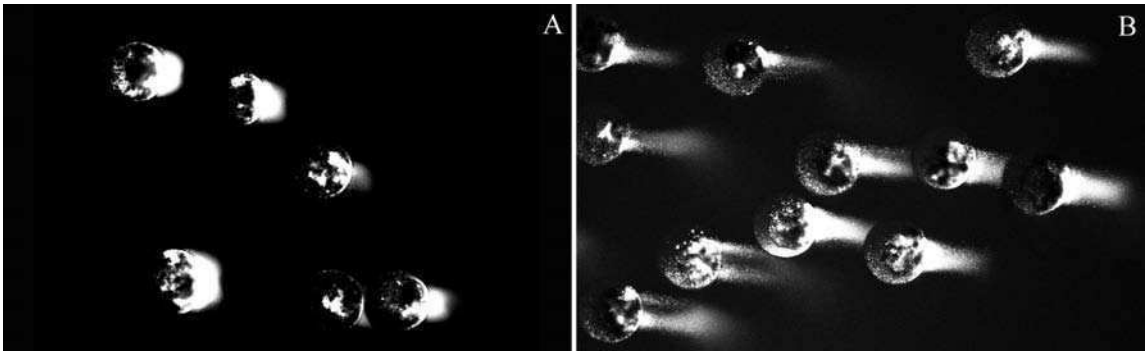

Figura 3.11
Ensayo de cometa
Comparación del grado de daño en el ADN, según la longitud de la migración del ADN, entre embriones desarrollados a partir de ovocitos expuestos a 2-MOE2 (3µM) durante la maduración (B) y embriones control (A), al día 6 de cultivo.

3.5.11. Efecto del 2MOE2 durante la maduración retrasada

La roscovitina es un potente inhibidor del Factor Promotor de Maduración (MPF), conformado por la subunidad catalítica $p34^{cdc2}$ y la subunidad regulatoria ciclina B1, que es responsable de mediar el reinicio de la meiosis. El agregado de roscovitina al medio de maduración inhibe el reinicio de la meiosis en forma reversible, manteniendo a mas del 80% de los ovocitos en el estadio GV (Mermillod et al, 2000). Por otro lado, se ha reportado que la inhibición del reinicio de la meiosis por 24 h, seguida de un segundo periodo de maduración en condiciones control, no afecta la capacidad de desarrollo embrionario (Mermillod et al, 2000). Con el objeto de comprobar que el efecto inhibitorio del 2-MOE2 es mediado principalmente por las alteraciones inducidas en la organización del huso meiótico, los ovocitos fueron madurados por 24 hs en presencia de roscovitina, y luego por un segundo periodo de 24 hs en condiciones control. Como se puede observar en la Tabla 3.5, el agregado de 2-MOE2 durante el primer periodo de maduración fue incapaz de afectar las tasas de desarrollo embrionario. Sin embargo, cuando el 2-MOE2 fue agregado en el segundo periodo de maduración, durante el reinicio y la progresión de la meiosis, la tasa de clivaje no fue afectada pero el porcentaje de blastocistos fue significantemente reducido.

Roscovitina	2-MOE2	n[a]	Clivaje (%)[b]	Blastocistos (%)[b]
0 – 24 hs	----------	126	63 ± 15	19.5 ± 1.5
0 – 24 hs	0 – 24 hs	123	64 ± 10	19.5 ± 3.5
0 – 24 hs	24 – 48 hs	120	60 ± 12	0.0 ± 0.0*

Tabla 3.5
Efecto del 2-MOE2 durante la maduración retrasada.
* $P < 0.05$ comparado con el control. [a] Número total de ovocitos analizados en tres experimentos independientes. [b] Porcentaje de los ovocitos fecundados (media ± ES).

3.6. Discusión

3.6.1. Efecto del 2-MOE2 durante la maduración de los ovocitos.

In vivo, los ovocitos bovinos adquieren la capacidad de desarrollo dentro del folículo ovulatorio, antes de la ovulación. Esto requiere, en primer término, la completa maduración nuclear que consiste en la progresión de la meiosis del estadio GV al estadio MII, donde un segundo arresto meiótico es impuesto hasta que se produzca la fecundación. En segundo término, requiere de un conjunto de cambios moleculares como síntesis de proteínas, ARN mensajero y reubicación de organelas, conocido como maduración citoplasmática. A pesar de que la maduración nuclear y la citoplasmática pueden ocurrir en forma independiente, la capacidad de desarrollo solamente es alcanzada cuando ambos procesos se desarrollan íntimamente integrados. Deficiencias durante el proceso de maduración pueden llevar a alteraciones del desarrollo, que pueden evidenciarse en estadios tempranos, durante la fecundación y las primeras divisiones mitóticas, como así también durante estadios más tardíos de desarrollo, durante la gestación o al nacimiento (Moor et al, 1998).

Utilizando un sistema de producción de embriones *in vitro* demostramos que el agregado de estradiol durante la maduración de los ovocitos no produce ningún efecto, mientras que su metabolito 2-MOE2 impide la adquisición de la capacidad de desarrollo. Los ovocitos expuestos a 2-MOE2 son capaces de ser fertilizados e iniciar el desarrollo embrionario temprano pero solo hasta el estadio de mórula, ya que son incapaces de alcanzar el estadio de blastocisto. Además, la acción del 2-MOE2 fue específica en cuanto a las etapas del desarrollo afectadas ya que el desarrollo preimplantatorio de los embriones expuestos a 2-MOE2 después del clivaje fue afectado en menor medida.

A pesar de que el estradiol es rutinariamente agregado al medio de maduración en algunos protocolos experimentales (Armstrong et al, 1991; Saeki et al, 1991), el efecto de este esteroide sobre la maduración o sobre la capacidad de desarrollo de los ovocitos es controvertido. Además, la capacidad de las células de la granulosa para sintetizar estradiol en cultivo (Mingoti et al, 2002) puede explicar en parte la falta de efecto del estradiol exógeno durante la maduración. Por otra parte, aunque se ha demostrado que

los catecolestrógenos pueden interactuar con los receptores de estradiol en algunos modelos experimentales (Schutze et al, 1994; Van Aswegen et al, 1989), los efectos inhibitorios reportados aquí no parecen estar relacionados a dicha interacción, ya que no fueron revertidos por el agregado de estradiol exógeno.

El hecho de que los efectos de 2-MOE2 también fueran observados cuando la maduración se realizó en ausencia de suero indica que no serían mediados a través de la unión a proteínas del suero como SHBG, como ha sido propuesto por Rosner y col. (1991).

Huang y col. (2000) sugirieron que 2-MOE2 inhibe el crecimiento de células tumorales y la angiogénesis mediante la inhibición de la enzima superóxido dismutasa, lo que llevaría al incremento intracelular de radicales libres y a la apoptosis. Esta hipótesis ha sido cuestionada por otros (Kachadourian et al, 2001). Los datos presentados aquí indican que el efecto de 2-MOE2 no pudo ser revertido por ninguno de los antioxidantes probados sugiriendo que el efecto no se debe al incremento del nivel de radicales libres.

La capacidad de 2-MOE2 para interactuar con tubulina en el sitio de unión a colchicina está bien documentada (D'Amato et al, 1994), y la consecuente alteración de la polimerización de los microtúbulos ha sido propuesta como la causa de la inhibición de la proliferación celular de muchos tipos celulares tratados con este esteroide (Klauber et al, 1997). La similitud entre los efectos del 2-MOE2 y los de la colchicina sobre el desarrollo embrionario sumado a las marcadas alteraciones observadas en el huso meiótico cuando la maduración se realizó en presencia de este catecolestrógeno sugiere fuertemente que el efecto deletéreo es mediado por su interacción con tubulina. A pesar de estas alteraciones los embriones fueron capaces de desarrollarse hasta el estadio de mórula. En vista de que posibles errores en la segregación de cromosomas durante la meiosis tendrían graves consecuencias llevando a la producción de gametas anormales, sería lógica la existencia un mecanismo de control muy estricto. En la mayoría de los tipos celulares el punto de control del ensamblaje del huso es el mecanismo responsable de controlar la estructura del huso, asegurando que después de la mitosis cada célula hija tenga la cantidad correcta de cromosomas (Shimoda and Solomon, 2002). Sin embargo, a pesar de que este mecanismo de control parece estar muy conservado desde levaduras hasta mamíferos, siendo también documentada su presencia durante la meiosis

masculina (Odorisio et al, 1998), nuestras observaciones en ovocitos bovinos apoyan la idea generalizada de que, con respecto a la funcionalidad de este mecanismo de vigilancia, la gameta femenina es una excepción (Hunt and Hassold, 2002).

En vertebrados inferiores como xenopus, erizo de mar, y pez cebra es conocido que estos mecanismos no funcionan durante los primeros clivajes (Masui and Wang, 1998) hasta el estadio MBT (Midblastula Transition), cuando se inicia la transcripción embrionaria. En humanos, en vista de la alta incidencia de anormalidades cromosómicas observadas en embriones preimplantatorios, se ha postulado (Delhanty and Handyside, 1995) que los puntos de control del ciclo celular estarían ausentes durantes los estadios tempranos de desarrollo tornándose funcionales después de la activación del genoma embrionario (Handyside and Delhanty, 1997; Liu et al, 2002). Por lo tanto, como la exposición de los ovocitos al 2-MOE2 durante la maduración induciría la segregación desbalanceada de los cromosomas, la falta de un punto de control de ensamblaje de huso funcional en este estadio es consistente con el desarrollo de embriones aneuploides observados después de la fecundación *in vitro*.

Ha sido demostrado que embriones mixoploides pueden alcanzar el estadio de blastocisto y hasta producir preñeces viables, aunque si los embriones son haploides o completamente aneuploides el desarrollo es siempre arrestado en estadios tempranos del desarrollo (Hyttel et al, 2000; Liu et al, 2002; Viuff et al, 2000). Nuestros resultados indican que el 82% de los embriones expuestos a 2-MOE2 durante la MIV fueron aneuploides, 5% haploides, 10% mixoploides y 3% diploides, por lo tanto concluimos que el arresto del desarrollo de estos embriones es debido a sus alteraciones cromosómicas. Además, como la activación del genoma embrionario en el bovino ocurre alrededor del estadio de 8 células (Chiappe et al, 2002), nuestros datos concuerdan con la relación observada entre activación del desarrollo embrionario y arresto del desarrollo de embriones aneuploides.

Nuestros resultados indican que la aneuploidía y la inhibición del desarrollo embrionario son consecuencias de una alteración de la maduración nuclear de los ovocitos expuestos a 2-MOE2 durante la MIV. Consistentemente con esta idea, cuando la progresión de la meiosis fue bloqueada temporalmente, durante la exposición a 2-MOE2, y luego los ovocitos fueron madurados, fecundados y cultivados en condiciones control, el desarrollo hasta el estadio de blastocisto no fue diferente del grupo control no expuesto a 2-MOE2.

Resultados similares en cuanto al efecto del 2-MOE2 sobre el huso meiotico han sido reportados recientemente en ovocitos de raton (Eichenlaub-Ritter et al, 2007).

3.6.2. Efecto del 2-MOE2 durante el cultivo embrionario

Durante el cultivo embrionario, el efecto de 2-MOE2 fue diferente al de colchicina. Cuando fueron agregados en el estadio de mórula la colchicina bloqueó completamente el pasaje de mórula a blastocisto mientras que 2-MOE2 no produjo ningún efecto. Estas diferencias pueden deberse a los diferentes efectos que ambos compuestos producen sobre la dinámica de la tubulina. Una molécula de colchicina se une a una molécula de tubulina y previene su polimerización. Por el contrario, 2-MOE2 se une a tubulina en el sitio de unión a colchicina, y parece ser incorporada en el polímero aumentando su resistencia a la despolimerización (D'Amato et al, 1994). Como el huso mitótico se mantiene en un estado de equilibrio dinámico entre polimerización y despolimerización con una alta tasa de renovación, la colchicina causa la rápida depolimerización del huso mientras que el 2-MOE2 afecta drásticamente su arquitectura estabilizando formaciones de microtúbulos que no tienen ninguna organización espacial. A pesar de que ninguno de estos dos efectos parecería ser compatible con un desarrollo embrionario normal, el hecho de que 2-MOE2 no inhibe el pasaje de mórula a blastocisto sugiere que el desarrollo embrionario podría progresar a pesar de las alteraciones observadas en el huso mitótico. En este caso, el estadio de blastocisto no sería un buen punto para evaluar la calidad embrionaria ya que es muy probable que el desarrollo subsiguiente esté seriamente comprometido por aneuploidía.

Muchas sustancias afectan la segregación de los cromosomas de los ovocitos (Can and Albertini, 1997; Generoso et al, 1989; Mailhes et al, 1999), sin embargo, el hecho de que 2-MOE2 sea un metabolito endógeno del estradiol hace que el significado biológico no sea claro. Este catecolestrógeno ha sido encontrado en el fluido folicular de algunas especies en concentraciones comparables a las que afectan la polimerización de la tubulina (Dehennin et al, 1984; Silberzahn et al, 1985). Además, un incremento en la producción de 2-OHE2 ha sido reportado en los folículos preovulatorios en porcinos (Hammond et al, 1986).

Nuestra hipótesis es que, en lugar de un proceso fisiológico, las alteraciones producidas por altas concentraciones de 2-MOE2 en la maduración de los ovocitos pueden estar involucradas en la etiología de los síndromes de infertilidad asociados a algunos contaminantes ambientales que son conocidos activadores de AHR. Estos agentes son potentes inductores de las enzimas responsables de de la conversión de estradiol en catecolestrógenos en las células de la granulosa (Dasmahapatra et al, 2001). 2-OHE2 puede ser convertido en 2-MOE2 por la COMT ovárica (Spicer et al, 1987). En este contexto, es interesante remarcar que el humo de cigarrillo ha sido relacionado tanto a la activación de AHR en el ovocito, como a errores en la segregación de los cromosomas durante la meiosis (Matikainen et al, 2001; Zenzes et al, 1995).

También es importante notar que en humanos, las aneuploidía relacionadas a la edad podrían ser causadas por una alteración en la maduración de los ovocitos debida a niveles hormonales aberrantes frecuentemente observados en mujeres a medida que se aproximan a la menopausia (Hodges et al, 2002). Como los embriones humanos presentan anormalidades en el número de cromosomas mas frecuentemente que cualquier otra especie (Cohen, 2002), y existen cada vez mas evidencias que las aneuploidía encontradas en fetos humanos se originan mayoritariamente durante la meiosis femenina (Hunt and Hassold, 2002), es razonable especular que 2-MOE2 podría estar involucrado. Así, mientras que altas concentraciones de 2-MOE2 durante la maduración de los ovocitos causa el arresto del desarrollo embrionario, concentraciones menores podrían producir alteraciones más sutiles del huso meiótico resultando en errores cromosómicos que podrían llevar a abortos o inclusive a problemas genéticos no letales.

En suma, nuestros resultados muestran que además de las acciones intraováricas previamente demostradas, niveles anormalmente altos de catecolestrógenos podrían tener un efecto deletéreo sobre la maduración de los ovocitos y el desarrollo embrionario temprano debido a alteraciones del huso meiótico.

4. Conclusiones

- La línea de células de la granulosa bovina BGC-1 es capaz de mantener el arresto meiótico de COC *in vitro*, inhibiendo también la expansión del cumulus.

- El efecto inhibitorio de las células BGC-1 es mediado por factore/s soluble/s, que podrían ser lábiles y/o secretados en pequeñas cantidades.

- El/los factores inhibitorios no actúan directamente sobre el ovocito sino que lo hacen a través de las células del cumulus.

- Las células del cumulus deben mantener un contacto estrecho con el ovocito para poder transmitir la señal inhibitoria de las células BGC-1.

- Durante el arresto meiótico producido por las células BGC-1, el reinicio de la meiosis puede ser inducido parcialmente por FSH y, en menor medida, por EGF.

- El arresto meiótico inducido por células BGC-1 es completamente reversible.

- La línea celular BGC-1 es un modelo apropiado para estudiar la regulación bidireccional entre las células de la granulosa y el ovocito durante el desarrollo folicular. La identificación de factores paracrinos involucrados en el control de la maduración del ovocito resulta de fundamental importancia para las biotecnologías de la reproducción como producción *in vitro* de embriones, clonación, transgénesis y generación de células madre embrionarias en diversas especies.

- Los catecolestrógenos afectan la capacidad de desarrollo de los COC madurados *in vitro*.

- El 2-MOE2 induce alteraciones en el huso meiótico de los ovocitos que, luego de la fecundación, causan aneuploidías que llevan a la inhibición del desarrollo embrionario en el estadio de morula.

- El aumento de los niveles intrafoliculares de 2-MOE2 podría ser la causa de síndromes de infertilidad asociados a ciertos contaminantes ambientales, así como también del aumento de la frecuencia de aneuploidías embrionarias observadas en mujeres a medida que se aproximan a la menopausia.

5. Abreviaturas

2-MOE2	2-metoxiestradiol
2-OHE2	2-hidroxiestradiol
4-OHE2	4-hidroxiestradiol
ADN	ácido desoxirribonucleico
AHR	receptor de aril hidrocarburos
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
ARN	ácido ribonucleico
BSA	albúmina sérica bovina
CEI	índice de expansión del cumulus
CIV	cultivo *in vitro*
COC	complejo cumulus-ovocito
COMT	catecol-O-metil transferasa
dbAMPc	dibutiril adenosín monofosfato cíclico
DMEM	medio Eagle modificado Dulbecco
DO	ovocito denudado
E2	estradiol
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGTA	ácido etilenglicol-bis(β aminoetileter) tetraacético
ES	error estandar de la media
FBS	suero fetal bovino
FIV	fecundación *in vitro*

FSH	hormona folículo estimulante
GnRH	hormona liberadora de gonadotrifinas
GV	vesícula germinal
LH	hormona luteinizante
MC	medio condicionado
MI	metafase I
MII	metafase II
MIV	maduración *in vitro*
MPF	factor promotor de la maduración
PBS	Buffer fosfato salino
PMSG	gonadotrofina sérica de yegua preñada
SHBG	globulina ligadora de hormonas sexuales
SOF	fluido oviductal sintético
TCM199	medio de cultivo 199

6. Referencias

Aktas H, Leibfried-Rutledge ML, First NL (2003). Meiotic state of bovine oocytes is regulated by interactions between cAMP, cumulus, and granulosa. Mol Reprod Dev 65:336-343.

Armstrong DT, Zhang X, Vanderhyden BC, Khamsi F (1991). Hormonal actions during oocyte maturation influence fertilization and early embryonic development. Ann N Y Acad Sci 626:137-158.

Assey RJ, Hyttel P, Greve T, Purwantara B (1994). Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. Mol Reprod Dev 37:335-344.

Ayoub MA, Hunter AG (1993). Inhibitory effect of bovine follicular fluid on in vitro maturation of bovine oocytes. J Dairy Sci 76:95-100.

Bernath VA, Muro AF, Vitullo AD, Bley MA, Barañao JL, Kornblihtt AR (1990). Cyclic AMP inhibit fibronectin gene expression in a newly developed granulosa cell line by a mechanism that suppresses cAMP-responsive element-dependent transcriptional activation. J Biol Chem 265:18219-18226.

Billig H, Furuta I, Hsueh AJW, Hsueh AJ (1993). Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. Endocrinology 133:2204-2212.

Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA (2002). Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. Biol Reprod 66:38-43.

Blondin P, Coenen K, Guilbault LA, Sirard MA (1997a). In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. Theriogenology 47:1061-1075.

Blondin P, Guilbault LA, Sirard MA (1997b). The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. Theriogenology 48:803-813.

Blondin P, Sirard M-A (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. Mol Reprod Dev 41:54-62.

Brackett BG, Oliphant G (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol Reprod 12:260-274.

Braw-Tal R, Yossefi S (1997). Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. J Reprod Fertil 109:165-231.

Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Wimalasena J, Ayala ME, Dominguez R (2005). Oogenesis in adult mammals, including humans: a review. Endocrine 26:301-316.

Byskov AG, Andersen CY, Leonardsen L (2002). Role of meiosis activating sterols, MAS, in induced oocyte maturation. Mol Cell Endocrinol 187:189-196.

Byskov AG, Hoyer PE (1994). Embriology of Mammalian Gonads and Ducts. In: Knobil E, Neill J, et al., editors. The Physiology of Reproduction.New York:Raven Press. p. 487-541.

Calder MD, Caveney AN, Westhusin ME, Watson AJ (2001). Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2)(PGE(2)) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE(2) induces moderate expansion of the bovine cumulus in vitro. Biol Reprod 65:135-140.

Can A, Albertini DF (1997). Stage specific effects of carbendazim (MBC) on meiotic cell cycle progression in mouse oocytes. Mol Reprod Dev 46:351-362.

Carbonneau G, Sirard MA (1994). Influence of follicular wall on meiotic resumption of bovine oocytes when cultured inside or outside hemi-sections. Journal of Reproduction and Development (Japan) 40:125-132.

Centola GM, Anderson LD, Channing CP (1981). Oocyte maturation inhibitor (OMI) activity in porcine granulosa cells. Gamete Res 4:451-461.

Channing CP, Bae I-H, Stone SL, Anderson LB, Edelson S, Fowler SC (1981). Porcine granulosa and cumulus cell properties. LH/hCG receptors, ability to secrete progesterone and ability to respond to LH. Mol Cell Endocrinol 22:359-362.

Chiappe ME, Lattanzi ML, Colman-Lerner AA, Baranao JL, Saragueta P (2002). Expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in early bovine embryo development. Mol Reprod Dev 61:135-141.

Chun S-Y, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafriri A, Hsueh AJW (1994). Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: Mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. Endocrinology 135:1845-1853.

Cohen J (2002). Sorting out chromosome errors. Science 296:2164-2166.

Colman-Lerner AA, Fischman ML, Lanuza GM, Bissell DM, Kornblihtt AR, Baranao JL (1999). Evidence for a role of the alternatively spliced ED-I sequence of fibronectin during ovarian follicular development. Endocrinology 140:2541-2548.

Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, Jin C, Tsafriri A (2002). Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. Mol Cell Endocrinol 187:153-159.

Conti M, Hsieh M, Park JY, Su YQ (2006). Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. Mol Endocrinol 20:715-723.

Coticchio G, Rossi G, Borini A, Grondahl C, Macchiarelli G, Flamigni C, Fleming S, Cecconi S (2004). Mouse oocyte meiotic resumption and polar body extrusion in vitro are differentially influenced by FSH, epidermal growth factor and meiosis-activating sterol. Hum Reprod 19:2913-2918.

D'Amato RJ, Lin CM, Flynn E, Folkman J, Hamel E (1994). 2-Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. Proc Natl Acad Sci U S A 91:3964-3968.

Dasmahapatra AK, Wimpee BA, Trewin AL, Hutz RJ (2001). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases steady-state estrogen receptor-beta mRNA levels after CYP1A1 and CYP1B1 induction in rat granulosa cells in vitro. Mol Cell Endocrinol 182:39-48.

De Loos FAM, Zeinstra E, Bevers MM (1994). Follicular wall maintains meiotic arrest in bovine oocytes cultured in vitro. Mol Reprod Dev 39:162-165.

De Matos DG, Herrera C, Cortvrindt R, Smitz J, Van Soom A, Nogueira D, Pasqualini RS (2002). Cysteamine supplementation during in vitro maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine in vitro embryo production. Mol Reprod Dev 62:203-209.

de Wit AA, Wurth YA, Kruip TA (2000). Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. J Anim Sci 78:1277-1283.

Dehennin L, Blacker C, Reiffsteck A, Scholler R (1984). Estrogen 2-, 4-, 6- or 16-hydroxylation by human follicles shown by gas chromatography-mass spectrometry associated with stable isotope dilution. J steroid Biochem 20:465-471.

Delhanty JD, Handyside AH (1995). The origin of genetic defects in the human and their detection in the preimplantation embryo. Hum Reprod Update 1:201-215.

Denison MS, Pandini A, Nagy SR, Baldwin EP, Bonati L (2002). Ligand binding and activation of the Ah receptor. Chem Biol Interact 141:3-24.

Downs SM (1993). Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. Theriogenology 39:65-79.

Downs SM, Daniel SA, Eppig JJ (1988). Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. J Exp Zool 245:86-96.

Driancourt MA (1991). Follicular dynamics in sheep and cattle. Theriogenology 35:55-79.

Dubey RK, Jackson EK, Keller PJ, Imthurn B, Rosselli M (2001). Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism. Hypertension 37:640-644.

Edwards RG (1974). Follicular Fluid. J Reprod Fertil 37:189-219.

Edwards RG, Fowler RE, Gore-Langton RE, Gosden RG, Jones EC, Readhead C, Steptoe PC (1977). Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. J Reprod Fertil 51:237-263.

Eichenlaub-Ritter U, Winterscheidt U, Vogt E, Shen Y, Tinneberg HR, Sorensen R (2007). 2-methoxyestradiol induces spindle aberrations, chromosome congression failure, and nondisjunction in mouse oocytes. Biol Reprod 76:784-793.

Eppig JJ (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. Reproduction 122:829-838.

Erickson BH (1966b). Development and senescence of the postnatal bovine ovary. J Anim Sci 25:800-805.

Erickson BH (1966a). Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. J Reprod Fertil 11:97-105.

Espey LL (1994). Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. Biol Reprod 50:233-238.

Everett J (1994). Pituitary and hypothalamus: perspectives and overview. In: Knobil E, Neill J, editors. The Physiology of Reproduction.New York:Raven Press. p. 1509-1526.

Fagbohun CF, Downs SM (1990). Maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex: Stimulation by lectins. Biol Reprod 42:413-423.

Fair T, Hyttel P, Greve T (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. Mol Reprod Dev 42:437-442.

Fan HY, Huo LJ, Chen DY, Schatten H, Sun QY (2004). Protein kinase C and mitogen-activated protein kinase cascade in mouse cumulus cells: cross talk and effect on meiotic resumption of oocyte. Biol Reprod 70:1178-1187.

Fazzini M, Vallejo G, Colman-Lerner A, Trigo R, Campo S, Baranao JL, Saragueta PE (2006). Transforming growth factor beta1 regulates follistatin mRNA expression during in vitro bovine granulosa cell differentiation. J Cell Physiol 207:40-48.

Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. Theriogenology 71:836-848.

Fortune JE (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. Biol Reprod 50:225-232.

Fouladi Nashta AA, Waddington D, Campbell KHS (1998). Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development in vitro: A comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. Biol Reprod 59:255-262.

Freudzon L, Norris RP, Hand AR, Tanaka S, Saeki Y, Jones TL, Rasenick MM, Berlot CH, Mehlmann LM, Jaffe LA (2005). Regulation of meiotic prophase arrest in mouse oocytes by GPR3, a constitutive activator of the Gs G protein. J Cell Biol 171:255-265.

Generoso WM, Katoh M, Cain KT, Hughes LA, Foxworth LB, Mitchell TJ, Bishop JB (1989). Chromosome malsegregation and embryonic lethality induced by treatment of normally ovulated mouse oocytes with nocodazole. Mutat Res 210:313-322.

Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. Hum Reprod Update 14:159-177.

Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT (2004). Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. Anim Reprod Sci 82-83:431-446.

Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K (2001a). Follicle selection in monovular species. Biol Reprod 65:638-647.

Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Kot K (2001b). Follicle Selection in Cattle: Relationships among Growth Rate, Diameter Ranking, and Capacity for Dominance. Biol Reprod 65:345-350.

Gjorret JO, Knijn HM, Dieleman SJ, Avery B, Larsson LI, Maddox-Hyttel P (2003). Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. Biol Reprod 69:1193-1200.

Gordon I, Lu KH (1990). Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. Theriogenology 33:77-87.

Gore-Langton RE, Armstrong DT (1994). Follicular Steroidogenesis and its Control. In: Knobil E, Neill J, editors. The Physiology of Reproduction.New York:Raven Press, Ltd. p. 571-627.

Gougeon A, Ecochard R, Thalabard JC (1994). Age-related changes of the population of human ovarian follicles: Increase in the disappearance rate of non-growing and early- growing follicles in aging women. Biol Reprod 50:653-663.

Gutierrez CG, Campbell BK, Webb R (1997). Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. Biol Reprod 56:608-616.

Hagemann LJ, Beaumont SE, Berg M, Donnison MJ, Ledgard A, Peterson AJ, Schurmann A, Tervit HR (1999). Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: Interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. Mol Reprod Dev 53:451-458.

Hammond JM, Hersey RM, Walega MA, Weisz J (1986). Catecholestrogen production by porcine ovarian cells. Endocrinology 118:2292-2299.

Handyside AH, Delhanty JD (1997). Preimplantation genetic diagnosis: strategies and surprises. Trends Genet 13:270-275.

Hazeleger NL, Hill DJ, Stubbing RB, Walton JS (1995). Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. Theriogenology 43:509-522.

Hendriksen PJM, Vos PLAM, Steenweg WNM, Bevers MM, Dieleman SJ (2000). Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. Theriogenology 53:11-20.

Hinckley M, Vaccari S, Horner K, Chen R, Conti M (2005). The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes. Dev Biol 287:249-261.

Hirshfield AN (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. Int Rev Cytol 124:43-101.

Hirshfield AN (1994). Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. Biol Reprod 50:421-428.

Hodges CA, Ilagan A, Jennings D, Keri R, Nilson J, Hunt PA (2002). Experimental evidence that changes in oocyte growth influence meiotic chromosome segregation. Hum Reprod 17:1171-1180.

Hsieh M, Lee D, Panigone S, Horner K, Chen R, Theologis A, Lee DC, Threadgill DW, Conti M (2007). Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. Mol Cell Biol 27:1914-1924.

Hsueh AJW, Billig H, Tsafriri A (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controled apoptotic process. ER 15:707-724.

Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating MJ, Plunkett W (2000). Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells [see comments]. Nature 407:390-395.

Hunt PA, Hassold TJ (2002). Sex matters in meiosis. Science 296:2181-2183.

Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology 47:23-32.

Hyttel P, Viuff D, Laurincik J, Schmidt M, Thomsen PD, Avery B, Callesen H, Rath D, Niemann H, Rosenkranz C, Schellander K, Ochs RL, Greve T (2000). Risks of in-vitro production of cattle and swine embryos: aberrations in chromosome numbers, ribosomal RNA gene activation and perinatal physiology. Hum Reprod 15 Suppl 5:87-97.

Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM (1997). Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through the cyclic adenosine 3',5'- monophosphate signaling pathway. Biol Reprod 57:1484-1489.

Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. Nature 428:145-150.

Kachadourian R, Liochev SI, Cabelli DE, Patel MN, Fridovich I, Day BJ (2001). 2-Methoxyestradiol does not inhibit superoxide dismutase. Arch Biochem Biophys 392:349-353.

Kalinowski RR, Berlot CH, Jones TL, Ross LF, Jaffe LA, Mehlmann LM (2004). Maintenance of meiotic prophase arrest in vertebrate oocytes by a Gs protein-mediated pathway. Dev Biol 267:1-13.

Klauber N, Parangi S, Flynn E, Hamel E, D'Amato RJ (1997). Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol. Cancer Res 57:81-86.

Knight PG, Glister C (2003). Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. Anim Reprod Sci 78:165-183.

Kotsuji F, Kubo M, Tominaga T (1994). Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. J Reprod Fertil 100:151-156.

Krohn PL (1967). Factors influencing the number of oocytes in the ovary. Arch Anat Microscop Morphol Exp 56:151-159.

Kruip TA, Dieleman SJ (1982). Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. Reprod Nutr Dev 22:465-473.

Lanuza GM, Fischman ML, Barañao JL (1998). Growth promoting activity of oocytes on granulosa cells is decreased upon meiotic maturation. Dev Biol 197:129-139.

Leibfried L, First NL (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. J Anim Sci 48:76-86.

Lerner AAC, Salamone DF, Chiappe ME, Barañao JL (1995). Comparative studies between freshly isolated and spontaneously immortalized bovine granulosa cells: Protein secretion, steroid metabolism, and responsiveness to growth factors. J Cell Physiol 164:395-403.

Liu L, Trimarchi JR, Keefe DL (2002). Haploidy but not parthenogenetic activation leads to increased incidence of apoptosis in mouse embryos. Biol Reprod 66:204-210.

Liu Z, Foote RH (1995). Effects of amino acids on the development of in-vitro matured in- vitro fertilization bovine embryos in a simple protein-free medium. Hum Reprod 10:2985-2991.

Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. Mol Reprod Dev 37:48-53.

Lussier JG, Matton P, Dufour JJ (1987). Growth rates of follicles in the ovary of the cow. J Reprod Fertil 81:301-307.

Magnusson C, Billing H, Aneroth P, Roos p, Hillensjo T (1982). Comparison between the progestin secretion responsiveness to gonadotropin of rat cumulus and mural granulosa cells in vitro. Acta Endocr 101:611-616.

Mailhes JB, Carabatsos MJ, Young D, London SN, Bell M, Albertini DF (1999). Taxol-induced meiotic maturation delay, spindle defects, and aneuploidy in mouse oocytes and zygotes. Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen 423:79-90.

Masui Y, Wang P (1998). Cell cycle transition in early embryonic development of Xenopus laevis. Biol Cell 90:537-548.

Matikainen T, Perez GI, Jurisicova A, Pru JK, Schlezinger JJ, Ryu HY, Laine J, Sakai T, Korsmeyer SJ, Casper RF, Sherr DH, Tilly JL (2001). Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. Nat Genet.

McGee EA, Hsueh AJ (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocr Rev 21:200-214.

Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, Brennan TJ, Evsikov AV, Pendola FL, Knowles BB, Eppig JJ, Jaffe LA (2004). The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. Science 306:1947-1950.

Mermillod P, Tomanek M, Marchal R, Meijer L (2000). High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. Mol Reprod Dev 55:89-95.

Mingoti GZ, Garcia JM, Silva AA (2002). Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids. Anim Reprod Sci 69:175-186.

Monniaux D, Monget P, Besnard N, Huet C, Pisselet C (1997). Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. Theriogenology 47:3-12.

Moor RM, Dai Y, Lee C, Fulka J, Jr. (1998). Oocyte maturation and embryonic failure. Hum Reprod Update 4:223-236.

Navara CS, First NL, Schatten G (1994). Microtubule organization in the cow during fertilization, polyspermy, parthenogenesis, and nuclear transfer: The role of the sperm aster. Dev Biol 162:29-40.

Odorisio T, Rodriguez TA, Evans EP, Clarke AR, Burgoyne PS (1998). The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis. Nat Genet 18:257-261.

Oussaid B, Mariana JC, Poulin N, Fontaine J, Lonergan P, Beckers JF, Cognie Y (1999). Reduction of the developmental competence of sheep oocytes by inhibition of LH pulses during the follicular phase with a GnRH antagonist. J Reprod Fertil 117:71-77.

Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H (1992). Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. Mol Reprod Dev 31:63-67.

Pederson T (1970). Follicle kinetics in the ovary of the cyclic mouse. Acta Endocrinol 64:304-323.

Pederson T, Peters H (1971). Follicle growth and cell dynamics in the mouse ovary during pregnancy. Fertil Steril 22:42-52.

Picton H, Briggs D, Gosden R (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. Mol Cell Endocr 145:27-37.

Picton HM (2001). Activation of follicle development: the primordial follicle. Theriogenology 55:1193-1210.

Pincus G, Enzmann EV (1935). The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro I. The activation of ovarian eggs. J Exp Med 62:665-675.

Reynaud K, Driancourt MA (2000). Oocyte attrition. Mol Cell Endocrinol 163:101-108.

Richard FJ, Fortier MA, Sirard MA (1997). Role of the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase in the control of meiotic resumption in bovine oocytes cultured with thecal cell monolayers. Biol Reprod 56:1363-1369.

Richard FJ, Sirard MA (1996a). Effects of follicular cells on oocyte maturation .2. Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. Biol Reprod 54:22-28.

Richard FJ, Sirard MA (1996b). Effects of follicular cells on oocyte maturation .1. Effects of follicular hemisections on bovine oocyte maturation in vitro. Biol Reprod 54:16-21.

Roberts AJ, Echternkamp SE (1994). In Vitro Production of Estradiol by Bovine Granulosa Cells: Evaluation of Culture Condition, Stage of Follicular Development, and Location of Cells within Follicles. Biol Reprod 51:273-282.

Robles R, Morita Y, Mann KK, Perez GI, Yang S, Matikainen T, Sherr DH, Tilly JL (2000). The aryl hydrocarbon receptor, a basic helix-loop-helix transcription factor of the PAS gene family, is required for normal ovarian germ cell dynamics in the mouse. Endocrinology 141:450-453.

Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM, Romas NA (1991). Sex hormone-binding globulin: anatomy and physiology of a new regulatory system. J Steroid Biochem Mol Biol 40:813-820.

Rouillier P, Matton P, Dufour M, Sirard MA, Guilbault LA (1998). Steroid production, cell proliferation, and apoptosis in cultured bovine antral and mural granulosa cells: Development of an in vitro model to study estradiol production. Mol Reprod Dev 50:170-177.

Russe I (1983). Oogenesis in cattle and sheep. Bibl Anat 24:77-92.

Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge ML, First NL (1991). In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. Biol Reprod 44:256-260.

Salamone DF, Valdez A, Barañao JL (1995). Development of bovine IVF embryos in a CR-1 culture medium supplemented with albumin or serum. p. 312.

Schutze N, Vollmer G, Wunsche W, Grote A, Feit B, Knuppen R (1994). Binding of 2-hydroxyestradiol and 4-hydroxyestradiol to the estrogen receptor of MCF-7 cells in cytosolic extracts and in nuclei of intact cells. Exp Clin Endocrinol 102:399-408.

Sela-Abramovich S, Chorev E, Galiani D, Dekel N (2005). Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. Endocrinology 146:1236-1244.

Shang W, Konidari I, Schomberg DW (2001). 2-Methoxyestradiol, an Endogenous Estradiol Metabolite, Differentially Inhibits Granulosa and Endothelial Cell Mitosis: A Potential Follicular Antiangiogenic Regulator. Biol Reprod 65:622-627.

Shimoda SL, Solomon F (2002). Integrating functions at the kinetochore. Cell 109:9-12.

Silberzahn P, Almahbobi G, Dehennin L, Merouane A (1985). Estrogen metabolites in equine ovarian follicles: gas chromatographic- mass spectrometric determinations in relation to follicular ultrastructure and progestin content. J steroid Biochem 22:501-505.

Sirard MA, Bilodeau S (1990a). Effects of granulosa cell co-culture on in-vitro meiotic resumption of bovine oocytes. J Reprod Fertil 89:459-465.

Sirard MA, Bilodeau S (1990b). Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes in vitro. Biol Reprod 43:777-783.

Sirard MA, Coenen K (1993). The co-culture of cumulus-enclosed bovine oocytes and hemi-sections of follicles: Effects on meiotic resumption. Theriogenology 40:933-942.

Sirard MA, First NL (1988). In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. Biol Reprod 39:229-234.

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 40:1257-1263.

Skinner MK, Osteen KG (1988). Developmental and hormonal regulation of bovine granulosa cell function in the preovulatory follicle. Endocrinology 123:1668-1675.

Smitz J, Cortvrindt R, Hu Y (1998). Epidermal growth factor combined with recombinant human chorionic gonadotrophin improves meiotic progression in mouse follicle-enclosed oocyte culture. Hum Reprod 13:664-669.

Smitz JE, Cortvrindt RG (2002). The earliest stages of folliculogenesis in vitro. Reproduction 123:185-202.

Spicer LJ, Hammond JM (1989). Regulation of ovarian function by catecholestrogens: Current concepts. J steroid Biochem 33:489-501.

Spicer LJ, Walega MA, Hammond JM (1987). Metabolism of [3H]2-hydroxyestradiol by cultured porcine granulosa cells: evidence for the presence of a catechol-O- methyltransferase pathway and a direct stimulatory effect of 2- methoxyestradiol on progesterone production. Biol Reprod 36:562-571.

Su YQ, Denegre JM, Wigglesworth K, Pendola FL, O'Brien MJ, Eppig JJ (2003). Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex. Dev Biol 263:126-138.

Su YQ, Rubinstein S, Luria A, Lax Y, Breitbart H (2001). Involvement of MEK-mitogen-activated protein kinase pathway in follicle-stimulating hormone-induced but not spontaneous meiotic resumption of mouse oocytes. Biol Reprod 65:358-365.

Su YQ, Wigglesworth K, Pendola FL, O'Brien MJ, Eppig JJ (2002). Mitogen-activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. Endocrinology 143:2221-2232.

Suss U, Wuthrich K, Stranzinger G (1988). Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro. Biol Reprod 38:871-880.

Takahashi M, Keicho K, Takahashi H, Ogawa H, Schultz RM, Okano A (2000). Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. Theriogenology 54:137-145.

Tekpetey FR, Armstrong DT (1994). Catecholestrogen modulation of steroid production by rat luteal cells: mechanism of action. Mol Cell Endocrinol 101:49-57.

Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE (1972). Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. J Reprod Fertil 30:493-497.

Thomas RE, Armstrong DT, Gilchrist RB (2004a). Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosophate levels. Biol Reprod 70:548-556.

Thomas RE, Thompson JG, Armstrong DT, Gilchrist RB (2004b). Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. Biol Reprod 71:1142-1149.

Tilly JL (1996). Apoptosis and ovarian function. Rev Reprod 1:162-172.

Tilly JL, Kowalski KI, Schomberg DW, Hsueh AJW (1992). Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. Endocrinology 131:1670-1676.

Tilly JL, Telfer EE (2009). Purification of germline stem cells from adult mammalian ovaries: a step closer towards control of the female biological clock? Mol Hum Reprod 15:393-398.

Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL (1995). Expression of members of the Bcl-2 gene family in the immature rat ovary: Equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-x_{long} messenger ribonucleic acid levels. Endocrinology 136:232-241.

Tsafriri A, Channing CP (1975). An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis in vitro. Endocrinology 96:922-927.

Van Aswegen CH, Purdy RH, Wittliff JL (1989). Binding of 2-hydroxyestradiol and 4-hydroxyestradiol to estrogen receptors from human breast cancers. J steroid Biochem 32:485-492.

Van den Hurk R, Zhao J (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. Theriogenology 63:1717-1751.

Van Tol HT, Bevers MM (1998a). Theca cells and theca-cell conditioned medium inhibit the progression of FSH-induced meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. Mol Reprod Dev 51:315-321.

Van Tol HTA, Bevers MM (1998b). Theca cells and theca-cell conditioned medium inhibit the progression of FSH-Induced meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. Mol Reprod Dev 51:315-321.

Van Tol HTA, Van Eijk MJT, Mummery CL, Van den Hurk R, Bevers MM (1996). Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. Mol Reprod Dev 45:218-224.

Viuff D, Greve T, Avery B, Hyttel P, Brockhoff PB, Thomsen PD (2000). Chromosome aberrations in in vitro-produced bovine embryos at days 2-5 post-insemination. Biol Reprod 63:1143-1148.

Viuff D, Rickords L, Offenberg H, Hyttel P, Avery B, Greve T, Olsaker I, Williams JL, Callesen H, Thomsen PD (1999). A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. Biol Reprod 60:1273-1278.

Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG (2004). Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. J Anim Sci 82 E-Suppl:E63-E74.

Zenzes MT, Wang P, Casper RF (1995). Cigarette smoking may affect meiotic maturation of human oocytes. Hum Reprod 10:3213-3217.

Zoller LC, Weisz J (1979b). Identification of cytochrome P-450, and its distribution in the membrana granulosa of the preovulatory follicle using quantitative cytochemistry. Endocrinology 103:310-318.

Zoller LC, Weisz J (1979a). A quantitative cytochemical study of glucose-6-phosphate dehydrogenase and (delta)5β-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the membrana granulosa of the ovulable type of follicle of the rat. Histochemistry 62:125-134.