

En esta sección los trabajos presentados deberán reunir las siguientes condiciones:

1. Deberán estar escritos en castellano.
2. Preferentemente en Word.
3. No deberán superar preferentemente las 25 carillas de hoja tamaño A4, escritas en cuerpo de letra 12, a doble espacio.
4. El ordenamiento de los mismos deberá seguir la estructura clásica de:
 - a. Título.
 - b. Autores, centro al que pertenecen y correo electrónico de contacto.
 - c. Resumen en castellano y en inglés (excluyente) de no más de 200 palabras.
 - d. Palabras clave: no más de 5 (cinco).
 - e. Introducción.
 - f. Material y métodos.
 - g. Resultados.
 - h. Discusión.
5. Las abreviaturas deberán ser definidas al ser mencionadas por primera vez,

excepto aquellas aceptadas por convención (por ejemplo, FIV, ICSI, etc).

6. Tablas y cuadros: en blanco y negro, teniendo especial cuidado de ser bien referidos desde el texto.
 7. Figuras: todas serán en blanco y negro.
 8. Bibliografía: las citas se harán en el texto y se ordenarán en forma correlativa al final del trabajo por orden de aparición. Las citas de revistas deberán consignarse de la siguiente manera:
 - a) apellido completo e iniciales de los 3 primeros autores, sin puntos y separados por comas; si hubiera más, puede colocarse "et al"; b) título del trabajo; c) abreviatura del nombre de la revista (tal como figuran en el Index Medicus); y e) año, volumen, número de la revista (optativo), página inicial y final.
- En todos los casos el envío de trabajos, comentarios y publicaciones deberá hacerse por correo electrónico a la dirección de la secretaria de SAMeR: info@samer.org.ar

Utilidad de la localización de la vesícula germinal para la adecuada maduración nuclear y citoplasmática luego de maduración *in vitro*

Cristian Álvarez Sedó,¹ Mariano Lavolpe,² Heydy Uriondo Boudri,³ Evelyn Barrios,³ Valeria Longobucco,³ Felicitas Noblía,⁴ Florencia Nodar⁵

¹ Director del Laboratorio de Biología y Genética Reproductiva

² Sub-director del Laboratorio de Embriología

³ Miembro del Laboratorio de Embriología

⁴ Coordinadora del Laboratorio de Embriología

⁵ Directora del Laboratorio de Embriología

CEGYR (Centro de Estudios en Genética y Reproducción). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Reproducción 2015;30:4-13

Resumen

En el ámbito de las técnicas de reproducción asistida y el laboratorio de fecundación in vitro, la morfología oocitaria y embrionaria son herramientas fundamentales al momento de clasificar y seleccionar los elementos de mejor calidad. La maduración in vitro de oocitos inmaduros (profase I) obtenidos tanto desde el ovario sin estimulación ovárica controlada, o desde la punción ovárica luego de estimulación ovárica controlada dentro de los tratamientos de reproducción asistida, es una técnica que hoy en día se ha puesto en ejercicio con mediano éxito.

La posibilidad de buscar marcadores que faciliten la selección de oocitos de buena calidad luego de la maduración in vitro podría ser útil a fin de buscar mejoras en esta técnica. Se ha demostrado en modelos animales que la localización de la GV en el citoplasma oocitario podría ser útil para este propósito. Nuestro trabajo busca robustecer los hallazgos encontrados en relación a este tema mediante la evaluación de una serie de marcadores relacionados a la calidad oocitaria desde el punto de vista metabólico, maduración nuclear y citoplasmática, velocidad de maduración (mediante monitoreo continuo) y alteraciones de la placa metafásica. Para lo cual se realizó la selección de las GV a partir de oocitos remanentes de los tratamientos de reproducción asistida y se identificó la posición de la GV, pudiendo ser central o periférica, a fin de usar esta característica como marcador diferencial.

Correspondencia: Cristian Álvarez Sedó
Viamonte 1432
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
Tel.: 4372-8289
E-mail: calvarez@cegyr.com

Nuestro resultado avala el hecho de que la posición central de la GV en oocitos profase I, que son sometidos a maduración in vitro, genera oocitos de mejor calidad. Este hecho es muy positivo debido a su potencial utilidad al momento de la selección de oocitos para dicha técnica.

Palabras claves. Vesícula germinal, maduración, núcleo, citoplasma.

Germinal vesicle localization: a useful method to determine an adequate nuclear and cytoplasmic oocyte maturation

Summary

For many years, in assisted reproduction and in vitro fertilization field, oocyte and embryo morphology have been fundamental tools to classify and select the best quality embryos for transfer. Considering the IVF laboratory, the daily efforts of embryologists and technological advances have allowed the improvement of reproductive outcomes. Currently, in vitro maturation (IVM) of immature oocytes (prophase I), obtained from the ovaries, with or without ovarian stimulation, is a technique that has been applied with average results. Discovering molecular markers that facilitate the selection of good quality oocytes after spontaneous IVM may be an improvement for this technique. It has been demonstrated in animal models that the GV localization in the oocyte cytoplasm would be useful for this purpose. Our findings try to support the outcomes in relation with this subject, by the assessment of several markers related to oocyte quality, such as: metabolic pathways, nuclear and cytoplasmic maturation, maturation rate (by time lapse) and metaphase plate anomalies. The objective of this study was to determine whether there are differences in oocyte maturation (nuclear and cytoplasmic) after IVM of immature oocytes from at GV stage: central (C) or peripheral (P). For the present study, 86 GV oocytes were recruited, corresponding to 38 couples that underwent to ART treatments. The period was from April 2013 - July 2014. This study was conducted under the approval of the Academic and Institutional Ethical Committee. Oocytes were obtained immediately after 36 hours after hCG administration. All oocytes were collected from wo-

men under 39 years old (36.2 ± 2.4). Oocytes were classified considering their GV position (central or peripheral). Oocytes were incubated under IVM conditions and time-lapse monitoring for 24 hours. After that, oocytes were incubated by brilliant cresyl blue for the assessment Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. Then, oocytes were fixed for immunocytochemistry (ICC) analysis. MPF, tubulins and DNA status were evaluated. Time of first polar body extrusion was assessed by the analysis of time-lapse imaging. It was observed that the oocytes after 24 hours of in vitro maturation, showed differences in the rate to reach metaphase II stage, it was shown that the highest rate of maturation was related to oocytes with central position of the germinal vesicle. The first polar body time extrusion was quantified by observing the image sequence, where it was observed that the oocytes (central GV position) had a faster maturation than GV's at peripheral position. Our results correlate with the theory that central position of GV in prophase I oocytes after IVM conditions produces better quality oocytes. This morphological oocyte feature could be useful to select better mature oocytes after IVM.

Key words. Germinal vesicle, maturation, nucleus, cytoplasm.

Introducción

Si nos hacemos la pregunta sobre el significado de la morfología oocitaria y su relación con la calidad de la misma, podríamos decir que en el laboratorio de fecundación *in vitro* la calidad del oocito se evalúa mediante inspección visual y la morfología es la herramienta más útil y práctica para determinar la "calidad del oocito". Un oocito de buena calidad posee una zona que es perfectamente redonda, sin distorsiones, uniforme en grosor y tamaño. Un oocito de mala calidad puede tener una zona demasiado gruesa, lo que puede dificultar la normal eclosión del embrión e impedir la implantación, o una zona que es demasiado grande para el ooplasma, lo que puede permitir al ooplasma flotar por el interior y llegar a ser potencialmente dañado. El ooplasma contiene el núcleo del oocito y muchas sustancias necesarias para el crecimiento y desarrollo del mismo. Un oocito de buena calidad tiene un color uniforme y su oo-

plasma es ligeramente granular. El ooplasma también debe estar libre de vacuolas o de “artefactos” que aparecen como nódulos oscuros. Los oocitos de mala calidad pueden parecer oscuros, con signos de degeneración, o bien con áreas focalizadas de granularidad intensa.¹

Los oocitos permanecen detenidos en la profase de la primera división meiótica, estadio denominado vesícula germinal (GV).² La maduración de los oocitos seleccionados dentro de los folículos es inducida por el pico de LH, y se manifiesta por el desensamblaje de la membrana nuclear e inicio de la condensación de los cromosomas (GVBD). En esa región de condensación se inicia la formación del huso de actina (F-actina), seguido por la segregación de los cromosomas homólogos, salida del primer cuerpo polar (SPCP), formación del huso y una detención en la metafase de la segunda división meiótica (MII).³ Una vez fecundado, el oocito sale de su detención en MII y se produce la extrusión del segundo cuerpo polar que indica la finalización de las divisiones meióticas asimétricas.⁴ La polaridad de los oocitos y las divisiones meióticas asimétricas juegan un papel importante en el mantenimiento de organelas, proteínas y ARNs dentro del ooplasma y son importantes para el desarrollo embrionario normal.

Los mecanismos de la división asimétrica en oocitos de ratón y humanos son diferentes. El huso formado luego de la GVBD en el ratón se inicia en el centro y migra a lo largo de su eje hacia la región más cercana de la corteza del oocito.⁵ La GV en los oocitos humanos se ha reportado que se encuentra periféricamente en la mayoría de los oocitos, lo que permite una migración radial más corta del huso de la metafase I.⁶⁻⁷ Por otro lado, se ha demostrado que los oocitos competentes de ratón exhiben GVs principalmente centrales y se ha sugerido que la posición de la GV dentro de oocitos de ratón jóvenes puede ser utilizada como un marcador morfológico para la predicción de su competencia en la maduración *in vitro*.⁸ Otros estudios han evidenciado que los oocitos en GV que presentan un anillo de cromatina alrededor del nucléolo podrían ser considerados como otro marcador de calidad, así las GV que carecen de cromatina en anillo permanecen transcripcionalmente activas y sintetizan todas las clases de ARN, mientras que los oocitos con anillo de cromatina

son transcripcionalmente inactivos.⁹ El anillo de cromatina en los oocitos de ratón se forma 1 h antes de la GVBD; en ese momento los filamentos de microtúbulos (MT) citoplasmáticos y de la GV se hacen más cortos.¹⁰ Observaciones en oocitos humanos y ratones sugieren que los complejos organizadores de MT (MTOCs) se congregan en el centro del oocito, donde contribuyen a un aumento masivo en el número de MTs después de la GVBD formando el huso de la metafase (sin centrosoma) en forma de barril.¹¹ Varias líneas de investigación han evidenciado que Fyn, una quinasas de la familia Src se localiza en el huso y la corteza de oocito, participando tanto en la GVBD⁴ y en la estabilización de los MTs.¹² En consiguiente, se ha reportado la disminución en la fertilidad en ratones *knock-out* para Fyn.¹³⁻¹⁴

La maduración *in vitro* (IVM) puede servir como una alternativa al tratamiento convencional de FIV para mujeres que sufren de síndrome de ovario poliquístico, síndrome de hiperestimulación ovárica o fracasos repetidos de FIV, así como en los casos de “banking” o donación de oocitos y preservación de la fertilidad en pacientes jóvenes. Sin embargo, a pesar de la mejora significativa en la tasa de embarazos logrados a partir de oocitos humanos fecundados luego de IVM, aún es considerada como parcialmente eficaz, posiblemente debido a que la meiosis de oocitos humanos es muy propensa a presentar errores.¹⁵ Los genomas del oocito y del espermatozoide participan igualmente en la creación del genoma embrionario. Dado que el citoplasma del oocito se convierte en el citoplasma del embrión, la calidad del oocito es un factor clave que determina la calidad del embrión temprano en desarrollo.¹⁶ Además, cabe recordar que durante las primeras etapas de desarrollo del embrión no se produce transcripción del ADN, por lo que los primeros pasos de la embriogénesis se controlan por la información almacenada en el oocito.

En los mamíferos, dos factores, el factor promotor de la maduración (MPF) y las proteínas quinasas mitogenoactivadas (MAPK) participan de manera decisiva en la maduración del oocito. En relación a las MAPK, se ha descrito que su actividad permite el adecuado progreso de la meiosis y la detención del oocito en MII luego de la extrusión del primer cuerpo polar. Por otro lado, el

MPF es considerado el responsable del reinicio de la meiosis en los oocitos detenidos en la profase.¹⁷ El MPF está constituido por una subunidad catalítica, la quinasa dependiente de ciclinas (cdc2) y la unidad reguladora, la ciclina B. Esta última recibe ese nombre debido a que su concentración oscila durante el ciclo celular. La cantidad de moléculas de MPF depende de la disponibilidad de ciclina en el citoplasma capaz de conjugarse con la cdc2, unidad que es estable en el oocito durante el ciclo celular. El MPF aumenta su concentración durante la maduración oocitaria, alcanzando su pico máximo durante el estadio de MII. El complejo es sometido a una serie de fosforilaciones y desfosforilaciones. Así, si la cdc2 es fosforilada en el residuo treonina 161 (T161), el sistema se encuentra activado, por ejemplo, desde la Anafase I-Telofase I (AI-TI) hasta llegar a MII. Por otro lado, si cdc2 es fosforilada en el residuo tirosina 15 (Y15), el sistema se encontrará inactivado. La activación del MPF se autorregula por un sistema de retroalimentación positivo a partir de las moléculas activas que se incrementan en el oocito.¹⁸ La activación del sistema de MPF produce la despolimerización de la membrana nuclear dando como resultado la desaparición o ruptura de la envoltura nuclear y el proceso de empaquetamiento de la cromatina. El MPF también activa proteínas asociadas a los microtúbulos denominadas proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK).¹⁹⁻²⁰

Al finalizar la maduración, el MPF ha alcanzado su máxima concentración y el oocito maduro se encuentra detenido en MII. Este estado de detención es exclusivo del mismo y está regulado por el factor cistostático (CSF). Este complejo tiene como función estabilizar al MPF, mantener a los cromosomas condensados y evitar una segunda ronda de replicación del ADN durante la transición de metafase I (MI) a MII.²¹ Respecto a la fosforilación específica de Cdc2 en el residuo de Y15 podemos decir que éste se encuentra en un nivel intermedio durante el estadio de GV respecto a los niveles encontrados en el estadio de MII en el cual el nivel de esta proteína (Y15) es idealmente nula. Entre los estadios de MI y MII (Anafase I y Telofase I) los niveles de MPF sufren una caída en su nivel, en consecuencia, en este momento los niveles de proteína quinasa dependiente de ciclinas en su forma inactiva (pCdc2 Y15) sufren un

incremento. Es durante la detención del oocito en MII que los niveles de pCdc2 Y15 se mantienen en un nivel mínimo y junto con otros mecanismos actuantes el oocito llega a su madurez nuclear y citoplasmática. Entonces los factores del CSF cumplirán su rol en el mantenimiento de la detención en este estadio del desarrollo del oocito.²²

Finalmente, la selección de gametos y embriones en Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) es un aspecto relevante cuando se piensa en mejorar los resultados reproductivos. En relación a IVM, en la actualidad las estrategias de evaluación de oocitos se basan principalmente en criterios de morfología básicamente relacionados a la cantidad de células del cúmulus y aspecto del citoplasma. A pesar de que este sistema ha tenido éxito para mejorar las tasas de éxito de la técnica, su precisión es todavía insuficiente. Por lo tanto, el desarrollo de una prueba objetiva, precisa y accesible podría facilitar la evaluación del potencial de los oocitos frente a IVM. Estrategias que implican genómica, transcriptómica y perfiles proteómicos de oocitos se han venido empleando para evaluar la calidad oocitaria. Sin embargo, son todos métodos invasivos que no permiten el posterior uso de los oocitos. Por lo tanto, hay una necesidad de marcadores que permitan predecir la calidad y competencia de los oocitos durante su maduración. En ese sentido, el objetivo del presente estudio fue determinar si existen diferencias en la maduración oocitaria (nuclear y citoplasmática) luego de IVM a partir de oocitos inmaduros cuya posición de la GV era central (C) o periférica (P).

Materiales y métodos

Población

Se consideraron de manera prospectiva 86 oocitos en estadio de GV correspondientes a 38 parejas que realizan tratamiento de TRA. El período comprendido fue desde abril de 2013 a julio de 2014. Este estudio se realizó bajo la aprobación de los comités de docencia y ética institucional.

Oocitos

Los oocitos utilizados para el presente estudio fueron obtenidos bajo consentimiento informado de parejas que participan en el programa de reproducción asistida de alta complejidad. Los oocitos fueron obtenidos inmediatamente luego de la as-

piración 36 horas después de la administración de hCG, siendo éstos provenientes de mujeres menores de 39 años de edad ($36,2 \pm 2,4$).

Reactivos y anticuerpos

Todos los reactivos, salvo excepciones, fueron obtenidos de *Sigma Chemical Co* (St. Louis, EE.UU.), *SAGE – Copper Surgical (Trumbull, CT, EE.UU.)*. Por otro lado, los anticuerpos primarios empleados fueron: pCdc2 (Y15), un anticuerpo monoclonal específico para la proteína fosforilada en el residuo de Tyr 15 (anticuerpo monoclonal anti-conejo, dil: 1:100, *Cell Signaling Technology Inc*, Massachusetts, EE.UU.); a su vez, se empleó el anticuerpo contra tubulinas acetiladas (anticuerpo monoclonal anti-ratón, dil: 1:100, *Sigma Chemical Co*).

Los anticuerpos secundarios empleados fueron: 488 anti-ratón, 594 anti-conejo (*Molecular Probes - Life Technologies*, Oregon, EE.UU.). La tinción del ADN se realizó mediante la utilización de *Hoechst 33342 (Molecular Probes - Life Technologies, Oregon, EE.UU.)*.

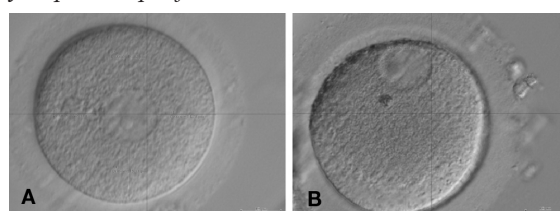
Maduración in vitro y monitoreo continuo

Los complejos cumulus oocito (COC) se recuperaron mediante la punción de los folículos guiada por ultrasonido a las 36 horas después de la administración de hCG. Los fluidos foliculares se colectarán en tubos de 15mL (*Dulbecco's*) y permanecieron a 37 °C en una gradilla térmica. El cultivo se realizó a 37°C, 6% CO₂, 5% O₂, 89% N₂, en una atmósfera humidificada. Los COCs se lavaron en medio (*Quinns Advantage Medium with HEPES, SAGE*), el cumulus se cortó con ayuda de 2 jeringas de 1 mL con agujas 30 G realizando pequeños cortes en los bordes del cumulus. Los oocitos fueron desnudados mediante la incubación con hialuronidasa. Los oocitos en estadio de GV fueron separados y cultivados por 24 horas en *Quinns Advantage Fertilization Medium (SAGE)*. Previamente se tomó registro fotográfico para determinar la localización de la vesícula germinal, es decir, si era central (C) o periférica (P) (Figura 1). Para lo cual se midieron los oocitos, así, la GV se definió como C cuando la distancia desde el centro del oocito al centro de la GV era menos de la mitad de la diferencia en las longitudes de los radios del oocitos y la GV. La GV se

definió como P cuando esta distancia era más de la mitad de la diferencia de radios.

Las GV fueron colocadas individualmente en las cápsulas de cultivo WOW (10 pozos) (*Cryo Management Ltd*, Hungría) y se cubrieron con aceite estéril. Seguidamente se dio inicio al monitoreo continuo durante la maduración *in vitro* (24 horas). Todas las imágenes de cultivo de los oocitos fueron capturadas por el sistema de vigilancia de "time-lapse". El microscopio compacto invertido con cámara digital (*Primo Vision, Cryo-*

Figura 1. Oocitos humanos en estadio de profase I donde se observa la vesícula germinal en posición central (C) (A) y en posición periférica (P) (B).



Innovación, Budapest, Hungría) se colocó dentro de una incubadora tri-gas (*Forma Scientific*) (Figura 2). El microscopio consta de un objetivo X10, un prisma, lente proyectiva, un dispositivo de 1,3 megapíxeles y una fuente de diodo emisor de luz. Un cable de comunicaciones permitió que las imágenes fueran transferidas a través de la unidad de control a un computador portátil. Las cápsulas WOW fueron colocadas en la parte superior de la ventana de cristal, en el portamuestras del microscopio. La iluminación fue proporcionada por una luz blanca reflejada caliente. El sistema

Figura 2. Equipamiento utilizado (*Primo Vision*) para monitoreo continuo.



piración 36 horas después de la administración de hCG, siendo éstos provenientes de mujeres menores de 39 años de edad ($36,2 \pm 2,4$).

Reactivos y anticuerpos

Todos los reactivos, salvo excepciones, fueron obtenidos de *Sigma Chemical Co* (St. Louis, EE.UU.), *SAGE – Copper Surgical (Trumbull, CT, EE.UU.)*. Por otro lado, los anticuerpos primarios empleados fueron: pCdc2 (Y15), un anticuerpo monoclonal específico para la proteína fosforilada en el residuo de Tyr 15 (anticuerpo monoclonal anti-conejo, dil: 1:100, *Cell Signaling Technology Inc*, Massachusetts, EE.UU.); a su vez, se empleó el anticuerpo contra tubulinas acetiladas (anticuerpo monoclonal anti-ratón, dil: 1:100, *Sigma Chemical Co*).

Los anticuerpos secundarios empleados fueron: 488 anti-ratón, 594 anti-conejo (*Molecular Probes - Life Technologies*, Oregon, EE.UU.). La tinción del ADN se realizó mediante la utilización de *Hoechst 33342 (Molecular Probes - Life Technologies, Oregon, EE.UU.)*.

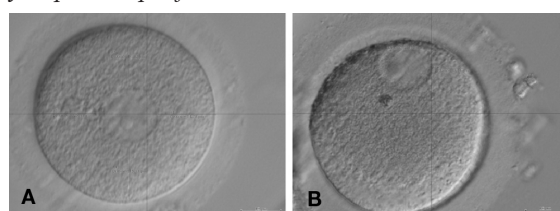
Maduración in vitro y monitoreo continuo

Los complejos cumulus oocito (COC) se recuperaron mediante la punción de los folículos guiada por ultrasonido a las 36 horas después de la administración de hCG. Los fluidos foliculares se colectarán en tubos de 15mL (*Dulbecco's*) y permanecieron a 37 °C en una gradilla térmica. El cultivo se realizó a 37°C, 6% CO₂, 5% O₂, 89% N₂, en una atmósfera humidificada. Los COCs se lavaron en medio (*Quinns Advantage Medium with HEPES, SAGE*), el cumulus se cortó con ayuda de 2 jeringas de 1 mL con agujas 30 G realizando pequeños cortes en los bordes del cumulus. Los oocitos fueron desnudados mediante la incubación con hialuronidasa. Los oocitos en estadio de GV fueron separados y cultivados por 24 horas en *Quinns Advantage Fertilization Medium (SAGE)*. Previamente se tomó registro fotográfico para determinar la localización de la vesícula germinal, es decir, si era central (C) o periférica (P) (Figura 1). Para lo cual se midieron los oocitos, así, la GV se definió como C cuando la distancia desde el centro del oocito al centro de la GV era menos de la mitad de la diferencia en las longitudes de los radios del oocitos y la GV. La GV se

definió como P cuando esta distancia era más de la mitad de la diferencia de radios.

Las GV fueron colocadas individualmente en las cápsulas de cultivo WOW (10 pozos) (*Cryo Management Ltd*, Hungría) y se cubrieron con aceite estéril. Seguidamente se dio inicio al monitoreo continuo durante la maduración *in vitro* (24 horas). Todas las imágenes de cultivo de los oocitos fueron capturadas por el sistema de vigilancia de "time-lapse". El microscopio compacto invertido con cámara digital (*Primo Vision, Cryo-*

Figura 1. Oocitos humanos en estadio de profase I donde se observa la vesícula germinal en posición central (C) (A) y en posición periférica (P) (B).



Innovación, Budapest, Hungría) se colocó dentro de una incubadora tri-gas (*Forma Scientific*) (Figura 2). El microscopio consta de un objetivo X10, un prisma, lente proyectiva, un dispositivo de 1,3 megapíxeles y una fuente de diodo emisor de luz. Un cable de comunicaciones permitió que las imágenes fueran transferidas a través de la unidad de control a un computador portátil. Las cápsulas WOW fueron colocadas en la parte superior de la ventana de cristal, en el portamuestras del microscopio. La iluminación fue proporcionada por una luz blanca reflejada caliente. El sistema

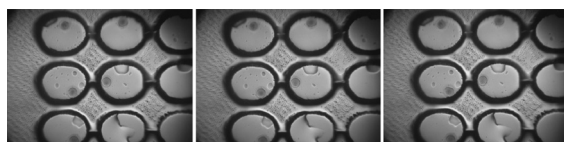
Figura 2. Equipamiento utilizado (*Primo Vision*) para monitoreo continuo.



fue configurado para tomar una sola imagen cada 10 minutos. Todas las imágenes fueron almacenadas para su análisis posterior (Figura 3). Se determinó el tiempo en horas de la SPCP.

Luego de las 24 horas de cultivo, se procedió a retirar la capsula para registrar y separar los oocitos que habían logrado la maduración hacia MII y los que no (GV o GVBD). El material fue llevado laboratorio de investigación en donde se evaluó *in vivo* la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) mediante la coloración de azul brillante de cresil (ABC). Seguidamente los oocitos fueron fijados para realizar la técnica de inmunocitoquímica.

Figura 3. Secuencia de imágenes obtenidas a menor aumento durante el monitoreo continuo a lo largo de la maduración *in vitro*.



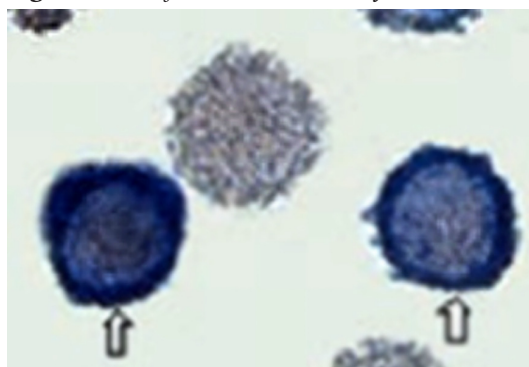
Inmunocitoquímica de oocitos humanos

Las células de cumulus y la zona pelúcida fueron removidas de los oocitos mediante el uso de hialuronidasa (1m/mL) y mediante Tyrodes acidificado (pH 2,5; Irvine Scientific, Sta Ana, CA), respectivamente. Los oocitos libres de la zona fue-

Actividad de G6PDH

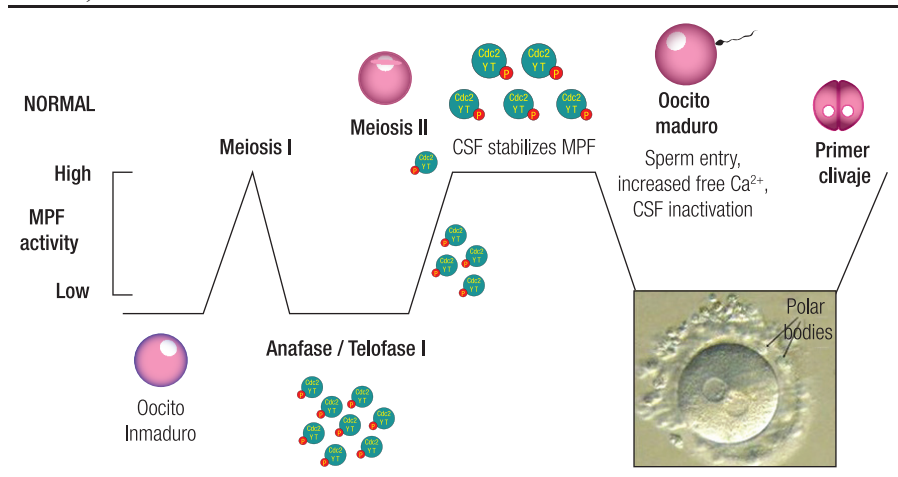
Inmediatamente después de la IVM, los oocitos fueron lavados tres veces en Dulbecco PBS (1X) modificado con la adición de 0,5% (w/v) BSA. Luego, los oocitos fueron expuestos al ABC diluido en PBS modificado durante 90 min a 37 °C en una atmósfera húmeda, luego fueron lavados dos veces, y se clasificaron de acuerdo a la coloración del citoplasma. Los oocitos con o sin coloración azul citoplasmática se designaron como ABC + y ABC-, respectivamente (Figura 4).

Figura 4. Una flecha indica ABC + y la otra ABC-.



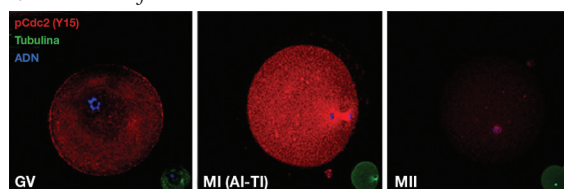
ron fijados por 40 minutos en formaldehído al 2% y permeabilizados con tritón X-100 al 0,1% en PBS (*buffer* fosfato salino). El bloqueo de sitios inespecíficos fue realizado mediante el uso de 0,3% de suero albúmina bovina (BSA) y 1% de suero de cabra en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Seguida-

Figura 5. Mecanismos de fosforilación en residuo de Treonina (activación) y Tirosina (inactivación) durante la maduración oocitaria.



mente, la incubación de los anticuerpos primarios y secundarios se realizó por toda la noche a 4°C y por 1 hora a temperatura ambiente, respectivamente. Finalmente, el ADN fue teñido con *Hoechst 33342* (10ug/mL) por un intervalo de 20 minutos. Las imágenes fueron capturadas en el microscopio de epifluorescencia *Olympus BX-40*. La captura de imágenes fue realizada mediante el programa *Act-2U*

Figura 6. Inmunocitoquímica para la evaluación de pCdc2. GV: Vesícula germinal, AI: Anafase I, TI: Telofase I, MII: Metafase II.



Análisis estadístico

El análisis estadístico utilizado fue el de Chi cuadrado. Se tomó en cuenta un $P \leq 0,05$ para establecer diferencias significativas. Se empleó el programa estadístico *MedCalc 11.6.2* (Bélgica).

Resultados

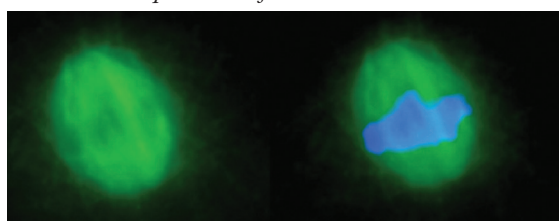
En la Tabla 1, se pueden evidenciar los resultados obtenidos luego de la maduración *in vitro* considerando la posición de la vesícula germinal. Se pudo observar que los oocitos luego de 24 horas de maduración *in vitro* presentaron diferencias en la tasa de llegada a metafase II, es decir, se evidenció que la mayor tasa de maduración estaba relacionada a la posición central de la vesícula germinal ($P < 0,05$). El tiempo de la salida del primer cuerpo polar fue cuantificado observando la secuencia de imágenes (Figura 8), donde se observó que los oocitos con la GV de posición central tuvieron una maduración más rápida que los oocitos de posición periférica.

La marcación de pCdc2 por la técnica de inmunocitoquímica evidenció que los oocitos que provienen de la GV central lograron una mejor y adecuada maduración nuclear y citoplasmática en comparación a las GV de posición periférica (Figura 9).

Se pudo evidenciar que el alineamiento de los microtúbulos de la placa metafásica, así como la or-

ganización de los cromosomas en la misma, se encontraba en mayor proporción alterada en los oocitos GV hacia MII del grupo P (Tabla 1, Figura 10). Finalmente, respecto a la actividad de la glucosa 6 fosfato-deshidrogenasa, no se evidenció diferencias significativas entre los dos tipo de oocitos.

Figura 7. Inmunocitoquímica que evidencia la correcta conformación de los microtúbulos y alineación de los cromosomas de la placa metafásica.



ganización de los cromosomas en la misma, se encontraba en mayor proporción alterada en los oocitos GV hacia MII del grupo P (Tabla 1, Figura 10).

Finalmente, respecto a la actividad de la glucosa 6 fosfato-deshidrogenasa, no se evidenció diferencias significativas entre los dos tipo de oocitos.

Figura 8. Cuantificación objetiva del tiempo en horas durante el monitoreo continuo de la maduración *in vitro*.

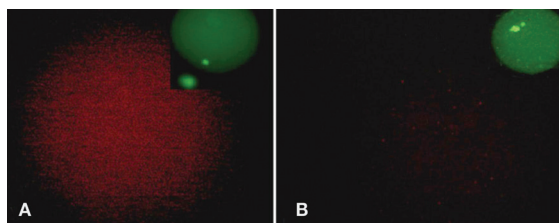


Figura 9. Inmunocitoquímica donde se evidencian oocitos en estadio de MII luego de IVM, y en A) inmadurez citoplasmática pCdc2-Y15 elevado, y en B) MII correctamente maduro.

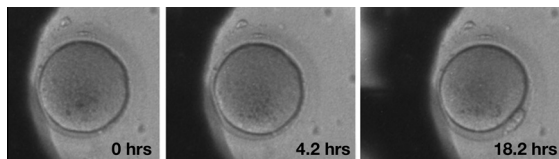
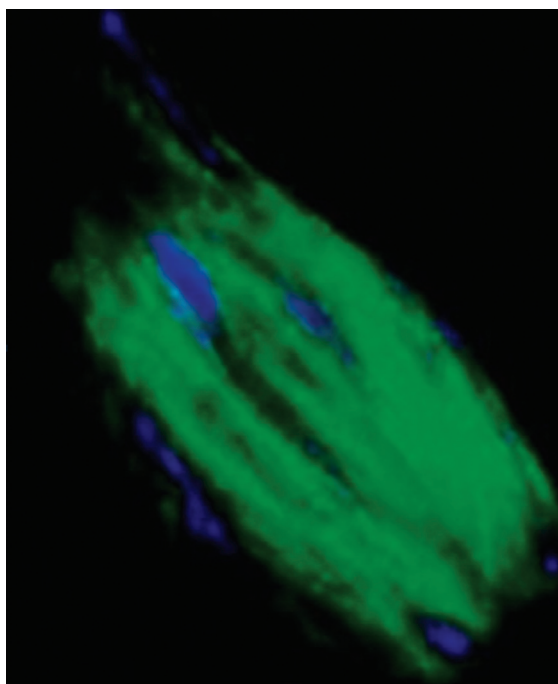


Tabla 1. Resultados de la evaluación de las variables cuantificadas durante la maduración *in vitro* a partir de oocitos en estadio de profase I considerando la posición de la GV.

	GV en posición C	GV en posición P	P
Edad femenina	37,1 ± 1,8	36,8 ± 2,6	NS
N° de oocitos en GV	38	48	
Tasa de llegada a MII	33 (86,8%)	27 (56,3%)	0,002
Tiempo en horas de salida del 1er cuerpo polar	16,7 ± 2,6	18,2 ± 2,1	0,02
Actividad de G6PDH (#BBC-) / (#BBC+)	17,9	28,6	NS
Maduración nuclear y citoplasmática asociada a pCdc2 Y15	81,8% (32)	62,9% (17)	0,04
Alteraciones microtúbulos y alineación de cromosomas	3 (9,1%)	9 (33,3%)	0,02

Figura 10. Alteraciones observadas en la placa metafásica tanto a nivel de la alineación de los microtúbulos como de los cromosomas.



Discusión

Un requisito previo para el desarrollo de un embrión es la penetración de un espermatozoide en un oocito MII maduro. Es conocido que no todos los oocitos recolectados durante los tratamientos de fecundación *in vitro* son maduros. Además, la recuperación de oocitos inmaduros seguida por IVM es una alternativa al tratamiento de FIV convencional.²³

El propósito del presente estudio fue evaluar la correlación entre la ubicación GV y los parámetros morfológicos y moleculares de oocitos huma-

nos, con el propósito de utilizar esa característica como predictor de la competencia en la maduración oocitaria. La ubicación de GV en oocitos humanos, como se demuestra en este estudio, es independiente de la edad y presenta una ubicación periférica en la mayoría de los casos. El presente estudio añade una observación clínica importante, indicando que una vez que se produce el rompimiento de la vesícula germinal (GVBD) en oocitos humanos con GV central, y comienza el proceso de maduración, el porcentaje de oocitos que completarán este proceso (salida del primer

cuerpo polar) con una adecuada maduración citoplasmática es significativamente mayor que en los oocitos con GV periférica. Si bien es cierto que son oocitos inmaduros excedentes producto de los tratamientos de reproducción asistida, en todos los casos se utilizaron oocitos (GV) que provenían de folículos de tamaños similares y no menores de 14 mm de diámetro.

Se ha descrito que los microtúbulos del citoplasma oocitario son los principales contribuyentes a la localización central de la GV. Se ha reportado que los filamentos de los microtúbulos en oocitos humanos son más densos en el citoplasma de oocitos con GV central que en el citoplasma de oocitos con GV periféricos. Una red de microtúbulos insuficiente o débil puede causar un cambio en la ubicación central de la GV. Se ha descrito en ratones que la ubicación de la GV durante la maduración de los oocitos depende de las fuerzas opuestas formadas por los dos tipos principales de citoesqueleto: una fuerza centrípeta creada por los microtúbulos y una fuerza centrífuga creada por la F-actina.²⁴ Se conoce que la razón principal de la disminución en la fertilidad femenina junto a la disminución de la calidad oocitaria es el aumento de la edad materna.²⁵ Sin embargo, en nuestra experiencia no se evidenció diferencias significativas en relación a la edad y la posición de la GV en los oocitos profase I, sin embargo, sí se evidenció alteraciones de la placa metafásica en el grupo de oocitos con GV periférica. Consideramos que sería necesario realizar el mismo ensayo de IVM en oocitos profase I en mujeres de mayor edad para visualizar el efecto de la edad más claramente.

Nuestros hallazgos en este trabajo se pueden fundamentar en el hecho que otros autores han evidenciado que la localización de Fyn en oocitos humanos estaría relacionada a la densidad y localización de los microtúbulos. Se ha demostrado que los oocitos humanos con GV central tienen concentraciones más bajas de Fyn dentro de la GV en relación a oocitos con GV periférica.²⁶ En el modelo murino se ha evidenciado que Fyn participa en el proceso de GVBD, la estabilización de los microtúbulos, la organización de F-actina y la degradación de la ciclina B1.²⁷ En conjunto, estos hallazgos sugieren que Fyn participa en procesos nucleares en general, y en las vías de transducción de señales que conduce a GVBD posiblemente

afectando otros factores clave, como los microtúbulos, F-actina o ciclina B1.

Nuestros resultados evidenciaron una competencia madurativa significativamente mayor después de GVBD en oocitos con GV central y una tasa de degeneración inferior. Por lo tanto, la localización de la GV en oocitos humanos podría ser usada para predecir la competencia de maduración. Tomando en consideración lo reportado por otros autores, se sabe que los oocitos GV centrales tienen una baja concentración Fyn en la GV y abundantes microtúbulos filamentosos gruesos en el citoplasma. Creemos que todo lo anteriormente mencionado tiene relación con los hallazgos referidos a las diferencias en la alteración de los microtúbulos y alineamiento de los cromosomas, así como la adecuada maduración citoplasmática y la velocidad de maduración. Sin embargo, creemos que aún se debe aumentar la cantidad de oocitos a fin de lograr definir el efecto sobre la maduración metabólica del oocito.

Este trabajo suma evidencia de que la posición de la GV podría ser considerada como una herramienta útil al momento de elegir dentro de una población de oocitos MII producto de maduración *in vitro* con el fin de ser usados para técnicas de reproducción asistida. Este es el primer trabajo que analiza la velocidad de maduración *in vitro* considerando la posición de la GV en oocitos profase I. Lo cual brinda una nueva utilidad al monitoreo continuo para uso en la valoración del tiempo de maduración de oocitos humanos durante IVM.

Referencias

1. Veek LL. Oocyte assessment and biological performance. *Ann NY Acad Sci*: 1988; 541:259-274.
2. Wassarman PM, Albertini DF. *The Mammalian Ovum. The Physiology of Reproduction*. New York, USA: Raven Press, 1988.
3. Maro B, Verlhac MH. Polar body formation: new rules for asymmetric divisions. *Nature Cell Biol* 2002;12:281-283.
4. Levi M, Maro B, Shalgi R. The involvement of Fyn kinase in resumption of the first meiotic division in mouse oocytes. *Cell Cycle* 2010;9:1577-1589.
5. VerlhacMH, Lefebvre C, Guillaud P, y cols. Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Curr Biol* 2000;10:1303-1306.
6. Albertini DF, Barrett SL. The developmental origins of mammalian oocyte polarity. *Semin Cell Dev Biol* 2004;15:599-606.

7. Brunet S, Verlhac MH. Positioning to get out of meiosis: the asymmetry of division. *Hum Reprod Update* 2011;17:68–75.
8. Brunet S, Maro B. Germinal vesicle position and meiotic maturation in mouse oocyte. *Reproduction* 2007;133:1069–1072.
9. Bouniol-Baly C, Hamraoui L, Guibert J, y cols. Differential transcriptional activity associated to chromatin configuration in fully grown germinal vesicle mouse oocytes. *Biol Reprod* 1999; 60:580–587.
10. Schuh M, Ellenberg J. Self-organization of MTOCs replaces centrosome function during acentrosomal spindle assembly in live mouse oocytes. *Cell* 2007;130:484–498.
11. Kim NH, Chung HM, Cha KY, y cols. Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. *Hum Reprod* 1998;13:2217–2222.
12. Levi M, Shalgi R. The role of Fyn kinase in the release from metaphase in mammalian oocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2010;314:228–233.
13. Stein PL, Vogel H, Soriano P. Combined deficiencies of Src, Fyn, and Yes tyrosine kinases in mutant mice. *Genes Dev* 1994;8:1999–2007.
14. McGinnis LK, Kinsey WH, Albertini DF. Functions of Fyn kinase in the completion of meiosis in mouse oocytes. *Dev Biol* 2009;327:280–287.
15. Brockmann C, Huarte J, Dugina V, y cols. Beta- and gamma-cytoplasmic actins are required for meiosis in mouse oocytes. *Biol Reprod* 2011;85:1025–1039.
16. Marteil G, Richard-Parpaillon L, Kubiak JZ. Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. *Reprod Biol* 2009;9:203–224.
17. Combelles CM, Fissore RA, Albertini DF, y cols. In vitro maturation of human oocytes and cumulus cells using a coculture three-dimensional collagen gel system. *Hum Reprod*: 2005; 20(5):1349–1358.
18. Masui Y, Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool*: 1971; 177(2):129–145.
19. Whitaker M. Control of meiotic arrest. *Rev Reprod* 1996; 1(2):127–135.
20. Alvarez Sedó C, Uriondo H, Lavolpe M, y cols. Evaluación de la expresión de PCDC2 (Y15) durante la maduración ovocitaria y su implicancia en falla de fertilización luego de ICSI. *Reproducción* 2011; 26:55–61.
21. Verlhac MH1, Kubiak JZ, Clarke HJ, y cols. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* 1994; 120(4):1017–1025.
22. Kanayama N1, Miyano T, Lee J. Acquisition of meiotic competence in growing pig oocytes correlates with their ability to activate Cdc2 kinase and MAP kinase. *Zygote* 2002; 10:261–270.
23. Chian RC, Lim JH, Tan SL. State of the art in in vitro oocyte maturation. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2004;16:211–219.
24. Alexandre H, Van Cauwenberge A, Mulnard J. Involvement of microtubules and microfilaments in the control of the nuclear movement during maturation of mouse oocyte. *Dev Biol* 1989;136:311–320.
25. Carnevale EM. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. *Theriogenology* 2008;69:23–30.
26. Levi M, Ghetler Y, Shulman A, y cols. Morphological and molecular markers are correlated with maturation competence of human oocytes. *Hum Reprod* 2013; 28:2482–2489.
27. Zheng KG, Meng XQ, Yang Y, Yu YS, Liu DC, Li YL. Requirements of Src family kinase during meiotic maturation in mouse oocyte. *Mol Reprod Dev* 2007;74:125–130.