



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

**“Influencia de las gonadotrofinas y la insulina
en la incorporación de glucosa por el complejo
ovocito-cumulus porcino durante la
maduración *in vitro*”**

Autora: Licenciada María Josefina Barrios Expósito

Director: Dr. Gabriel Martín Álvarez

Año: 2015

Agradecimientos

Al Dr. Gabriel Álvarez por su paciencia y dedicación. Por enseñarme y guiarme en el transcurso de esta Tesis.

Al Dr. Pablo Cética por orientarme y concederme realizar esta Tesis en la cátedra de Química Biológica.

A todo el personal de la Cátedra de Química Biológica por la buena voluntad y colaboración.

Al Dr. Dante Paz y la Dra. Evelyn Elía del IFIByNE-CONICET por su colaboración en la realización de las técnicas de Inmunolocalización.

Al Instituto de Investigación en Biotecnología INTA por facilitarme equipamiento.

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

A mis Hermanas y mis Padres por su infinita confianza.

A Pablo, mi esposo, por su apoyo constante e incondicional, por sostener este proyecto y por alentarme a continuar todos los días.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	3
RESUMEN.....	5
SUMMARY.....	8
INTRODUCCIÓN	10
EL COMPLEJO OVOCITO CUMULUS PORCINO	10
MADURACIÓN DEL OVOCITO	15
INCORPORACIÓN DE GLUCOSA.....	19
GONADOTROFINAS Y SU ACCIÓN EN EL COMPLEJO OVOCITO CUMULUS	24
INSULINA Y SU ACCIÓN EN EL COMPLEJO OVOCITO CUMULUS.....	29
OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN	34
OBJETIVO GENERAL	38
OBJETIVOS PARTICULARES	38
MATERIALES Y MÉTODOS	40
RECUPERACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS COMPLEJOS OVOCITO CUMULUS.....	42
MADURACIÓN DE OVOCITOS IN VITRO.....	42
FECUNDACIÓN IN VITRO	44
DETERMINACIÓN DEL CONSUMO E INCORPORACIÓN DE GLUCOSA EN EL COC PORCINO	45
DETERMINACIÓN DEL GLUCOTRANSPORTADOR 4	47
DISEÑO DE EXPERIMENTOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
RESULTADOS.....	51
EFECTO DE LAS GONADOTROFINAS Y LA INSULINA SOBRE LA MADURACIÓN DEL COC PORCINO	51
EFECTO DE LAS GONADOTROFINAS Y LA INSULINA SOBRE EL CONSUMO Y LA INCORPORACIÓN DE GLUCOSA EN EL COC PORCINO	54
DETERMINACIÓN DE GLUT 4 EN EL COC PORCINO Y EFECTO DE LAS GONADOTROFINAS E INSULINA SOBRE SU LOCALIZACIÓN	57
CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN.....	61
BIBLIOGRAFÍA	68

ABREVIATURAS

6-NBDG: 6-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-amino)-6-deoxyglucose

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

ARN: ácido ribonucleico

CDK I: quinasa dependiente de ciclinas I

CE: cultivo embrionario

COC: complejo ovocito cumulus

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FIT-C: isotiocianato de fluoresceína

FIV: fecundación in vitro

FPM: factor promotor de la maduración

FSH: hormona folículo estimulante

GLUT: glucotransportador

GMPc: guanocina monofosfato cíclico

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas

GSVs: Vesículas de GLUT

GVDB: Ruptura de Vesícula Germinal

LH: hormona luteinizante

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos

MIV: maduración in vitro

PBS: buffer fosfato salino

PI: yoduro de propidio

PI3-K: fosfatidilinositol 3-quinasa

PKA: proteína quinasa A

PKB: proteína quinasa B

PKC: proteína quinasa C

PKG: proteína quinasa G

PNM: pronúcleo masculino

PPP: vía de las pentosas fosfato

TBM: medio buffer tris

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

RESUMEN

La producción in vitro de embriones porcinos es poco eficiente, la misma abarca una serie de técnicas incluidas: la maduración in vitro del ovocito (MIV), la fecundación in vitro (FIV) y el cultivo embrionario (CE). Una correcta y completa maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos, son procesos fundamentales que deben lograrse para alcanzar un buen rendimiento. En los últimos años se ha alcanzado con éxito la maduración nuclear de los ovocitos, pero la falla en la maduración citoplasmática trae en consecuencia una baja tasa de formación de pronúcleo masculino (PNM) y la elevada polispérmia, lo que indica que las técnicas de MIV deben perfeccionarse. Para ello es esencial un estudio en profundidad de los requerimientos necesarios que presenta el complejo ovocito cumulus (COC) en el ambiente in vitro. La glucosa es un sustrato fundamental para la maduración del ovocito, las células del cumulus metabolizan gran parte de esta hexosa a través de diversas rutas metabólicas. Sin embargo, su exceso puede causar glicosilaciones de proteínas y lípidos en mayor proporción que las desarrolladas en situaciones fisiológicas, afectando así su funcionalidad. La glucosa ingresa a las células mediante transportadores específicos (GLUTs) entre los cuales, el GLUT 4 es regulado por la acción de la insulina. Las gonadotropinas y la insulina son hormonas frecuentemente empleadas para la MIV, pero sus efectos individuales en dichos sistemas no han sido analizados en profundidad.

El objetivo del trabajo fue estudiar la vía de incorporación de glucosa en el COC porcino durante la maduración in vitro y su posible regulación hormonal. Para ello

se estudió el efecto de las gonadotropinas (FSH y LH) y la insulina sobre la incorporación y consumo de glucosa en el COC porcino durante la MIV y su influencia en la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito. También se determinó la presencia del glucotransportador 4 y su variación por acción de dichas hormonas. Los COCs maduraron bajo tres tratamientos: gonadotropinas, insulina y ambas hormonas combinadas. Luego se evaluó el porcentaje de maduración nuclear, el consumo de glucosa y la incorporación de la misma utilizando un análogo no metabolizable (6-NBDG). Para analizar la maduración citoplasmática se realizó una FIV de los ovocitos madurados bajo los mismos tratamientos. La presencia del GLUT 4 se determinó mediante inmunocitoquímica sobre los COCs inmaduros y maduros.

El porcentaje de ovocitos nuclearmente maduros aumentó significativamente al suministrar gonadotropinas (LH y FSH) y gonadotropinas combinadas con insulina al medio de maduración ($p < 0,0001$). Mientras que la insulina por sí sola no tuvo efecto sobre la maduración nuclear. Sin embargo, al analizar los efectos de dichas hormonas sobre la maduración citoplasmática, se observó un aumento significativo en los ovocitos madurados bajo influencia de insulina, de gonadotropinas y de la combinación de ambas ($p < 0,0001$). Las gonadotropinas mostraron un efecto positivo sobre el consumo de glucosa, sin embargo la insulina no tuvo efecto sobre esta ($p < 0,0001$). También se determinó la localización de GLUT 4 tanto en el ovocito como en el cumulus porcino, ambas hormonas mantuvieron la presencia de dicho transportador durante la maduración. Sin

embargo ni la insulina, ni las gonadotrofinas ejercieron efecto sobre la incorporación de 6-NBDG al COC ($p > 0,05$).

En conclusión, las gonadotrofinas y la insulina mostraron efectos diferentes durante la maduración, las primeras aumentan las tasas de maduración y el consumo de glucosa, pero no regulan la incorporación del azúcar. Mientras que la insulina ejerce efecto sobre la maduración citoplasmática actuando probablemente, como un factor trófico sin incidencia sobre el consumo ni la velocidad de incorporación de glucosa. La presencia del GLUT 4 persiste por efecto de ambas hormonas y posiblemente este efecto adquiera relevancia hacia estadios postcigóticos.

SUMMARY

The in vitro embryo production is inefficient in swine. This comprises several reproductive biotechniques such as: In vitro maturation (IVM), in vitro Fertilization (IVF), embryo culture (EC). Nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes are essential to attain a good performance. In recent years the IVM has been properly accomplished, but cytoplasmic maturation has not. The consequence is the low rate of male pronuclei (MPN) and high polyspermy, suggesting that IVM technique should be improved. For this specific purposes, the study of the oocyte cumulus complex (OCC) requirements in in vitro environment are necessary. Glucose is fundamental for in vitro maturation; being metabolized in cumulus cells through different metabolic pathways. However the excess of glucose can cause unwanted lipid and protein glycosylations and affect OCC functionality. Glucose uptake by cells occurs through specific transporters (GLUT) including GLUT 4, insulin dependent glucose transporter. Gonadotropins and Insulin are hormones frequently used in IVM, but their individual effects have not been completely studied yet.

The goal of this work was to study glucose intake to the porcine OCC during in vitro maturation and their possible hormonal regulation. The effect of gonadotropins (FSH and LH) and insulin on glucose intake and consumption in the pig OCC during IVM and the hormonal influence on nuclear and cytoplasmic oocyte maturation was analysed. The presence of GLUT 4 was also determined. The OCCs were matured under three treatments: gonadotropins, insulin and both

combined. The percentage of nuclear maturation, glucose uptake and incorporation of a non-metabolizable analogue (6-NBDG) was evaluated. To analyse cytoplasmic maturation IVF was conducted. The presence of GLUT 4 was determined on immature and mature OCCs by immunocytochemistry.

The percentage of oocytes nuclearly mature increased significantly by gonadotropins (FSH and LH) and gonadotropins combined with insulin ($p < 0.0001$). Meanwhile, insulin alone had no effect on nuclear maturation. However, a significant increase was observed on cytoplasmic maturation in OCC matured with insulin, gonadotropin and the combination of both ($p < 0.0001$). Gonadotropins showed a positive effect on glucose uptake, but Insulin had no ($p < 0.0001$). Localization of GLUT 4 in porcine oocyte and cumulus cells was also determined. Both hormones kept the presence of GLUT 4 during IVM. However, neither insulin nor gonadotropins showed effect on the incorporation of 6-NBDG the OCC ($p > 0.05$).

In conclusion, gonadotropins and insulin showed different effects during in vitro maturation, the first ones increases the maturation rate and glucose consumption, but do not regulate the incorporation rate of sugar. Meanwhile insulin improves cytoplasmic maturation, probably as a trophic factor without effect on glucose consumption and intake. The presence of GLUT 4 persists with both hormones and this effect might become relevant during embryo culture.

INTRODUCCIÓN

EL COMPLEJO OVOCITO CUMULUS PORCINO

El ovocito es la célula germinal femenina con la potencialidad de formar un embrión al ser fecundada por la célula germinal masculina: el espermatozoide. Esta forma de generar descendencia entre los seres vivos, se denomina reproducción sexual. El ovocito se desarrolla en folículos dentro del ovario, en el proceso conocido como ovogénesis. Las hembras de mamíferos nacen con un acervo de ovocitos, que comenzaron su división meiótica durante el desarrollo embrionario, y que continuará con el advenimiento de la pubertad, etapa en la que los ovocitos madurarán para ser ovulados al tracto genital femenino (oviducto) donde serán fecundados.

Durante la ovogénesis, las células germinales primordiales diferenciadas en ovogonias, proliferan e inician la meiosis, a través de este proceso dichas células reducen el número cromosómico e intercambian segmentos génicos (crossing over) para dar gametos diferentes y aumentar la variabilidad intraespecie. Una vez iniciada, la meiosis avanza hasta la etapa de diplotene de la Profase I, donde permanecerá detenida durante toda la vida juvenil, en este estadio el ovocito se denomina ovocito primario (ovocito I). En la cerda la meiosis comienza alrededor del día 40 del desarrollo fetal, sin embargo la transformación de ovogonias en ovocitos I puede continuar por lo menos hasta el día 35 de vida posnatal [1]; [2].

El progreso desde la profase I hasta la metafase II es conocido como maduración del ovocito, in vivo se produce en los folículos preovulatorios porcinos aproximadamente 36 – 40 hs, luego del pico de gonadotrofinas [1]. Durante la misma se produce la ruptura de la vesícula germinal (denominado así al núcleo del ovocito I), la condensación de la cromatina, la segregación de los cromosomas homólogos, la citocinesis asimétrica con la emisión del primer corpúsculo polar y un segundo arresto meiótico, en la etapa de metafase II. Mientras los gametos se encuentren en la segunda división meiótica se denominarán ovocitos secundarios (ovocitos II). Particularmente al culminar el proceso de maduración y arrestar el núcleo en metafase II se los llama ovocitos maduros. En esta instancia se producirán en el folículo una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que culminan con la ruptura de la pared folicular y la consiguiente liberación del ovocito, evento denominado ovulación, luego del cual el gameto será recogido por el infundíbulo del oviducto, iniciando así el camino hacia la fecundación. Los ovocitos permanecerán en el oviducto hasta ser penetrados por el espermatozoide en el momento de la fecundación, es a partir de este evento, que el ovocito reinicia nuevamente la meiosis, completando la división nuclear y fusionando su dotación cromosómica haploide a la del espermatozoide, formando así el cigoto. Al momento de completar la meiosis se producirá la separación de las cromátides hermanas y la emisión del segundo corpúsculo polar [3]; [4]. En la figura 1 puede observarse un esquema de las etapas de la ovogénesis y la división meiótica.

Los ovocitos pueden ser inducidos a reanudar la meiosis sin la participación del espermatozoide, este es un evento raro en los mamíferos, pero suele darse en la naturaleza o in vitro y se denomina partenogénesis.

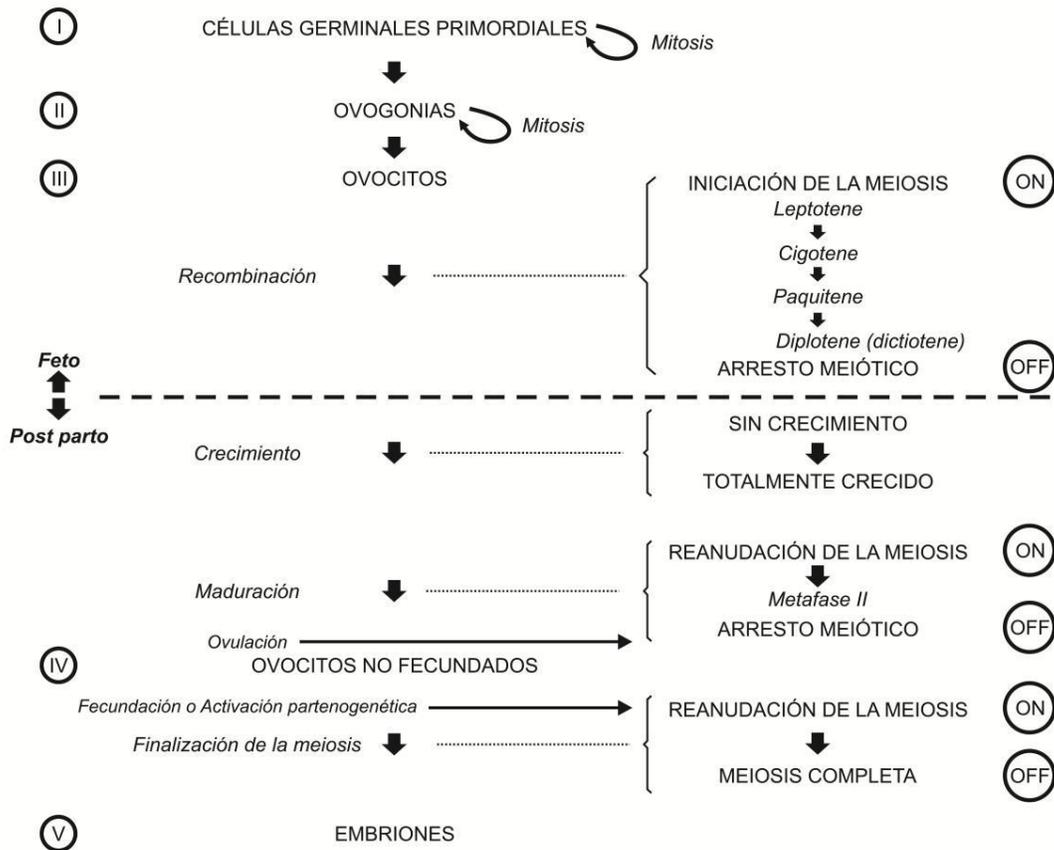


Figura 1. Progresión de la ovogénesis y la meiosis en la vida fetal y en la vida sexual activa. Adaptado de Wassarman, 1994 [5].

El proceso de ovogénesis, transcurre in vivo, junto con la foliculogénesis. Esta última, permite obtener un folículo de De Graaf a partir de folículos primordiales. En el momento del nacimiento, el ovario posee una gran cantidad de folículos pequeños, de los cuales se calcula que sólo el 1 % llegará a ovular [6]. El folículo primordial está formado por un ovocito I y una capa circundante de células

epiteliales planas. La mayor parte de los folículos ováricos son de este tipo y están incluidos en la corteza ovárica. En la cerda la población de folículos primordiales alcanza los 500.000 al momento del nacimiento y para la pubertad ese número desciende hasta 420.000 [1].

A medida que el folículo crece, el ovocito se hace más grande y las células foliculares que lo rodean, crecen en altura volviéndose cúbicas. Se comienza a formar la capa glicoproteína que rodea al ovocito, denominada zona pelúcida. En el folículo secundario continúa el crecimiento del ovocito, la zona pelúcida está desarrollada y las células que rodean al gameto proliferan para formar un epitelio de varias capas (células de la granulosa). Además, las células del estroma circundante, separadas por la membrana basal, se ordenan en una capa concéntrica para formar la teca folicular. En el folículo terciario el ovocito prácticamente ha completado su crecimiento, la capa celular de la granulosa sigue proliferando y se forman pequeñas zonas o lagunas que contienen líquido folicular. Estas zonas aumentan de tamaño y se unen formando un espacio único, el antro folicular. El ovocito adquiere gradualmente una disposición excéntrica quedando rodeado por células de la granulosa que forman el cumulus oophorus (las células que rodean inmediatamente al ovocito presentan una disposición radial, denominándose corona radiata). La teca folicular se diferencia en una teca interna y otra externa. En el folículo de De Graff, el ovocito completa su maduración minutos antes de la ovulación (Ver figura 2).

Se ha estimado que el tiempo requerido en la cerda para desarrollar desde folículo primordial hasta folículo antral es de 84 días, y que son requeridos 19 días adicionales para alcanzar el estadio preovulatorio [1].

El ovocito es liberado al infundíbulo del oviducto rodeado por las células del cumulus oophorus, que permanecerán en estrecho contacto con el ovocito, hasta después de la fecundación, dicho complejo se denomina Complejo Ovocito Cumulus (COC).

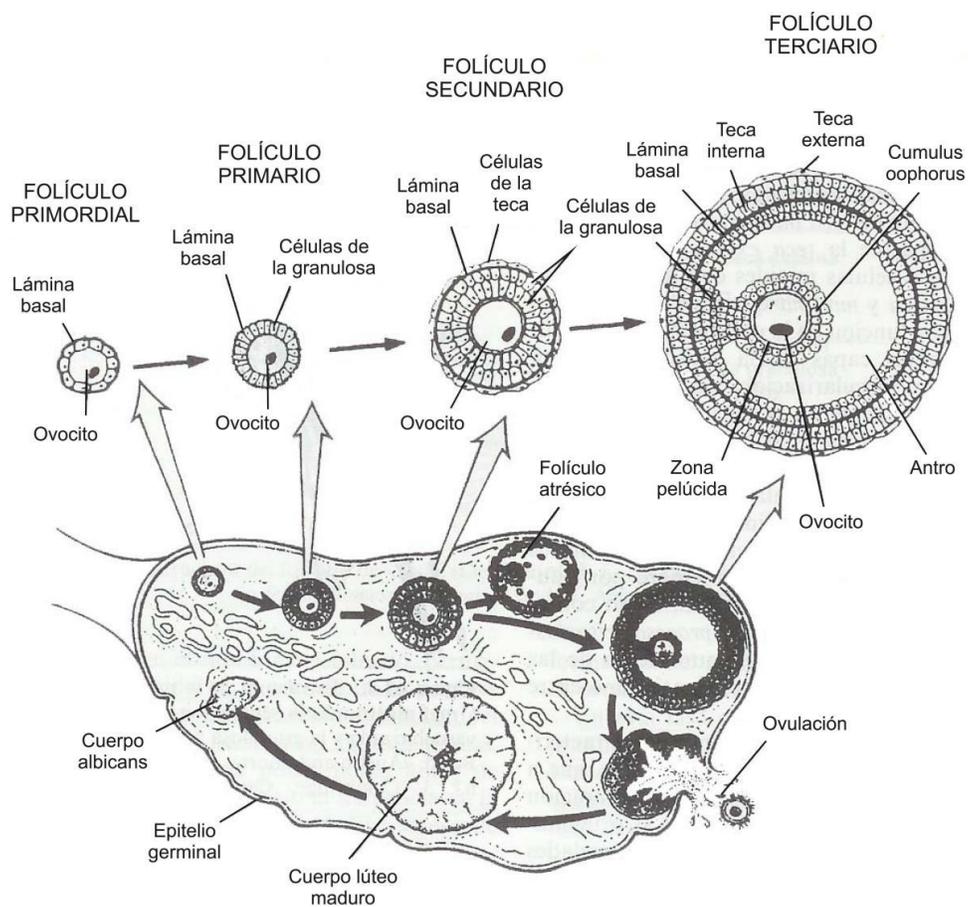


Figura 2. Esquema de la estructura del ovario y las diferentes fases en el desarrollo del folículo. Adaptado de Mazuecos, 1995 [7].

MADURACIÓN DEL OVOCITO

La maduración del ovocito in vivo se produce en respuesta al aumento preovulatorio de gonadotrofinas (FSH y LH) en aquellos gametos que han completado su crecimiento, sin embargo, los ovocitos son capaces de continuar la maduración meiótica durante el cultivo in vitro al ser retirados del entorno folicular, incluso en ausencia de gonadotrofinas. El ovocito debe ser competente en primer lugar para poder madurar y en segundo lugar para poder sostener el desarrollo temprano del embrión. El proceso de maduración implica eventos nucleares y citoplasmáticos. Se cree que la incompetencia en la maduración del ovocito depende tanto de la inmadurez nuclear como de la citoplasmática [8]; [9]. La maduración nuclear implica la llegada a la etapa metafase II, antes mencionada y es fácilmente evidenciable por la presencia de los cromosomas formando una corona y por la aparición del primer corpúsculo polar. Mientras que la maduración citoplasmática involucra diversos procesos que confieren al ovocito la capacidad de sustentar adecuadamente la fecundación y las primeras etapas del desarrollo embrionario [10]; [11]. Este complejo proceso resulta más difícil de evaluar ya que no presenta evidencias visiblemente claras como las señaladas para la maduración nuclear. Un ovocito se considera competente para el desarrollo cuando es capaz de alcanzar el estadio de blastocisto (etapa del desarrollo embrionario equivalente a la blástula, donde se diferencian las células del macizo celular interno, a partir del cual se desarrolla el embrión y del trofoblasto, que origina la placenta). El desarrollo embrionario depende en gran medida de eventos

que ocurren durante la maduración; esto se debe a que el ovocito no sólo aporta el material genético para el futuro embrión, sino que su citoplasma suministra organelas y macromoléculas comprometidas en la fecundación y en los primeros estadios de la embriogénesis [5]; [12]. Cuando este proceso se lleva a cabo in vitro, se tienen en cuenta los mismos criterios para evaluar la maduración, es por ello que se considera que un ovocito ha madurado in vitro cuando puede ser fecundado y sostener el desarrollo embrionario hasta blastocisto, que corresponde a un estadio previo a la implantación, en el proceso in vivo.

Actualmente, los medios de maduración in vitro son suplementados con diversos componentes, tomando como referencia las condiciones del ambiente in vivo en el que se desarrolla el proceso. Pero, en dicho ambiente, las diversas señales son reguladas fisiológicamente, haciendo difícil replicar tales condiciones en el ambiente in vitro. Es por ello, que resulta necesario poder estudiar el comportamiento del complejo ovocito cumulus, en esta situación particular.

Es sabido que la glucosa juega un rol fundamental en la maduración del ovocito, las células del cumulus metabolizan la mayor parte de la glucosa disponible, y proveen de energía y sustratos oxidativos al ovocito. [13]; [14]. Gran parte de esta hexosa, es utilizada en la vía glucolítica y convertida en piruvato y lactato, en las células del cumulus. Durante la expansión del cumulus se produce un incremento del consumo de glucosa, pero la proporción de glucosa dirigida a la producción de lactato, parece disminuir con la maduración. Lo que sugiere que la glucosa está siendo incorporada a otras rutas metabólicas, como la vía de las hexosaminas, donde la glucosa es convertida en glucosamina, el principal sustrato para la

síntesis de ácido hialurónico; el cual es utilizado para la expansión del cumulus [15]. O la vía de las pentosas fosfato (PPP, o hexosas monofosfato) a través de la cual, puede emplearse para la síntesis de ácidos nucleicos (Ver figura 3 A). Se ha observado que el ovocito por sí solo, puede metabolizar la glucosa por esta vía y promover la ruptura de la vesícula germinal, sin necesidad de las células del cumulus [16]. Previamente, hemos demostrado que la inhibición de la vía de las pentosas, en COCs porcinos cultivados in vitro, causa la disminución del porcentaje de maduración nuclear, lo que evidencia, que ambos eventos están relacionados [17].

Sin embargo, el exceso de glucosa en el medio, puede inducir su utilización en mayor cuantía a las necesidades reales de las células, su nivel elevado puede producir glicosilaciones de proteínas y lípidos en mayor proporción que las desarrolladas en situaciones fisiológicas, y de este modo afectar su funcionalidad. En sistemas de maduración in vitro de ovocitos bovinos, se ha observado que el agregado de glucosamina produce efectos negativos sobre la formación de blastocistos, sin que se vean afectados la cinética de maduración meiótica, la fecundación y el clivaje embrionario temprano. Thompson y colaboradores, señalan que el incremento de glicosilaciones, producto de la biosíntesis de hexosaminas, puede reducir la capacidad de desarrollo del ovocito (Ver figura 3 B) [18]. Por lo que la concentración de glucosa en los medios de cultivos, presenta controversias y constituye un tema de evaluación al momento de aplicar la MIV.

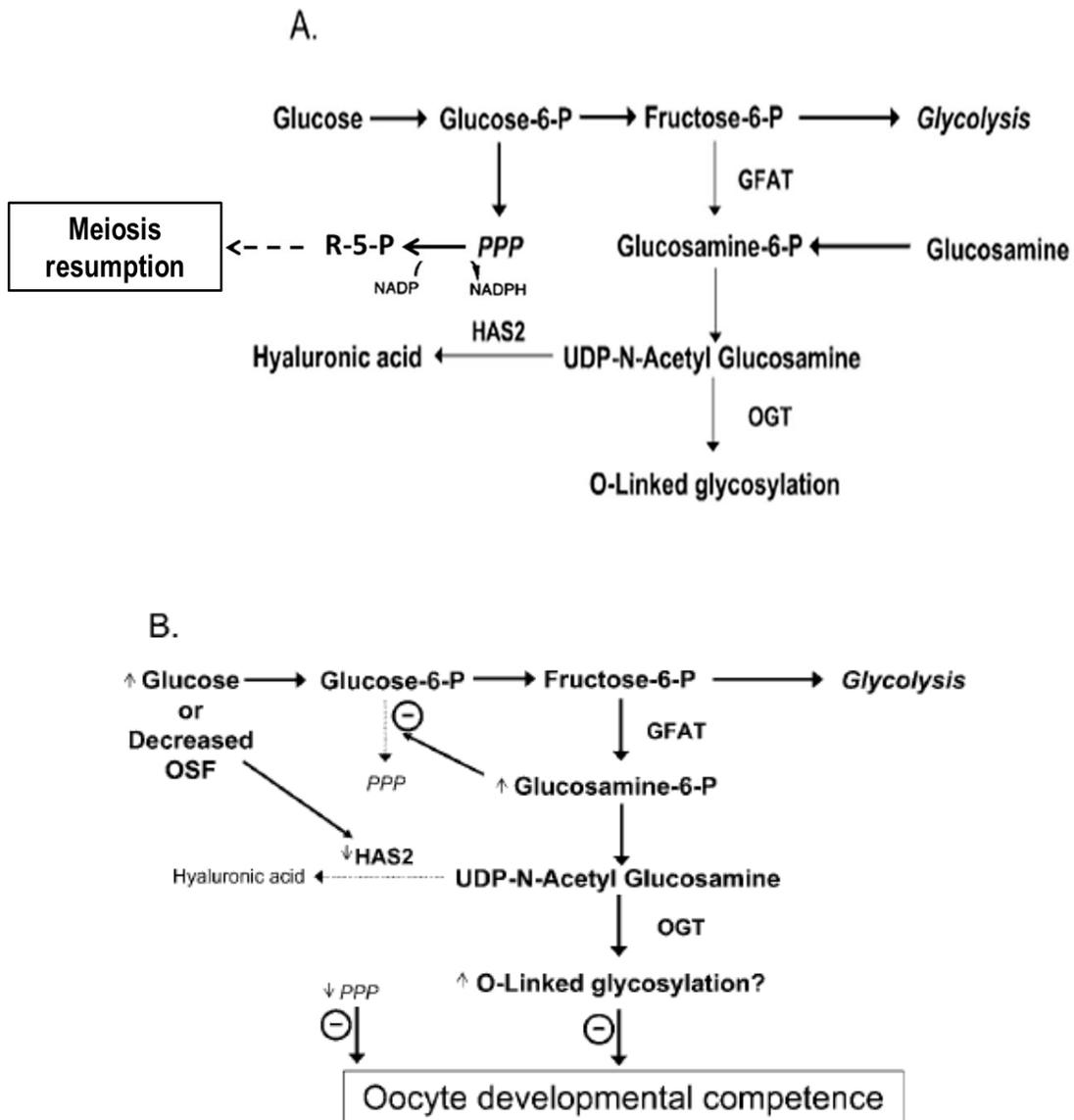


Figura 3. A) Esquema de las vías metabólicas de la glucosa en el COC bovino. B) Esquema de la regulación de la vía de biosíntesis de las hexosaminas, y la inhibición de las competencias de desarrollo del ovocito. Modificado de Thompson, 2006 [18].

INCORPORACIÓN DE GLUCOSA

La glucosa es transportada hacia el interior de las células mediante difusión facilitada (a favor del gradiente de concentración) por medio de Glucotransportadores (GLUTs). Los GLUTs son transportadores específicos, miembros de la familia de las glicoproteínas integrales, con 12 pasos transmembrana. Al momento se han descrito 14 GLUTs diferentes, todos con especificidad tisular, cinética y propiedades de regulación disimiles. Se encuentran codificados por los genes SLC2 y difieren de otros glucotransportadores dependientes de Sodio (SGLT), presentes en membrana apical de células epiteliales polarizadas del intestino y túbulo renales, que median el pasaje de glucosa en contra de su gradiente de concentración.

Basados en las diferencias entre sus secuencias primarias, se los agrupa en 3 clases. Clase I: GLUT 1 al GLUT 4 y GLUT 14, caracterizados por poseer en su estructura el primer loop extracelular de mayor tamaño, mientras que en los de Clase II: GLUT 5, 7, 9 y 11; el más grande es el quinto loop extracelular (A y E en figura 4, respectivamente). Clase III: GLUT 6, 8, 10, 12, 13; poseen un sitio de N-glicosilación en el dominio 5 extracelular, mientras que en los de Clase I y II este dominio lo presentan en el loop 1 extracelular [19].

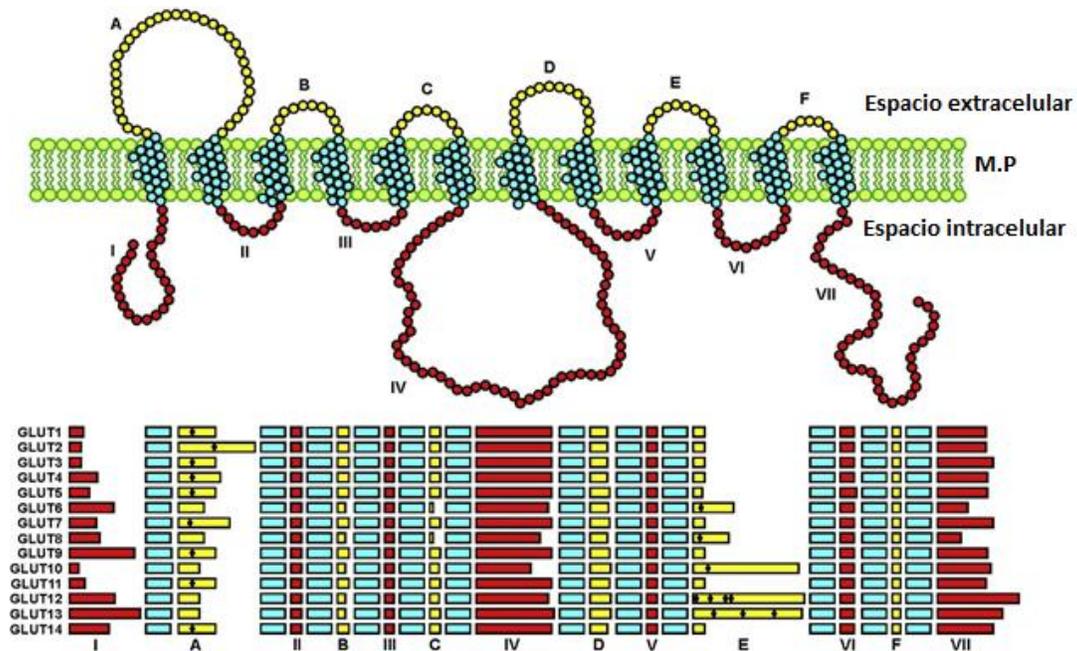


Figura 4. Representación esquemática de la estructura de los transportadores de glucosa SLC2A. La parte superior de la figura representa la estructura de GLUT 4 humano (cada círculo representa un único aminoácido), mientras que la parte inferior representa la estructura de todas las moléculas de GLUTs humanos. Las barras en rojo, amarillo y celestes representan los dominios intracelular, transmembrana y extracelulares de los transportadores, respectivamente. En los dominios A y E, se indican los potenciales sitios de N-glicosilación (♦). Modificado de Govers, 2014 [19].

Los más estudiados han sido los GLUTs 1, 2, 3, 4, 5, y 7. El GLUT 1 se expresa en todas las células fetales y en adultos predomina en glóbulos rojos, fibroblastos y endotelios de capilares sanguíneos. Su función es proveer la glucosa necesaria para satisfacer los requerimientos basales de la célula. GLUT 2, es un transportador de baja afinidad presente en hepatocitos, células β del páncreas, túbulo renales y membranas basolaterales del epitelio intestinal. GLUT 3 se expresa en células nerviosas. GLUT 4 se expresa fundamentalmente en tejido muscular y adiposo y su regulación es dependiente de insulina. GLUT 5 es un transportador de fructosa. Y GLUT 7 se localiza en membrana de retículo

endoplasmático donde media el transporte de glucosa hacia el exterior de dicha organela.

El GLUT 4 es el glucotransportador de mayor afinidad ($K_M \sim 2,0$ mM), funciona generalmente a velocidad máxima tanto en condiciones de glucemia normal y en hipoglucemia. Es una proteína constituida por 509 aminoácidos, con un peso molecular de ~ 55 kDa. Su actividad en musculo esquelético y cardiaco, al igual que en adipocitos es regulada por insulina. Cuando la glucemia es baja, los GLUT 4 se encuentran retenidos en vesículas intracelulares no endosomales (GSVs) dentro del citoplasma de las células. Si el nivel de glucosa en sangre aumenta, se estimula la secreción de insulina por parte de las células β del páncreas, el estímulo insulínico sobre estos tejidos conduce al reclutamiento de las vesículas intracelulares portadoras de GLUT 4 hacia la membrana plasmática, donde dicho transportador se fusiona para mediar la entrada de glucosa. Cuando la presencia de insulina se prolonga en el tiempo, las reservas de GSVs se agotan y por lo tanto las células deben recurrir a la utilización de GLUT 4 presentes en endosomas (Ver figura 5) [19]; [20].

Estudios con ratones noqueados en el gen que codifica la proteína GLUT 4, han demostrado que esta, tiene un rol central en el metabolismo integral de los individuos, y que la expresión deficiente de dicho transportador en tejido muscular y adiposo causa resistencia insulínica y deterioro homeostático [21]; [22]; [23].

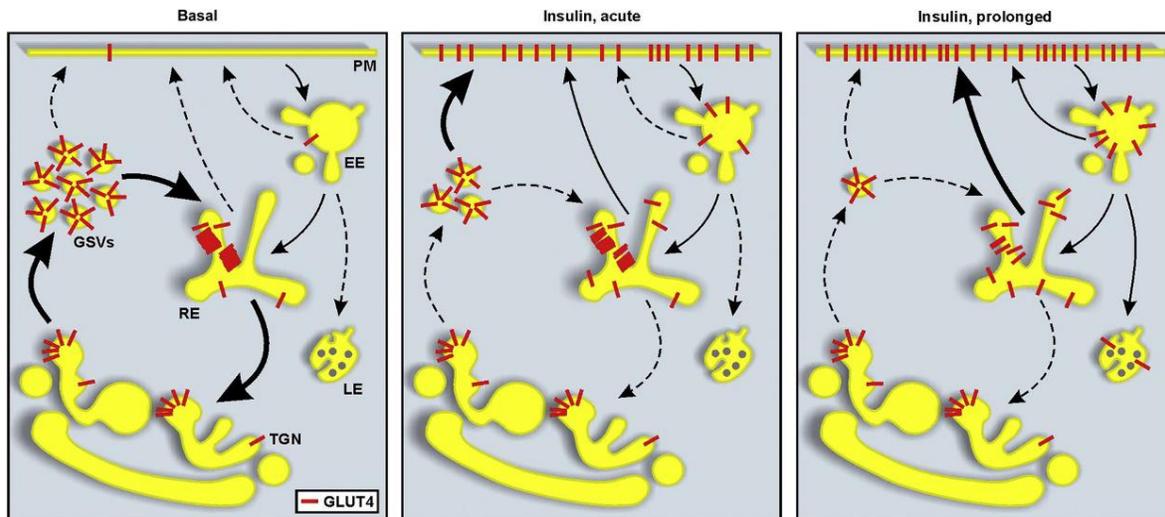


Figura 5. Modelo para el tráfico de GLUT 4. En ausencia de estímulo (Basal), GLUT 4 es retenido de manera eficiente intracelularmente en al menos dos compartimentos celulares, GSVs y endosomas de reciclaje, evitando que GLUT 4 aparezca en la superficie celular. Tras el estímulo de insulina, GLUT 4 es inicialmente reclutado a través de la fusión de GSVs con la membrana plasmática, lo que lleva a un aumento de los niveles de GLUT 4 de la superficie celular (Panel central). Ante estímulos prolongados, la célula agota sus reservas de GSVs y GLUT 4 pasa a ser reclutado desde endosomas (panel de la derecha). PM: Membrana plasmática, EE: Endosomas tempranos, RE: Endosomas reciclados, LE: Endosomas tardíos, TGN: Red de tránsito del Golgi, GSVs: Vesículas no endosomales sensibles a insulina. Extraído de Avances in Clinical Chemistry, 2014 [19].

El ovocito, el espermatozoide y el embrión preimplantatorio poseen requerimientos metabólicos extraordinarios que deben ser cubiertos para garantizar una preñez exitosa. La familia de las proteínas transportadoras de glucosa tiene un rol fundamental en proveer de los sustratos necesarios a las células. La variabilidad en la expresión de los GLUT otorga a los tejidos capacidad de adaptación ante los cambios que puedan llegar a producirse en su entorno [24]. Lo que nos lleva a pensar en la presencia plausible de transportadores de glucosa en el complejo ovocito cumulus, necesarios para satisfacer dichos requerimientos, y por

consiguiente, en la existencia de mecanismos que regulen su función en tales complejos.

Descubrimientos recientes, revelan la presencia de GLUTs en COCs de diversas especies. En particular, en COCs murinos, la glucosa es tomada por los GLUTs presentes en las células del cumulus y luego transferida dentro del ovocito a través de las uniones tipo gap [25]. También, se ha observado que las células de la granulosa humana expresan GLUT 1 y GLUT 4, y además, en dichas células se determinó que GLUT 4 es regulado por acción de la insulina [26]. Experimentos anteriores evidencian que, los GLUT 1 y 3 se expresan en células de la granulosa y en el ovocito de rata [27] y en primates se han observado patrones de expresión temporal de ARNm correspondientes a GLUTs en ovocitos y embriones preimplantatorios [28]. Estos datos, muestran que es posible encontrar transportadores de glucosa en el complejo ovocito cumulus. Hasta el momento no hay antecedentes que reporten la localización de algún GLUT, ni su regulación, en la especie porcina.

GONADOTROFINAS Y SU ACCIÓN EN EL COMPLEJO OVOCITO CUMULUS

La hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona Luteinizante (LH), son hormonas de composición glicoproteica conformadas por dos cadenas polipeptídicas α y β . La subunidad α es idéntica en las dos hormonas confiriéndole la especificidad de especie y la subunidad β difiere entre ambas y genera la especificidad biológica. Estas hormonas tróficas son liberadas por la adenohipófisis en respuesta a la hormona liberadora de gonadotrofinas hipotalámica (GnRH). Ambas hormonas tienen como blanco las gónadas. En las hembras, la FSH es la responsable del proceso de esteroidogénesis (producción de esteroides que dará lugar a la fabricación de hormonas esteroides) ovárica y estimula el crecimiento folicular. La LH también interviene en el proceso de esteroidogénesis ovárica, la inducción de la maduración del ovocito en el folículo preovulatorio, la iniciación de los eventos que desencadenan la ovulación y la formación del cuerpo lúteo y su mantenimiento [29]; [30]; [31].

Tanto las células de la teca y de la granulosa de los folículos secundarios terminales, como de los folículos terciarios iniciales, responden a las hormonas gonadotróficas. Si bien inicialmente las células de la granulosa expresan receptores para la FSH y las células de la teca, expresan receptores para la LH, en los folículos terciarios las células de la granulosa son inducidas por la FSH a expresar también receptores para la LH. Incluso en las células del cumulus se han identificado receptores para esta última hormona [32].

En las células de la teca interna de los folículos terciarios la LH estimula la producción de andrógenos y pequeñas cantidades de estradiol. Los andrógenos o

bien son secretados a los capilares o bien atraviesan la membrana basal para alcanzar la capa de células de la granulosa. Los receptores de las células de la granulosa interactúan con la FSH para activar el sistema de la enzima aromatasa, que convierte los andrógenos tecales (testosterona, androstenediona) en estrógenos (17 β estradiol, estrona), que son secretados al fluido folicular y los capilares sanguíneos. La concentración antral de 17 β estradiol es 1000 veces mayor que la detectada en la circulación sanguínea. La alta concentración local de estrógenos mantiene un ambiente favorable para la maduración folicular.

La estimulación de la reanudación meiótica se produce a través de la acción de las gonadotrofinas sobre las células del cumulus, ya que los ovocitos carecen de receptores para dichas hormonas [33] y por lo tanto no responden a la exposición de FSH y LH. Los mecanismos moleculares por los cuales las gonadotrofinas inducen la reanudación meiótica en el folículo preovulatorio, pueden implicar la eliminación de factores inhibitorios y/o la activación de inductores de la meiosis. Se cree que la acción de las gonadotrofinas en este proceso, se debe a la disminución de los niveles de AMPc (adenosina monofosfato cíclico) en el ovocito y subsecuente activación de la vía MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) en las células de la granulosa. Ciertamente, varios estudios, muestran que LH o FSH estimulan la MAPK, y dicha activación es mediada por AMPc a través de la vía de señalización de la proteína quinasa A II (PKAII) en células del cumulus. PKAII es sensible a variaciones en los niveles de AMPc, y su activación en estas células está directamente relacionada con la ruptura de la vesícula germinal (GVBD) [34]. Además, niveles altos de AMPc, ya sea producidos endógenamente, o transportados al ovocito desde las células de la granulosa, dan

como resultado la fosforilación de la quinasa dependiente de ciclina 1 (CDK1), inactivando al factor promotor de la maduración (FPM), de modo que la meiosis queda detenida [35].

Otros estudios revelaron que la activación de la MAPK debido a LH y FSH, podría suceder a través de la vía de señalización de la PKC (proteína quinasa C) [36]; [37]; [38] o por PKG (proteína quinasa G), mediante vías que involucran óxido nítrico (ON) y GMPc (guanocina monofosfato cíclico) (Ver figura 6) [39]; [40]. Según lo revisado, es concluyente que, el evento de maduración es complejo, e involucra la regulación de múltiples vías de señalización que aún no se han establecido completamente.

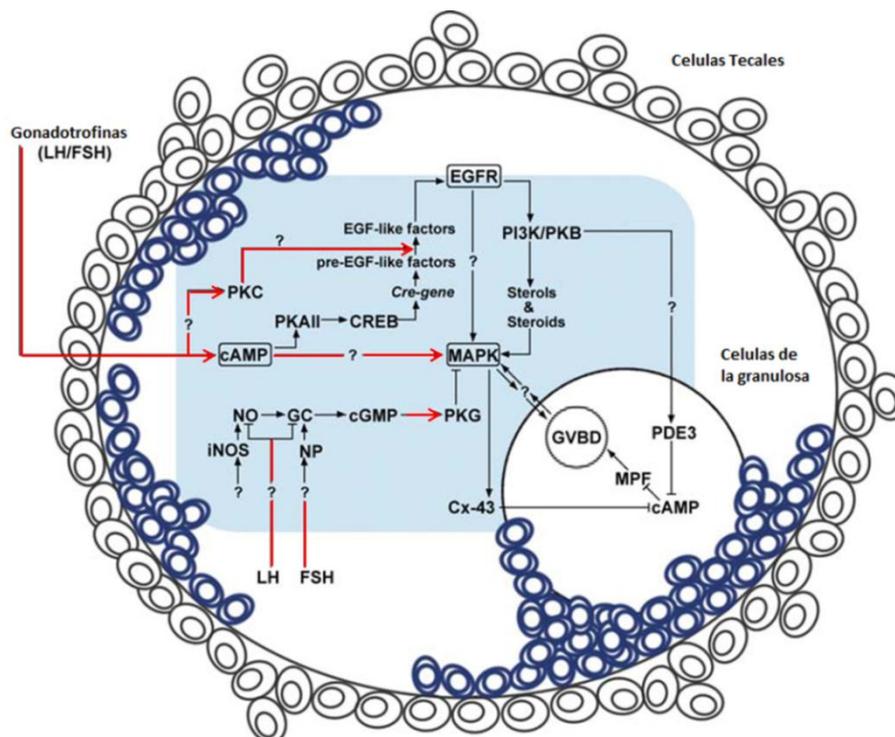


Figura 6. Representación esquemática de un folículo antral, donde se indican las cascadas de señalización inducidas por gonadotropinas, que conducen a la maduración nuclear. En azul se

representan las células de la granulosa rodeando parte del ovocito y en blanco las células de la teca. Adaptado de Zhang et al, 2009 [34].

Los efectos de las gonadotrofinas sobre la maduración de ovocitos in vitro, en diferentes especies, se han estudiado ampliamente. En murinos, la hormona folículo estimulante (FSH) aumenta el porcentaje de maduración de los ovocitos y produce un incremento en el consumo de glucosa y en la producción de lactato por parte de los complejos ovocito-cumulus (COC). En esta especie se ha demostrado que dicha hormona induce la activación del metabolismo de la glucosa, incrementando en mayor medida la vía glicolítica, pero también estimulando la vía de las pentosas fosfato, con una consecuente inducción de la maduración meiótica, observándose dicho comportamiento tanto in vitro como in vivo [41].

En otros tipos celulares, por ejemplo en las células de Sertoli, la FSH estimula la expresión de los GLUT 1 [42]. Sutton, et al. 2004, demostraron que una proporción de la glucosa captada por los COCs bovinos, ante el estímulo de FSH, es destinada a la síntesis de matriz extracelular y consecuente expansión del cumulus durante la maduración in vitro. Del mismo modo, se ha observado en la especie porcina, que la FSH estimula la síntesis y retención de ácido hialurónico durante la expansión del cumulus [43] y estudios previos reportan que, tanto la FSH como la LH son necesarias para la adecuada maduración in vitro de los ovocitos [44-46]. En trabajos recientes, nuestro grupo demostró la estimulación de la vía glucolítica mediada por estas hormonas durante la maduración in vitro de los

ovocitos porcinos [47], sin embargo, no ha podido determinarse un mecanismo de incorporación de la glucosa.

INSULINA Y SU ACCIÓN EN EL COMPLEJO OVOCITO CUMULUS

La insulina es una hormona de naturaleza proteica, fue la primera proteína cuya secuencia aminoacídica se determinó con exactitud. Está constituida por dos cadenas polipeptídicas, cadena A (21 aminoácidos) y cadena B (30 aminoácidos) ambas unidas por dos puentes disulfuro. La estructura terciaria y cuaternaria de la proteína determina su actividad, es por ello que forma dímeros o hexámeros que contienen Zinc. Existen diferencias en la estructura primaria de la insulina de las diferentes especies, pero todas ellas muestran la misma actividad cuando son administradas a individuos de otra especie diferente.

La insulina es producida en las células β de los islotes pancreáticos de Langerhans, sintetizada en retículo endoplasmático (RE) como proinsulina y secretada como insulina luego de sucesivas hidrolisis. El estímulo más eficaz para la síntesis y secreción de insulina es el aumento de la glucemia, luego de la ingesta de hidratos de carbono la concentración de insulina en sangre aumenta hasta llegar a un pico máximo a los 30-45 minutos. Su mecanismo de acción está mediado por receptores específicos presentes en todos los tejidos de mamíferos. El receptor de insulina (IR) es una proteína integral de membrana perteneciente a la familia de los receptores de crecimiento con actividad tirosina quinasa citosólica. Está constituida por 2 subunidades α extracitoplasmáticas, que contienen el sitio de unión al sustrato y 2 subunidades β de posición intracelular que contiene el sitio activo de proteína tirosina quinasa. Cuando la insulina se une al receptor en la subunidad α , se produce un cambio conformacional que se transmite hacia la

subunidad β y activa la tirosina quinasa. Esto desata una cadena de transducción de señales que activa numerosas vías de señalización, entre ellas, la que comprende a la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que a su vez activa, entre otras, a la proteína quinasa B (PKB). Las evidencias disponibles indican que fosforilaciones catalizadas por la PKB, son el factor principal determinante de la translocación de GLUT 4 desde vesículas intracelulares a la membrana plasmática. Acción particularmente notable en adipocitos y músculo. La PKB además, interviene en otras vías metabólicas como la glucólisis y la conversión de glucosa en ácidos grasos [48].

De todos los sustratos de la PKB, AS160 (también conocido como Tbc1d4) es el más conocido y se ha demostrado tanto in vitro como in vivo que es un modulador clave para la translocación de GLUT 4 [49]; [50]. AS160 ha sido la primera molécula que vincula directamente la señalización de la insulina para el tráfico de GLUT 4 intracelular. En su estado no fosforilado (activo) regula negativamente a las proteínas Rab, las cuales participan en el tráfico vesicular de GLUT 4. Las Rabs, son pequeñas proteínas G que participan en el desplazamiento de vesículas liposomales y la fusión de estas a la membrana plasmática. La unión de insulina a su receptor, activa la vía PI3K que lleva a la fosforilación de AS160, mediada por PKB. La proteína AS160 activa, estimula la hidrólisis del GTP unido a las Rab (generando Rab-GDP, inactivo) inhibiendo el tráfico vesicular. Cuando AS160 es fosforilada por Akt se inhibe, por lo que se incrementa el tráfico dependiente de Rab-GTP (activo) de GLUT 4 a la membrana plasmática (Ver figura 7).

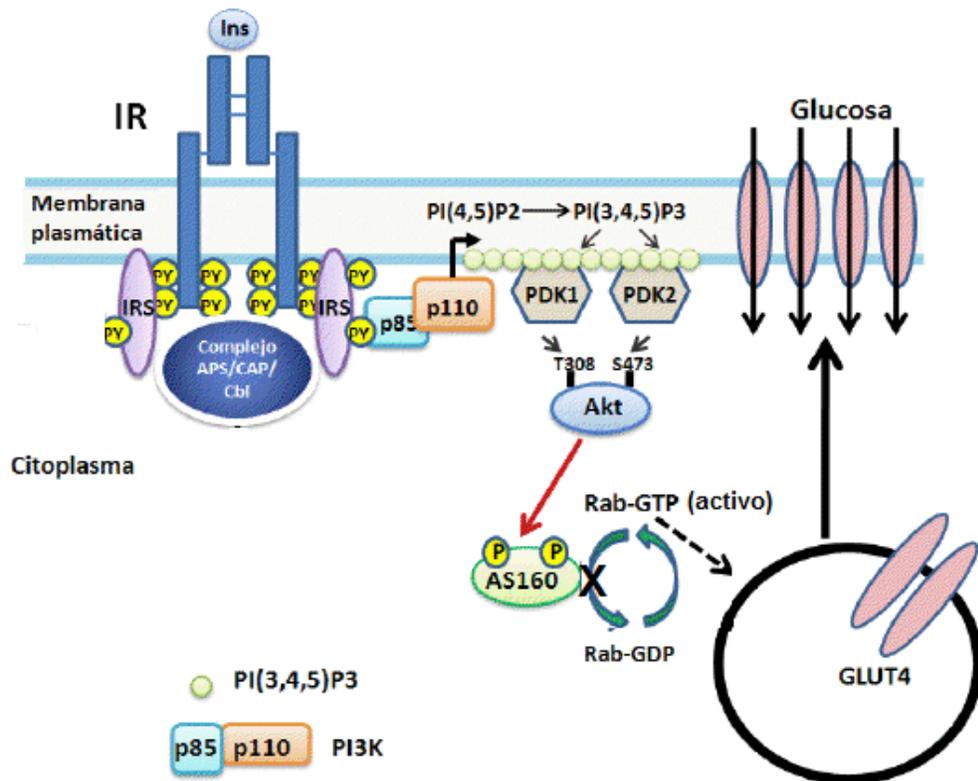


Figura 7. Representación esquemática de la acción inducida por insulina sobre las cascadas de señalización que conducen a la translocación de GLUT 4. Se representa sólo el reclutamiento de las vesículas GLUT 4 mediado por AS160. (Adaptado de Olivares Reyes y Plancarte, 2008) [51].

El estímulo de insulina provoca el aumento del consumo de glucosa en varios tipos celulares, como las células adiposas, musculares del tipo esqueléticas y cardíacas [52]. Además, en la retina de ratas y ranas, dicha hormona estimula el aumento de la expresión de los transportadores GLUT 4 [53]. Se observó el incremento de la expresión de GLUTs en timocitos y esplenocitos de ratas mediados por esta hormona [54]. En cerdas, ha sido documentada la unión de la insulina a ovocitos, células de la granulosa y de la teca interna en folículos sanos preantrales y antrales, y en menor medida en células de la teca externa y del

estroma. Estos datos apoyan la hipótesis de la participación de la insulina en la maduración del ovocito, el crecimiento folicular y la funcionalidad de las células del estroma en esta especie [55].

La evidencia de que la insulina podría tener efecto sobre la maduración de ovocitos, se encontró en ovocitos de *Xenopus sp*, donde se observó que dicha hormona es requerida para la activación del Factor Promotor de la Maduración (FPM). Como se mencionó previamente, la maduración del ovocito requiere la reanudación de la Profase I y su progreso hasta Metafase II, se sabe que dicho proceso está regulado por FPM. Ante el estímulo de insulina, en los ovocitos de dicha especie, la proteína CPEB es fosforilada, e induce la poliadenilación del ARNm *c-mos*. C-MOS se traduce y activa una cascada de señalización que fosforila al factor promotor de la maduración. Este, ahora activado, promueve la ruptura de la vesícula germinal y la reanudación de la meiosis (Ver figura 8) [56]. También se ha demostrado que la cascada de señalización de la insulina está presente y activa en los ovocitos de ratón, y que las gonadotrofinas pueden influir en la expresión del receptor de insulina durante la meiosis en esta especie [57].

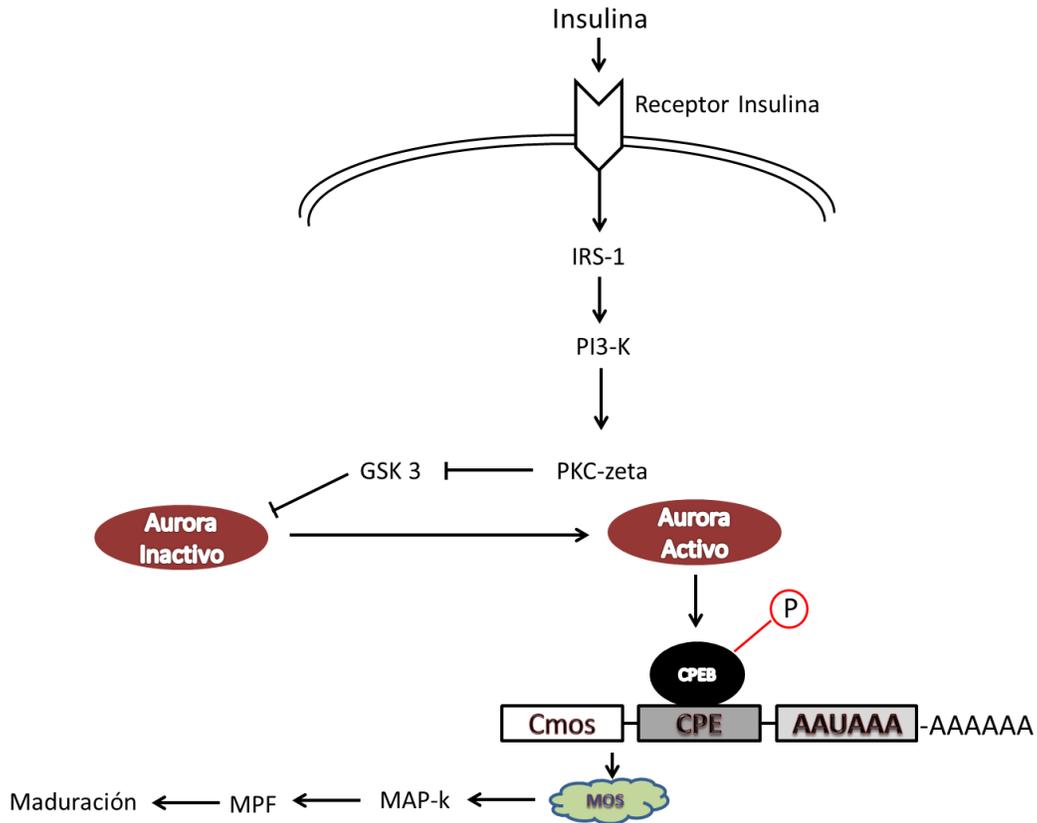


Figura 8: Modelo propuesto para las vías de señalización utilizadas por la insulina para estimular la maduración en ovocitos de *Xenopus Leavis*. (Modificado a partir de Sarkissian et al 2003) [56].

Asimismo se ha demostrado que la insulina aumenta el potencial de desarrollo de los ovocitos y embriones porcinos. Sin embargo, en este caso, los efectos de la hormona fueron asociados al contenido de glutatión de las células y a la actividad de tirosina quinasa [58], quedando pendiente el análisis de su participación en la regulación del metabolismo de hidratos de carbono. Se sabe que el receptor de insulina está presente en las células del cumulus y del ovocito [55], pero todavía se desconoce el efecto de esta hormona sobre la utilización de la glucosa en ambos tipos celulares.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

La producción in vitro de embriones (PIV) es un proceso amplio que comprende las técnicas secuenciales de: obtención y maduración in vitro (MIV) de los ovocitos, la capacitación in vitro de los espermatozoides, el cocultivo de ambos gametos o fecundación in vitro (FIV), y el cultivo in vitro de los embriones resultantes (CE) hasta alcanzar el estadio de blastocisto.

En 1974, Motlik y Fulka consiguieron fecundar in vivo ovocitos porcinos que habían sido madurados in vitro y, cuatro años más tarde, Iritani y colaboradores lograron las primeras MIV y FIV porcina, utilizando espermatozoides incubados en tractos reproductivos aislados de hembras. Nagai et al, 1984 fueron los primeros en capacitar in vitro espermatozoides porcinos con éxito, siendo Cheng en 1985, quien obtuvo el primer nacimiento de crías a partir de ovocitos porcinos madurados in vivo y fecundados in vitro. Finalmente, Mattioli et al, 1989 lograron producir lechones a partir de ovocitos madurados y fecundados in vitro. Sin embargo, en aquel momento el cultivo de embriones porcinos sólo se podía llevar a cabo durante un corto periodo de tiempo, previo a la transferencia a hembras receptoras. Por fin, Petter y Wells (1993) y Beckmann y Day (1993) consiguieron cultivar in vitro embriones de cerdo hasta el estadio de blastocisto [59]; [60]; [61]; [62]; [63]; [64].

Aunque se han hecho grandes progresos en el desarrollo de las técnicas de MIV, FIV y CE, aún son necesarias nuevas mejoras para maximizar la producción de

embriones. En un principio, a pesar de lograrse con éxito la maduración nuclear de los ovocitos, nos enfrentamos a dos problemas importantes: la baja tasa de formación de pronúcleo masculino (PNM) y la elevada polispermia [65]; [66]. Lo que pone en evidencia que las técnicas empleadas, aún no son del todo apropiadas. Pues la obtención de embriones viables requiere lograr no sólo la maduración nuclear de los ovocitos, sino también una completa maduración citoplasmática.

Aunque se han producido algunas mejoras en los medios de cultivos que resolvieron en parte el problema de la maduración citoplasmática [11]; [67], la alta tasa de polispermia en la FIV continua sin resolverse. Esto lleva a que el desarrollo hasta la etapa de blastocisto de los embriones producidos in vitro, sea bajo y la calidad de los mismos sea menor comparado con aquellos producidos in vivo. Los datos actuales, según los diferentes protocolos y grupos de trabajo oscilan entre los siguientes valores: maduración nuclear: de 70% a 95%; penetración: de 50% a 90%; formación de PNM: de 80% a 91%; polispermia: de 5% a 91%; división embrionaria: de 20% a 75%; y desarrollo hasta blastocistos: de 2% a 36% [68].

Si bien es elevado el porcentaje de los ovocitos que pueden completar la maduración nuclear in vitro, es decir, reiniciar la meiosis detenida en etapas tempranas y alcanzar el estadio de metafase II. Según lo expuesto hasta este momento se podría afirmar que el bajo porcentaje de éxito obtenido en el desarrollo embrionario in vitro y la menor calidad comparada con los obtenidos in vivo, resulta ser debido a la combinación de: una maduración citoplasmática

inadecuada o incompleta, una elevada polispermia, una formulación inadecuada de los medios de cultivos y unas condiciones de cultivo embrionario subóptimas. Respecto a la inadecuada formulación de los medios de maduración, esta situación puede deberse en parte, al relativamente exiguo conocimiento sobre las necesidades metabólicas de las células del cumulus y del gameto en el ambiente in vitro.

Desde los años 70 se han empleado múltiples medios de cultivo según el grupo de trabajo o el propósito del estudio. Hoy día los medios más utilizados son el TCM199 (Tissue Culture Medium 199) [69] y el Waymouth [70], que suelen ser suplementados con fluido folicular porcino (FFP) o suero fetal bovino (SFB), entre otros. Las combinaciones hormonales como suplemento también se han estado empleando rutinariamente. Las gonadotrofinas y la insulina han demostrado mejorar las competencias de desarrollo de los embriones in vitro. Sin embargo, el análisis de sus efectos sobre el metabolismo del complejo ovocito cumulus, aún continúa pendiente.

Resulta interesante poder desglosar los componentes de los medio de MIV y estudiar el efecto particular de cada uno sobre el COC. De la observación de estos efectos se podrían determinar los requerimientos metabólicos del ovocito porcino en el sistema de maduración in vitro, y de este modo diseñar medios de cultivo que permitan corregir las deficiencias en la producción de embriones que se presenta en estos días. Si bien resulta apoteótico considerar dicho análisis, contemplamos que estudiar el metabolismo de la glucosa en el COC porcino y su posible regulación es un buen comienzo para dicho propósito.

Siendo que las gonadotrofinas y la insulina son utilizadas como suplementos en el cultivo in vitro (las gonadotrofinas por promover la utilización de glucosa por parte del complejo ovocito cumulus y la insulina por estimular la utilización de dicha molécula mediante la relocalización de GLUT 4 en la membrana plasmática en tejidos insulino dependientes). Y sabiendo que la glucosa es una biomolécula fundamental en la maduración del COC porcino ya que provee sustratos oxidativos al ser metabolizada en las células del cumulus, contribuye a la expansión del cumulus y promueve la ruptura de la vesícula germinal; pero que su profusión en los medios de cultivo in vitro puede disminuir las competencias de desarrollo de los embriones. Resulta interesante preguntarnos, si las gonadotrofinas y la insulina afectan el consumo y la absorción de la glucosa. Si es necesaria la acción conjunta de ambas hormonas para la utilización de la hexosa por parte del COC porcino. Y si su acción individual o conjunta podría resultar en la regulación de la de los transportadores de glucosa dentro en el COC porcino.

Hipótesis: “Las hormonas FSH, LH e Insulina regulan la incorporación de glucosa en el COC porcino durante la maduración in vitro y modifican la presencia del GLUT4 en estas células”.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la vía de incorporación de glucosa en el COC porcino durante la maduración in vitro y su posible regulación hormonal.

HIPOTESIS PARTICULARES

- Las gonadotrofinas y la insulina estimulan el consumo de glucosa en el COC porcino, durante la maduración in vitro.
- La incorporación de Glucosa al COC porcino es regulada por gonadotrofinas e Insulina.
- El Glucotransportador 4 se encuentra presente en el COC porcino y su localización es regulada por gonadotrofinas e Insulina.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la influencia de las gonadotrofinas y de la insulina en el consumo de glucosa por el COC porcino durante la maduración in vitro.
- Cuantificar la incorporación de glucosa en el COC porcino durante la maduración in vitro y su posible modificación por el efecto de las gonadotrofinas y de la insulina.

- Determinar la localización de GLUT en el COC porcino y su probable variación por acción de las gonadotrofinas y de la insulina durante la maduración in vitro.

DISEÑO DE EXPERIMENTOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

EXPERIMENTO 1: Para evaluar el efecto de las gonadotrofinas y la insulina sobre la maduración nuclear de los ovocitos porcinos. Los mismos fueron madurados bajo tratamientos con dichas hormonas y se estimó el porcentaje de ovocitos maduros. Se analizó la proporción mediante una prueba Chi cuadrado, con una confianza del 95%, $n= 576$. También se estimaron los intervalos de confianza para dicha variable, según los tratamientos. Se utilizaron entre 10 y 15 COC por tratamiento, con 10 repeticiones.

EXPERIMENTO 2: Para evaluar el efecto de las gonadotrofinas y la insulina sobre la maduración citoplasmática de los ovocitos porcinos. Los mismos fueron madurados bajo tratamientos con dichas hormonas y luego fecundados con semen fresco en idéntica concentración. Se analizó la proporción de ovocitos fecundados mediante una prueba Chi cuadrado, con una confianza del 95%, $n= 204$. También se estimaron los intervalos de confianza para dicha variable, según los tratamientos. Se utilizaron 10 COC por tratamiento, con 5 repeticiones.

EXPERIMENTO 3: Para analizar el efecto de las hormonas sobre el consumo de glucosa durante la maduración in vitro, se midió la concentración de dicha hexosa en el medio de cultivo remanente y se determinó indirectamente, la glucosa consumida mediante ensayo enzimático. Los datos se sometieron a un ANOVA con una confianza del 95%, $n= 204$. Y posterior test de Tuckey para

evidenciar diferencias entre tratamientos. Se utilizaron 10 COC por tratamiento, con 5 repeticiones.

EXPERIMENTO 4: Para evaluar el efecto de las hormonas sobre la incorporación de glucosa fluorescente en el COC porcino durante la maduración in vitro, los COCs fueron incubados con 6-NBDG y posterior análisis de la fluorescencia emitida por dicho compuesto al ser incorporado al COC. Los datos se sometieron a un ANOVA con una confianza del 95%, n= 160 y posterior test de Bonferroni para evidenciar diferencias entre tratamientos. Se utilizaron 20 COC por tratamiento, con 2 repeticiones.

EXPERIMENTO 5: Para determinar la presencia de GLUT 4 en el COC porcino, y el efecto de las gonadotrofinas y la insulina sobre este, durante la maduración in vitro, se realizó una Inmunocitoquímica sobre los COCs y se analizó la presencia de la marcación fluorescente bajo microscopía confocal. Ensayo cualitativo.

EXPERIMENTO 6: De manera complementaria a los estudios de la sección anterior, se realizó un ensayo de “Western Immunoblotting”, para confirmar la presencia de GLUT 4 en el COC porcino.

MATERIALES Y MÉTODOS

A menos que se especifique lo contrario, todos los productos químicos utilizados fueron provistos por Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EE.UU.).

RECUPERACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS COMPLEJOS OVOCITO CUMULUS

Los ovarios se obtuvieron de cerdas jóvenes derivadas de faena, fueron transportados hasta el laboratorio en termos (30 - 35°C) y lavados en solución fisiológica al 0,9% (v/v) con agregado de 100.000 IU/L de penicilina y 100 mg/L de estreptomicina. Los COCs inmaduros fueron extraídos por aspiración de folículos antrales, de tamaño comprendido entre 3 a 8 mm de diámetro, utilizando jeringa de 10 ml y aguja de 18g. Luego se seleccionaron bajo lupa estereoscópica aquellos COCs que presentaban un cumulus íntegro y denso.

MADURACIÓN DE OVOCITOS IN VITRO

Los COCs fueron madurados individualmente en gotas de 10 μ l de medio 199 (sales Earle, L-glutamina, 2,2 mg/L bicarbonato de sodio, GIBCO, Grand Island, NY, USA), suplementado con 10% v/v de fluido folicular porcino (FFP), 50 μ g/ml de

sulfato de gentamicina y el agregado de gonadotrofinas y/o insulina según tratamiento. Los COCs fueron asignados al azar a cada tratamiento: 1) Medio de maduración, 10 UI/ml de LH porcina, 10 UI/ml de FSH porcina. 2) Medio de maduración, 0,4 μ U/ml de insulina porcina. 3) Medio de maduración, 10 UI/ml de LH porcina, 10 UI/ml de FSH porcina, 0,4 μ U/ml de insulina porcina. 4) Medio de maduración únicamente (Control). Todos los grupos fueron incubados bajo aceite mineral, a 39°C, con atmosfera al 5% de CO₂ y 100% de humedad, durante 44hs [71].

EVALUACIÓN DE LA MADURACIÓN

Transcurridas las 44 hs, los ovocitos fueron denudados en Hialuronidasa (1mg/ml en PBS), lavados en PBS/PVA (1mg/ml), fijados con Glutaraldehído 2% v/v y coloreados con Hoechst 33342 (1mg/ml en agua bidestilada). Luego analizados bajo microscopio de fluorescencia UV con filtro de longitud de onda de excitación 330 -380 nm y de emisión 410 nm. A x250 y x400 de magnificación. Se observó la presencia de cromosomas en el estadio de metafase II (MII). Se calculó el porcentaje de ovocitos maduros.

FECUNDACIÓN IN VITRO

La Fecundación in vitro se realizó utilizando semen porcino fresco, obtenido de verraco de probada fertilidad. El semen fue previamente lavado en PBS, centrifugado a 1500 rpm durante 5 min, para eliminar líquido seminal y resuspendido en medio TBM (Buffer-Tris modificado: NaCl 113,1 mM; KCl 3 mM; Tris 20 mM; CaCl₂*2H₂O 10 mM; glucosa 11 mM; Cafeína 2,5 mM; Piruvato de Sodio 5 mM; BSA 0,4%) [72]. Las muestras fueron filtradas a través de columna de lana de vidrio (20 mg de lana de vidrio, 10 mm de alto y 4 mm de diámetro), previamente lavada con TBM para obtener la fracción rica en espermatozoides motiles. Los COCs madurados durante 44 hs, bajo los distintos tratamientos, fueron inseminados con una concentración de entre 20.000 a 50.000 espermatozoides/ml en TBM.

Veinte COCs por tratamiento fueron inseminados en placas de 4 pocillos en TBM durante 18 hs a 39°C, con atmosfera al 5% de CO₂ y 100% de humedad.

EVALUACIÓN DE LA FECUNDACIÓN

Transcurrido el tiempo para la fecundación, los ovocitos fueron desnudados por acción mecánica con pipeta Pasteur, lavados en PBS/PVA (1mg/ml), fijados con Glutaraldehído 2% v/v y coloreados con Hoechst 33342 (1mg/ml en agua bidestilada). Luego analizados bajo microscopio de fluorescencia UV con filtro de

longitud de onda excitación 330 -380 nm y de emisión de 410 nm. A x250 y x400 de magnificación. Se observó la presencia de pronúcleos cigóticos, y se calculó el porcentaje de Fecundación, sobre el total de ovocitos maduros.

DETERMINACIÓN DEL CONSUMO E INCORPORACIÓN DE GLUCOSA EN EL COC PORCINO

CONSUMO DE GLUCOSA

La cantidad de glucosa consumida por COC, se determinó de manera indirecta, midiendo la concentración de glucosa remante en el medio de cultivo. Para ello, los COCs fueron incubados en gotas individuales. Al cabo de 44 hs de maduración, se retiraron los mismos del medio de cultivo, y se midió la concentración de glucosa en el medio a través de ensayo enzimático (Glicemia Enzimática AA, Wiener Lab.). En dicho ensayo se lleva a cabo la oxidación de la glucosa por medio de glucosa oxidasa (GOD), dando como productos ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), luego la enzima peroxidasa (POD) cataliza la reacción: $2 H_2O_2 + 4\text{-Aminonofenazona} + 4\text{-Hidroxibenzoato}$ para dar un producto coloreado (quinonimina roja). Las muestras fueron analizadas espectrofotométricamente cuantificando la absorbancia del producto de oxidación de la glucosa a 490 nm. La concentración de glucosa en mmol/L se calculó mediante la fórmula:

$$[Glu] = f \cdot Abs \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde f es un factor que se obtiene según la ecuación 2; Abs: Es la Absorbancia obtenida para cada concentración y S: es la Absorbancia del testigo.

$$f = \frac{5,5 \frac{\text{mmol}}{\text{l}}}{S} \quad (\text{Ecuación 2})$$

INCORPORACIÓN DE GLUCOSA AL COC PORCINO

La incorporación de glucosa al COC porcino se determinó a través de la entrada de un análogo de glucosa: 6-NBDG (6-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4- amino)-6-deoxyglucose), esta molécula es un análogo de glucosa no hidrolizable fluorescente. [25].

Los COCs madurados durante 43:30 hs fueron lavados con PBS/PVA (1mg/ml) e incubados a 37°C durante 30 minutos con 100 μM del derivado de glucosa 6-NBDG en PBS luego, lavados en PBS/PVA (1mg/ml) y lisados con 50 μl de buffer de lisis Tris HCl (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 137mM NaCl; 10% v/v glicerol; 1% Tritón X-100; 2mM EDTA) [73]. Las muestras obtenidas fueron analizadas con espectrofotómetro para fluorescencia en 465 nm de excitación y 540 nm de

emisión (SpectraMax GEMINI EM, Dual-Scanning, Microplate Spectrofluorometer) las lecturas se realizaron mediante el software SoftMax Pro5.

DETERMINACIÓN DEL GLUCOTRANSPORTADOR 4

INMUNOLocalización

Los COCs porcinos madurados bajo los 3 tratamientos: gonadotrofinas, insulina, gonadotrofinas e insulina, y los controles correspondientes (control de maduración: COCs porcinos incubados en medio 199 sin agregado de hormonas y control negativo: incubación de los COCs con el anticuerpo secundario, en ausencia del anticuerpo primario anti-GLUT4.); fueron fijados en formol al 4% en PBS/PVA (1 mg/ml), previo lavado con PBS. Al momento de realizar la Inmunocitoquímica, fueron nuevamente lavados en PBS y llevados a temperatura ambiente sobre portaobjetos. Se bloquearon las uniones inespecíficas con leche descremada al 5% en PBS. Los anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas fueron los siguientes: Anticuerpo primario: Anticuerpo policlonal anti- GLUT 4, C-terminal, producido en conejo (Santa Cruz Biotechnology Inc, Sc-7938, USA) Este anticuerpo ha sido desarrollado para detectar los aminoácidos 230-290 de Glut-4 de origen humano y ha sido probado y es recomendado para la detección de Glut-4 en porcinos, entre otras especies, como se especifica en el datasheet (ver anexo 1).

Anticuerpo secundario: Anticuerpo anti IgG de conejo hecho en cabra conjugado con FIT-C (Sigma). Los núcleos de las células del cumulus fueron coloreados con Yoduro de Propidio (PI) 1:1000 (tinción de contraste). El anticuerpo primario se preparó en una dilución 1:50, incubado toda la noche a 4°C. Al día siguiente, luego de sucesivos lavados se incubó con el anticuerpo secundario en una dilución 1:200 durante 1 hora en agitación. Las muestras fueron analizadas bajo microscopía confocal a x400 de magnificación.

WESTERN BLOT

Los extractos proteicos fueron obtenidos a partir de 100 COCs suspendidos en 30 μ l de buffer 2X- SDS (0,024% m/v azul de bromofenol, 4% glicerol, 0,8% m/v SDS, 4 mM Tris-HCl, 0,4% v/v β -mercaptoetanol), sonicadas con 3 pulsos de 5 segundos c/u a 60W y calentadas durante 5 minutos a 95°C.

Las muestras fueron separadas en gel de poliacrilamida, bajo la técnica SDS-PAGE al 12 %. Las proteínas se separaron por electroforesis a 25 mA durante 2,5 horas en Tris-glicina 0.1% p/v en buffer SDS. Además de las muestras de interés se cargó un marcador de peso molecular de proteínas (Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards 10-250 kDa, BioRad). Como control negativo se omitió el anticuerpo primario.

Las proteínas ya separadas fueron transferidas a una membrana de PDVF (Polyvinyl Difluoride. GE Healthcare) en buffer de transferencia (metanol 20% v/v; glicina 150 mM; Tris-HCl 20 mM; pH 8,3) durante 1 hora a 4°C a 100V, utilizando una celda de transferencia mini-electroforética (Bio-Rad Laboratories, Hercules,

CA). Para verificar que la transferencia se llevó a cabo correctamente, a continuación se realizó una tinción con una solución de Rojo Ponceau (Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3%, ácido sulfosalicílico 3%) a temperatura ambiente por 1 minuto. Luego, las membranas fueron lavadas en TBS (Tris-HCl 4 mM, pH 7,5; NaCl 100 mM) e incubadas por 90 minutos en T-TBS (Tween 20 0,1% v/v, 1X TBS) conteniendo albúmina bovina sérica (BSA: 0,1 % p/v) a temperatura ambiente con agitación suave para bloquear las uniones inespecíficas. Luego, se realizaron lavados con T-TBS a fin de eliminar el exceso de albúmina.

La presencia de las proteínas de interés se confirmó incubando a 4°C durante toda la noche con anticuerpos específicos contra GLUT 4 (1:200, Santa Cruz Biotechnology Inc, Sc-7938, USA). Los controles negativos se realizaron omitiendo la incubación con anticuerpos primarios y no se detectaron bandas.

Luego, las membranas fueron lavadas con T-TBS seguido de una incubación por 1 hora a temperatura ambiente en agitación con Ig-G anti-conejo biotinilado (1:2000, Chemicon International, USA). Posteriormente el exceso de anticuerpo fue quitado de las membranas lavándolas con T-TBS. Luego se realizó una incubación por 40 min con Extreptoavidina conjugada a peroxidasa (1:200 Sigma-Aldrich) y, a continuación, se las incubó con reactivos de detección de quimioluminiscencia (ECL Prime Plus, GE Healthcare). Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas y fotografiadas usando un analizador de imágenes (Fuji).

RESULTADOS

EFFECTO DE LAS GONADOTROFINAS Y LA INSULINA SOBRE LA MADURACIÓN DEL COC PORCINO

MADURACIÓN NUCLEAR

Se determinó el porcentaje de ovocitos nuclearmente maduros, aquellos cuyos núcleos llegaron al estadio de Metafase II, mediante la técnica de tinción de Hoechst. En los COCs madurados en presencia de gonadotrofinas y con estas combinadas con insulina, se observó un aumento significativo del porcentaje de Maduración (valor $P < 0,0001$). Mientras que en los ovocitos madurados en presencia de insulina únicamente, no se hallaron diferencias respecto del control (Fig.1). Estos resultados sugieren que son las gonadotrofinas (y no la insulina), las hormonas que son necesarias para la maduración nuclear in vitro en los ovocitos porcinos.

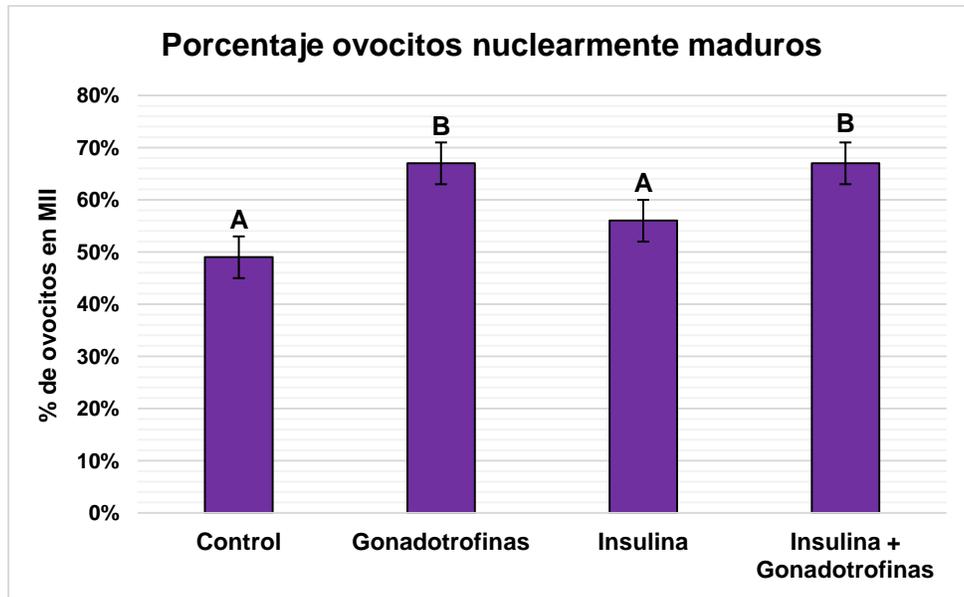


Figura 1. El gráfico muestra el porcentaje de ovocitos en estadio de Metafase II. ^{A, B} Barras con diferente índice indican diferencias significativas ($p < 0,0001$). N= 576 (10 y 15 COC/ tratamiento, con 10 repeticiones).

MADURACIÓN CITOPLASMÁTICA

Una manera de evidenciar la maduración citoplasmática del ovocito es mediante la Fecundación in vitro (FIV), evaluando el porcentaje de ovocitos fecundados. Este porcentaje se determinó mediante la presencia de pronúcleos cigóticos (PN) sobre el total de ovocitos maduros. Los resultados muestran un aumento significativo del porcentaje de ovocitos fecundados cuando estos fueron madurados en presencia de insulina, de gonadotropinas y de ambas hormonas en combinación (valor $P < 0,0001$) (Fig.2). Esto sugiere que tanto la insulina como las gonadotropinas son necesarias para la maduración citoplasmática del ovocito.

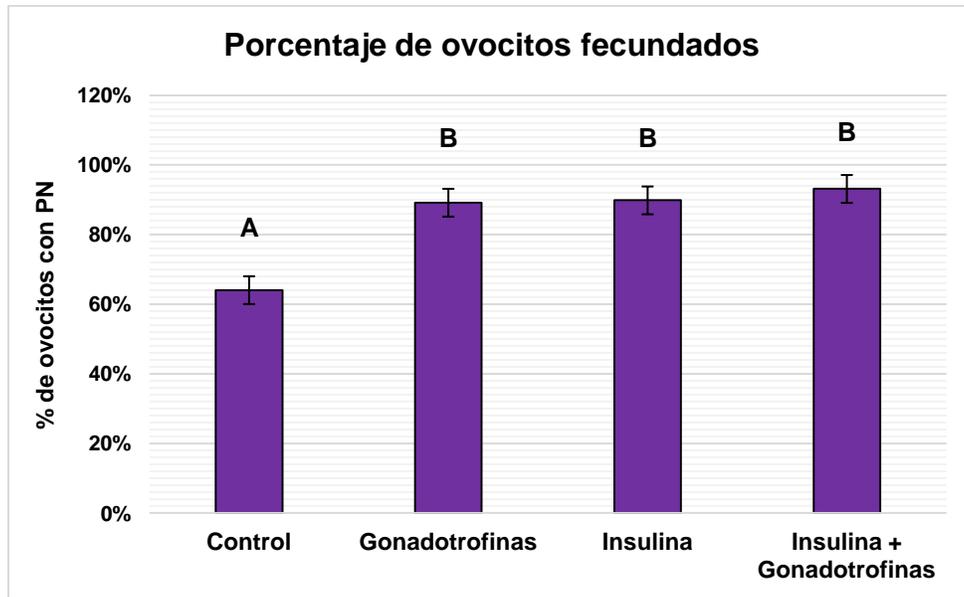


Figura 2. El gráfico muestra el porcentaje de ovocitos fecundados para cada tratamiento. ^{A, B} Barras con diferente índice indican diferencias significativas ($p < 0,0001$). N= 204 (10 COC/ tratamiento, con 5 repeticiones).

EFFECTO DE LAS GONADOTROFINAS Y LA INSULINA SOBRE EL CONSUMO Y LA INCORPORACIÓN DE GLUCOSA EN EL COC PORCINO

CONSUMO DE GLUCOSA

El consumo de glucosa por parte de los COCs madurados in vitro, se obtuvo a partir de la medición de la concentración de glucosa remanente en el medio de cultivo, una vez transcurridas las 44 hs de maduración. Los resultados obtenidos muestran un aumento significativo del consumo de glucosa cuando los COCs son madurados en presencia de gonadotrofinas y de gonadotrofinas combinadas con insulina (valor $p < 0,0001$). Pero no se evidencian cambios significativos sobre esta variable, al suministrar únicamente insulina al medio de maduración (Fig.3). Estos resultados sugieren que son las gonadotrofinas (y no la insulina), las hormonas implicadas en el consumo de glucosa en los ovocitos porcinos.

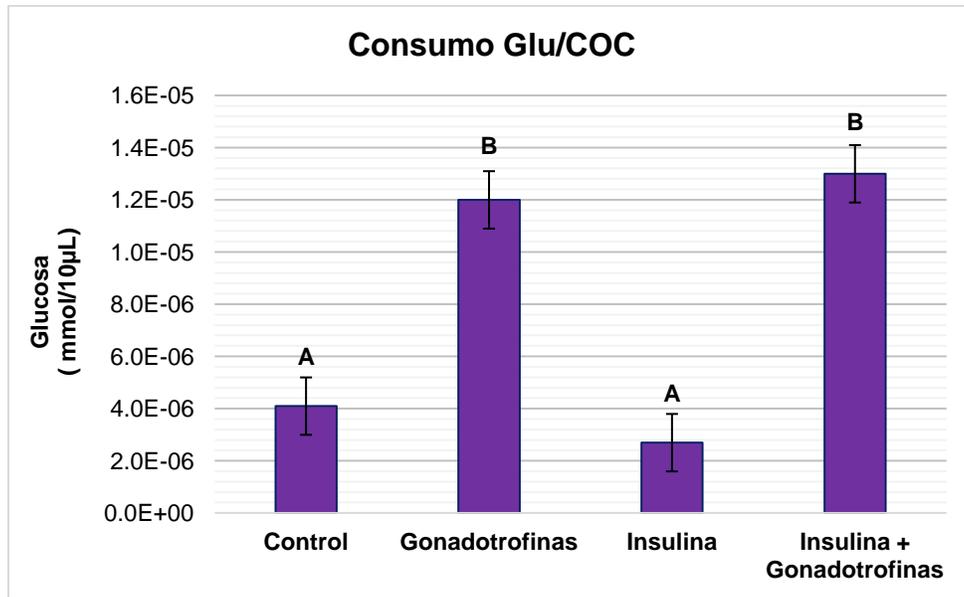


Figura 3. El gráfico muestra el consumo de glucosa por tratamientos, medido en mmol por COC (equivalente a mmoles/10µl). ^{A, B} Barras con diferente índice indican diferencias significativas ($p < 0,0001$). N= 204 (10 COCs/tratamientos, con 5 repeticiones).

INCORPORACIÓN DE GLUCOSA AL COC PORCINO

Para observar el efecto de las gonadotrofina y la insulina sobre la incorporación de glucosa al COC porcino, se midió la fluorescencia emitida por la 6-NBDG (derivado fluorescente de glucosa) luego de incorporarse a dichas células. Los resultados muestran que 6-NBDG es absorbida por las células del cumulus y no por el ovocito (Fig. 4). Al cuantificar la fluorescencia no se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos, ni de estos comparados con el control lo que sugiere que las gonadotrofinas y la insulina no producen efectos sobre la absorción (incorporación a las células) de la glucosa al COC porcino cultivado in vitro, en los tiempos observados en estos ensayos (Fig. 5).

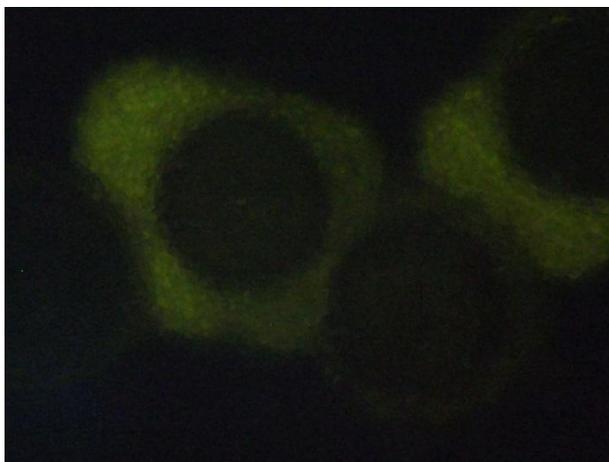


Figura 4: Microfotografía fluorescente de COCs porcinos que incorporaron 6-NBDG. Se observan las células del cumulus coloreadas de verde rodeando al ovocito (400X de magnificación).

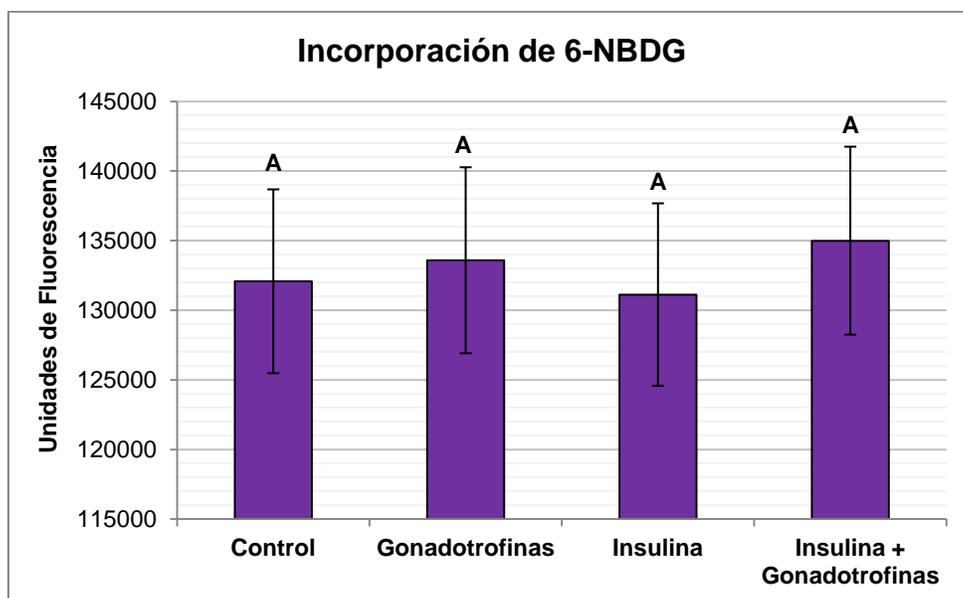


Figura 5. El gráfico muestra la incorporación de glucosa al COC porcino por tratamientos, medido en unidades de fluorescencia. ^{A, B} Barras con igual índice indican que no hay diferencias significativas ($p > 0,05$). N= 160 (20 COCs/tratamientos, con 2 repeticiones).

DETERMINACIÓN DE GLUT 4 EN EL COC PORCINO Y EFECTO DE LAS GONADOTROFINAS E INSULINA SOBRE SU LOCALIZACIÓN

DETERMINACIÓN DE GLUT 4 EN EL COC PORCINO

La presencia del Glucotransportador 4 en el COC porcino, fue determinada mediante inmunocitoquímica con anticuerpos anti GLUT 4 y ensayo de Western blot. La inmunolocalización resultó positiva, evidenciando la presencia de este glucotransportador tanto en el ovocito como en las células del cumulus (Fig. 6). El GLUT 4 está presente tanto en los Complejos Ovocitos Cumulus inmaduros como maduros. La presencia del GLUT 4 en los COCs inmaduros sugiere que la existencia de este glucotransportador es previa, y no se debe a un efecto de la maduración in vitro. Por otro lado, el control de anticuerpo (CN) resultó negativo, lo que indicaría que la marcación en el COC porcino se debe a la presencia de GLUT 4.

El ensayo de Western blot permitió evaluar la correspondencia de la proteína marcada de manera inmunocitoquímica con GLUT 4 en el COC porcino. Dicho análisis reveló una banda distintiva de peso molecular ~ 55 kDa correspondiente con el transportador de glucosa GLUT 4 (Fig. 7).

EFFECTO DE LAS GONADOTROFINAS E INSULINA SOBRE SU LOCALIZACIÓN

También se analizó el efecto de las gonadotrofinas y la insulina sobre la presencia del GLUT 4 en el COC porcino. Los COCs previamente madurados bajo los tratamientos con estas hormonas fueron analizados mediante inmunolocalización. Se observó la presencia de GLUT 4 tanto en los COCs madurados bajo el efecto de gonadotrofinas y de insulina respectivamente y en presencia de ambas en combinación. La presencia del transportador de glucosa tanto en las células del cumulus como en el ovocito, no se vió afectada por el estímulo de dichas hormonas, es decir, su localización persiste en el COC luego de la maduración in vitro con dichas hormonas (figura 6).

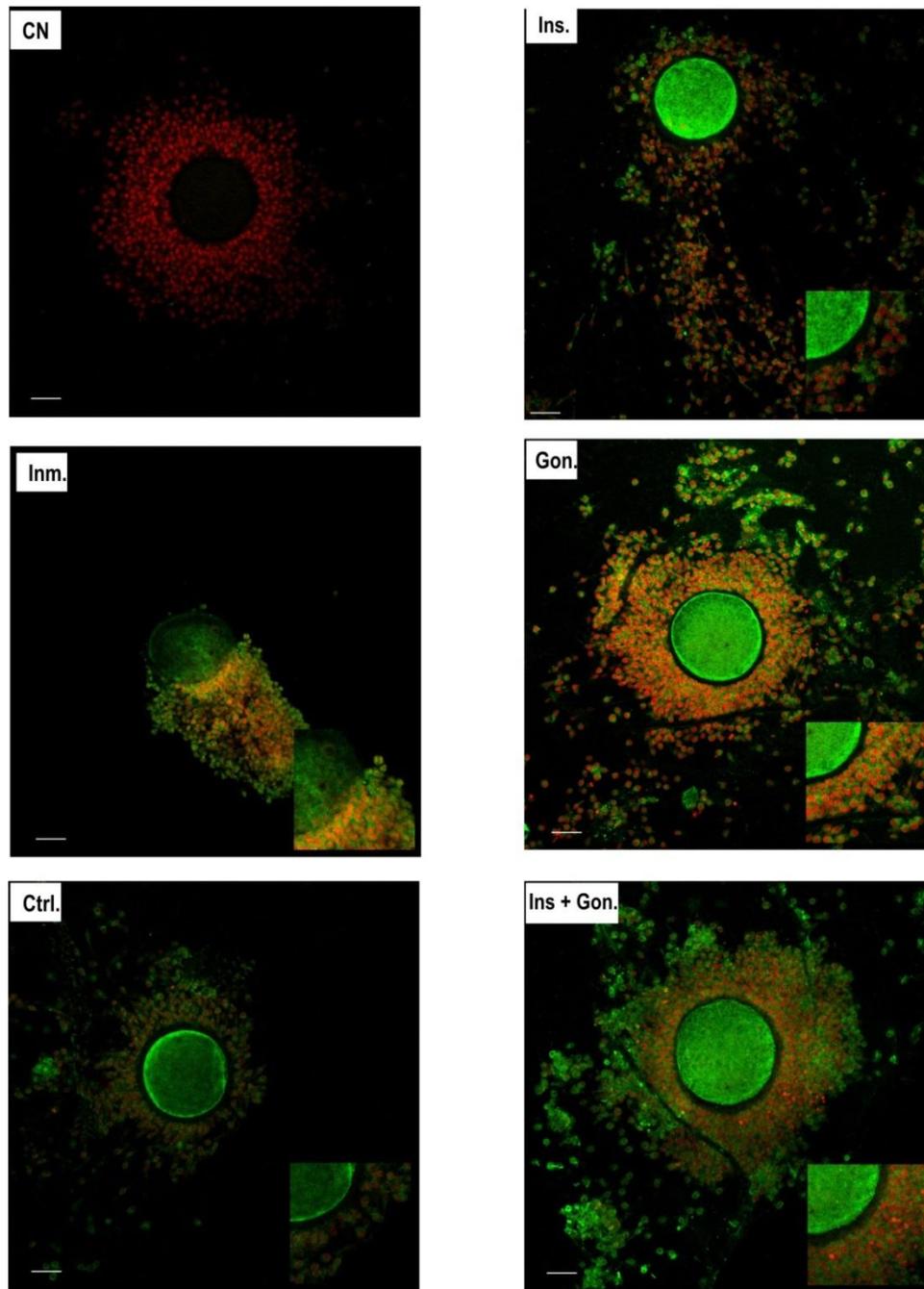


Figura 6. Microfotografía confocal fluorescente, correspondiente a inmunocitoquímica para GLUT 4 en el COC porcino. En Rojo: Marcación de contraste con IP (núcleos de las células del cúmulus). En Verde: Marcación de GLUT 4. CN: Control negativo; Inm: Inmaduro; Ctrl: Control tratamientos; Ins: Insulina; Gon: Gonadotrofinas; Ins + Gon: Insulina + Gonadotrofinas. La barra indica 50 μm.

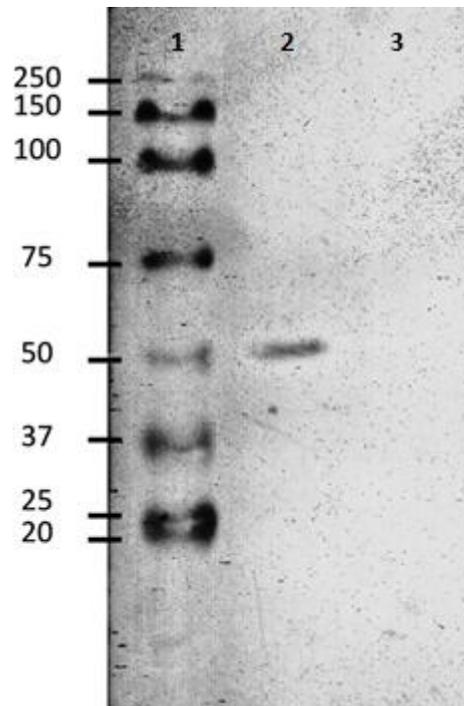


Figura 7. Western blot para el transportador de glucosa GLUT 4 en el COC porcino. Calle 1: Marcador de peso molecular. Calle 2: Extractos proteicos de COCs porcinos maduros (banda PM ~55 KDa correspondiente al GLUT 4). Calle 3: Control negativo.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

Para determinar si las hormonas Folículo Estimulante, Luteinizante e Insulina regulan la incorporación de glucosa en el COC porcino, en este trabajo de investigación se analizó el efecto de dichas hormonas sobre la tasa de maduración de los ovocitos. Así como también, sus efectos individuales sobre el consumo y la incorporación de glucosa al complejo ovocito cumulus durante la maduración in vitro. Además, se determinó la presencia del glucotransportador 4 (GLUT 4) localizado tanto en las células del cumulus como en el ovocito porcino.

El porcentaje de ovocitos en metafase II aumentó significativamente al suministrar gonadotrofinas (LH y FSH) y gonadotrofinas combinadas con insulina al medio de maduración. Mientras que la insulina por sí sola no tuvo efecto sobre la maduración nuclear. Sin embargo, al analizar los efectos de dichas hormonas sobre la maduración citoplasmática, los resultados muestran un aumento significativo del porcentaje de ovocitos fecundados en aquellos COCs madurados bajo influencia de insulina. Del mismo modo que al suplementar los medios de cultivo con gonadotrofinas y con ambas hormonas en combinación.

El análisis del consumo de glucosa en los COCs porcinos madurados in vitro resultó en un aumento significativo en el consumo de esta hexosa en los COCs cultivados en medios suplementados con gonadotrofinas. Este hallazgo concuerda con los resultados obtenidos en otras especies, donde se evidencia el efecto estimulador de las gonadotrofinas, principalmente de la FSH sobre la utilización de glucosa y la maduración nuclear por activación de la vía de las pentosas fosfato

[16]; [15]. Contrariamente, el agregado de insulina al medio de maduración no tuvo efectos significativos sobre el consumo de glucosa; mientras que en aquellos ovocitos madurados bajo influencia de gonadotrofinas e insulina el consumo de glucosa también aumentó significativamente, respecto del control.

Estos resultados sugieren que las gonadotrofinas son necesarias para la maduración nuclear de los ovocitos porcinos por estimulación del metabolismo de glucosa y que el agregado de insulina tiene un efecto mejorador sobre la maduración citoplasmática de los ovocitos, sugiriendo que dicha hormona actuaría como un factor trófico estimulando el crecimiento celular y promoviendo la síntesis de biomoléculas necesarias para lograr que el ovocito alcance sus competencias de desarrollo, en vez de como un inductor metabólico en dicho sistema [57].

El análisis de la incorporación de glucosa al complejo ovocito cumulus porcino, utilizando un análogo fluorescente de glucosa (6-NBDG), mostró que la misma ingresa a las células del cumulus, pero no al ovocito, reforzando la idea que son estas células las que metabolizan principalmente la hexosa, proveyendo de sustratos energéticos, como piruvato y lactato al ovocito [74]; [14, 75]. Curiosamente, las gonadotrofinas y la insulina no tienen efecto sobre la incorporación de la glucosa al COC porcino, dado que no se evidencian diferencias significativas en la entrada de 6-NBDG a los complejos cultivados bajo influencia de estas hormonas. Este último resultado refuerza la idea de que la insulina no actúa como inductor metabólico, ni tiene efecto sobre el metabolismo de la glucosa, durante la maduración in vitro del ovocito en estos complejos y que, como se sugirió anteriormente, podría operar como un factor de crecimiento

celular [58]. Mientras que las gonadotrofinas estimulan el metabolismo de la hexosa durante la maduración, pero su efecto no sería ejercido sobre el mecanismo de absorción o transporte de la misma, sino sobre el consumo de la glucosa y su utilización como sustrato en las diversas vías metabólicas (glucolítica, PPP y hexosaminas) [17, 76, 77] Es decir, la entrada de glucosa a las células del cumulus no sería regulada directamente por gonadotrofinas, sino que el efecto de dichas hormonas consistiría en la estimulación de las vías metabólicas de la glucosa y consecuentemente el flujo a través de estas.

Esto nos hace pensar en efectos diferentes de ambas hormonas sobre la maduración y el consumo de glucosa en el COC porcino. La insulina ejercería una acción trófica estimulando la maduración citoplasmática del ovocito, sin incidencias sobre el consumo ni la utilización de glucosa durante la maduración in vitro. Mientras que las gonadotrofinas estimularían el consumo de glucosa por acción directa sobre el metabolismo, pero no sobre su absorción, y dicha activación conduciría a la maduración nuclear del ovocito. Puede inferirse también, que las gonadotrofinas tienen un efecto positivo sobre la maduración citoplasmática, dicho efecto podría ser promovido por estímulo sobre el metabolismo glicosídico que estas hormonas mostraron.

Otro de los objetivos de este estudio fue caracterizar la presencia de transportadores de glucosa en los complejos ovocito cumulus porcino, particularmente el GLUT 4, un transportador insulino dependiente. Mediante inmunocitoquímica hemos localizado dicho glucotransportador tanto en las células del cumulus como en el ovocito. Además observamos que éste se encuentra

presente tanto en COCs inmaduros como en COCs madurados in vitro. Además pudo observarse la presencia de GLUT 4 en aquellos COCs madurados bajo influencia de gonadotrofinas e insulina, durante la maduración in vitro. Ya sea en forma individual o en presencia de ambas hormonas.

Otros autores describieron que la FSH estimula la vía de PI3K. La activación de esta vía lleva al aumento de los niveles de Akt fosforilada que resulta en la translocación de GLUT 4 a la membrana plasmática de las células de la granulosa, [78]; [79]. Esto nos lleva a pensar que las gonadotrofinas poseen una estrecha relación con las vías de señalización de la insulina, y es por eso que observamos un comportamiento similar en la localización de GLUT 4, donde ni las gonadotrofinas ni la insulina producen una mayor captación de 6-NBDG.

Ahora bien, este hallazgo parece discrepar con lo expuesto anteriormente, respecto de que ni las gonadotrofinas, ni la insulina promueven el ingreso de glucosa al COC porcino, pero mantienen la presencia del GLUT 4 en dichas células. Una explicación válida para esto, podría ser que la glucosa ingresara a las células de la granulosa mediante otro glucotransportador, no descrito aún en el COC porcino (por ejemplo, GLUT 1 o 3 caracterizados en COCs de otras especies) [80]; [81]; [26] y es por eso que los COCs no tratados incorporaron 6-NBDG. El aumento en el consumo de glucosa observado para las gonadotrofinas puede explicarse por su acción estimulante sobre las diferentes vías metabólicas que utilizan este azúcar (glucólisis, vía de las pentosas fosfato, vía de las hexosaminas), agotando dicho sustrato dentro de las células y ocasionando una mayor demanda de glucosa. Sin embargo, al suministrar al medio de cultivo un

análogo de glucosa no metabolizable (6-NBDG), las vías metabólicas FSH-inducidas no pueden utilizar el sustrato que se acumula en el citoplasma y por esta razón no observamos un efecto significativo de estas hormonas comparadas con el control.

Por su parte, la insulina podría estimular la relocalización del GLUT 4, pero no intervenir en la activación del metabolismo de la glucosa, es por ello que no observamos efecto de esta hormona en el consumo de glucosa. A pesar de estar propuesto el mecanismo de PI3K, el cual interviene en el reclutamiento de GLUT 4, la insulina no estaría utilizando este mecanismo durante la maduración in vitro de COCs porcinos.

No podemos asegurar que las gonadotrofinas y la insulina ejercen su efecto sobre la expresión génica de GLUT 4 o sobre su síntesis, debido a que nuestro experimento no incluye un análisis de la inducción, ya sea, a nivel de transcripción del gen *SCL2A4* o de la traducción del ARNm de dicho gen, ya sintetizado. Tampoco podemos diferenciar si la proteína, ya sintetizada, está completamente retenida en vesículas dentro del citoplasma (no reclutada) o si existe una proporción unida a la membrana plasmática del ovocito. En este sentido, sería de interés poder profundizar estos resultados en experimentos futuros.

La presencia del transportador durante la maduración con insulina y gonadotrofinas posiblemente constituya una competencia para que el ovocito logre sostener el desarrollo embrionario. Es decir, la presencia del glucotransportador durante la maduración e instancias posteriores de desarrollo embrionario, podría

no ser inherente a una mayor utilización de glucosa durante la maduración in vitro, sino, ser un componente más de la maduración citoplasmática, en la que el ovocito sintetiza las proteínas necesarias para el futuro desarrollo embrionario. Diversos trabajos no pudieron detectar la utilización de glucosa por el ovocito. Situación que cambia notablemente en el embrión, el cual incorpora y utiliza directamente este azúcar durante sus primeros días de desarrollo [28, 82-84].

Ahora bien, el propósito del estudio del metabolismo de la glucosa en el COC porcino y el análisis de los efectos de dos hormonas complementarias para la maduración in vitro de ovocitos porcinos sobre este, pretendía responder o clarificar su uso en los medios de cultivos.

En todos los casos ensayados en el presente estudio, las concentraciones de glucosa (correspondiente a 5,5 mM según la formulación del medio TCM199) fueron constantes. Se pudo observar que el suministro de gonadotrofinas estimula notablemente el consumo de esta hexosa durante la MIV. Además dichas hormonas incrementan el porcentaje de maduración nuclear y citoplasmática. La insulina no tiene efecto sobre el consumo de glucosa y su influencia sobre la maduración citoplasmática del ovocito no potencia el efecto logrado con gonadotrofinas. Si bien el receptor de insulina tiene una presencia constitutiva en el COC porcino y en otras células del folículo [55], la presencia de insulina en el cultivo in vitro no parece accionar mecanismos implicados en la maduración nuclear, ni en el metabolismo glucídico. Eventualmente los efectos de dicha hormona podrían hacerse evidentes en estadios postcigóticos. Posiblemente la

maduración de ovocitos porcino bajo influencia de la insulina mejore los resultados del desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hunter, M., *Oocyte maturation and ovum quality in pigs*. Rev Reprod 5:122-30., 2000.
2. Anderson, L., "Reproducción e inseminación artificial en animales". 7° ed, ed. D.F. Eds. Hafez B y Hafez ESE. McGraw-Hill. México. 2002. 188-198.
3. Wassarman, P., *The mammalian ovum*. In "The physiology of reproduction". ed. L. Eds. Knobil E and Neill J. Raven Press, New York. 1988. 69-102.
4. Gigli I, R.A., Agüero A, *Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos.*, ed. I.V. 8. 2006. 183-204.
5. Wassarman P, A.D., *The mammalian ovum*. In "The physiology of reproduction". ed. L. Eds. Knobil E and Neill J. Raven Press, New York. 1994.
6. Claver J, S.A., Sicardi A, Lawzewitsch I, *Aparato reproductor femenino comparado*. En "Lecciones de histología veterinaria". 3° ed, ed. A. Editorial Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires. 1987. 1-77.
7. Mazuecos, A., *Bases fisiológicas de la reproducción en la hembra*. En "Fisiología Veterinaria", ed. E.G.S.A.M.-H.I.d.E. Madrid. 1995.
8. Motlik J, C.N., Fluka J, *Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles*. J Reprod Fertil 72:323-328, 1984.
9. Moor RM, M.M., Ding J, Nagai T, *Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro*. Reprod Fertil Suppl 40:197-210., 1990.
10. Eppig, J., *Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals*. Reprod Fertil Dev 8:485-489., 1996.
11. Abeydeera, L., *In vitro production of embryos in swine*. Theriogenology 57:257-273, 2002.
12. Krisher, R.L. and B.D. Bavister, *Responses of oocytes and embryos to the culture environment*. Theriogenology, 1998. 49(1): p. 103-14.
13. Cetica, P.D., G.C. Dalvit, and M.T. Beconi, *Study of evaluation criteria used for in vitro bovine oocyte selection and maturation*. Biocell, 1999. 23(2): p. 125-33.
14. Cetica, P., et al., *Involvement of enzymes of amino acid metabolism and tricarboxylic acid cycle in bovine oocyte maturation in vitro*. Reproduction, 2003. 126(6): p. 753-63.
15. Sutton-McDowall, M.L., R.B. Gilchrist, and J.G. Thompson, *Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone*. Reproduction, 2004. 128(3): p. 313-9.
16. Downs, S.M., P.G. Humpherson, and H.J. Leese, *Meiotic induction in cumulus cell-enclosed mouse oocytes: involvement of the pentose phosphate pathway*. Biol Reprod, 1998. 58(4): p. 1084-94.

17. Alvarez, G.M., et al., *Modulation of glycolysis and the pentose phosphate pathway influences porcine oocyte in vitro maturation*. *Reprod Domest Anim*, 2013. 48(4): p. 545-53.
18. Thompson, J., *The impact of nutrition of the cumulus oocyte complex and embryo on subsequent development in ruminants*. *Reprod Dev*. 2006 Feb;52(1):169-75., 2006.
19. Govers, R., *Cellular Regulation of Glucose Uptake by Glucose Transporter GLUT4*. Chapter 6, ed. A.i.C. Chemistry. Vol. 66. 2014: Elsevier Inc. ISSN 0065-2423. 173-218.
20. Shaohui Huang and Michael P. Czech, *The GLUT4 Glucose Transporter*. *Cell Metab*. 2007 Apr;5(4):237-52, 2007.
21. Katz EB, et al., *Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4*. *Nature*. 1995 Sep 14;377(6545):151-5., 1995.
22. Stenbit AE, et al., *GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes*. *Nat Med*. 1997 Oct;3(10):1096-101., 1997.
23. Li J, et al., *Reduced glucose uptake precedes insulin signaling defects in adipocytes from heterozygous GLUT4 knockout mice*. *FASEB J*. 2000 Jun;14(9):1117-25., 2000.
24. Purcell, S.H. and K.H. Moley, *Glucose transporters in gametes and preimplantation embryos*. *Trends Endocrinol Metab*, 2009. 20(10): p. 483-9.
25. Wang, Q., et al., *An intercellular pathway for glucose transport into mouse oocytes*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012. 302(12): p. E1511-8.
26. Basconi, V., et al., *Caracterización de los glucotransportadores y la acción pleiotrópica de la metformina en células de la granulosa de pacientes con síndrome de ovario poliquístico*. *Reproducción*, 2012. 27: p. 19-30.
27. Kol, S., et al., *The midcycle increase in ovarian glucose uptake is associated with enhanced expression of glucose transporter 3. Possible role for interleukin-1, a putative intermediary in the ovulatory process*. *J Clin Invest*, 1997. 99(9): p. 2274-83.
28. Zheng, P., R. Vassena, and K.E. Latham, *Effects of in vitro oocyte maturation and embryo culture on the expression of glucose transporters, glucose metabolism and insulin signaling genes in rhesus monkey oocytes and preimplantation embryos*. *Mol Hum Reprod*, 2007. 13(6): p. 361-71.
29. Priedkalns, J., *Sistema reproductor femenino*. . 2° ed. En "Histología veterinaria". ed. E. Dellmann H. Editorial Acribia S. A. Zaragoza. 1994. 267-290.
30. Davidson AP and S. GH, *Control del desarrollo gonadal y de los gametos*. 2° ed, ed. F.v.E.C.M. DF. 1999. 499-509.
31. Hafez, E.S.E., M.R. Jainudeen, and Y. Rosnina, *Hormonas, factores de crecimiento y reproducción*, in *Reproducción e insimulación artificial en animales*, H.E. Hafez B, Editor. 2002, McGraw-Hill Interamerica Editores, S.A: DF, México. p. 33-55.
32. Tanghe, S., et al., *Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization*. *Mol Reprod Dev*, 2002. 61(3): p. 414-24.
33. Dekel, N., *Meiotic cell cycle, oocytes*, ed. E.o. *Reproduction*". Vol. 3. 1999. 168-176.

34. Zhang M, Ouyang H, and X. G., *The signal pathway of gonadotrophins induced mammalian oocyte meiotic resumption* Mol Hum Reprod. 2009 Jul;15(7):399-409.,2009.
35. Mehlmann LM, *Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation*. Reproduction. 2005 Dec;130(6):791-9, 2005.
36. Su YQ, et al., *Protein kinase C and intracellular calcium are involved in follicle-stimulating hormone-mediated meiotic resumption of cumulus cell-enclosed porcine oocytes in hypoxanthine-supplemented medium*. Mol Reprod Dev 1999;53:51–58.,1999.
37. Downs SM, C.J. and H.-D. M, *Protein kinase C and meiotic regulation in isolated mouse oocytes*. Mol Reprod Dev 2001;58:101–115., 2001.
38. Jin S, Z.M., et al., *Meiosis activating sterol (MAS) regulate FSH-induced meiotic resumption of cumulus cell-enclosed porcine oocytes via PKC pathway*. Mol Cell Endocrinol. 2006 Apr 25;249(1-2):64-70. , 2006.
39. Tao Y, et al., *Nitric oxide influences the meiotic maturation of porcine oocytes cultured in hypoxanthinesupplemented medium*. Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2005 Feb;89(1-2):38-44., 2005.
40. Zhang M, et al., *Gonadotropin-controlled mammal oocyte meiotic resumption*. Front Biosci. 2007 Jan 1;12:282-96., 2007.
41. Downs, S.M. and A.M. Utecht, *Metabolism of radiolabeled glucose by mouse oocytes and oocyte-cumulus cell complexes*. Biol Reprod, 1999. 60(6): p. 1446-52.
42. Galardo, M.N., et al., *Regulation of expression of Sertoli cell glucose transporters 1 and 3 by FSH, IL1 beta, and bFGF at two different time-points in pubertal development*. Cell Tissue Res, 2008. 334(2): p. 295-304.
43. Nagyova E, *Regulation of cumulus expansion and hyaluronan synthesis in porcine oocyte-cumulus complexes during in vitro maturation*. Endocr Regul. 2012 Oct;46(4):225-35, 2012.
44. Mattioli, M., et al., *Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes in vitro*. Theriogenology, 1991. 36(1): p. 95-105.
45. Sun, Q.Y., et al., *Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size, and protein synthesis inhibition*. Mol Reprod Dev, 2001. 59(2): p. 192-8.
46. Schoevers, E.J., et al., *Effect of follicle-stimulating hormone on nuclear and cytoplasmic maturation of sow oocytes in vitro*. Theriogenology, 2003. 59(9): p. 2017-28.
47. Alvarez, G.M., G.C. Dalvit, and P.D. Cetica, *Influence of the cumulus and gonadotropins on the metabolic profile of porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation*. Reprod Domest Anim, 2012. 47(5): p. 856-64.
48. Blanco A, *Bases bioquímicas de la endocrinología*. 8° ed, ed. Q. Biológica. 2007. 433-445.
49. Kane S, et al., *A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain*. J Biol Chem. 2002 Jun 21;277(25):22115-8, 2002.

50. Lansey MN, et al., *Deletion of Rab GAP AS160 modifies glucose uptake and GLUT4 translocation in primary skeletal muscles and adipocytes and impairs glucose homeostasis.* Am J Physiol Endocrinol Metab. 2012 Nov 15;303(10):E1273-86., 2012.
51. Olivares Reyes JA and A.P. A., *Bases Moleculares de las Acciones de la Insulina.* REB 27(1): 9-18, 2008, 2008.
52. Purcell, S.H., et al., *Insulin-stimulated glucose uptake occurs in specialized cells within the cumulus oocyte complex.* Endocrinology, 2012. 153(5): p. 2444-54.
53. Sanchez-Chavez, G., et al., *Insulin stimulated-glucose transporter Glut 4 is expressed in the retina.* PLoS One, 2012. 7(12): p. e52959.
54. Carbo, R. and V. Guarner, *Insulin effect on glucose transport in thymocytes and splenocytes from rats with metabolic syndrome.* Diabetol Metab Syndr, 2010. 2: p. 64.
55. Quesnel, H., *Localization of binding sites for IGF-I, insulin and GH in the sow ovary.* J Endocrinol, 1999. 163(2): p. 363-72.
56. Sarkissian M, Mendez R, and R. JD., *Progesterone and insulin stimulation of CPEB-dependent polyadenylation is regulated by Aurora A and glycogen synthase kinase-3.* Genes Dev. 2004 Jan 1;18(1):48-61., 2004.
57. Acevedo N, Ding J, and S. GD., *Insulin signaling in mouse oocytes.* Biol Reprod. 2007 Nov;77(5):872-9. Epub 2007 Jul 11., 2007.
58. Lee, M.S., et al., *The beneficial effects of insulin and metformin on in vitro developmental potential of porcine oocytes and embryos.* Biol Reprod, 2005. 73(6): p. 1264-8.
59. Motlik J, F.J., *Fertilization of pig follicular oocytes cultivated in vitro.* Reprod Fertil 1974; 36: 235-237, 1974.
60. Iritani A, Niwa K, and I. H., *Sperm penetration of pig follicular oocytes matured in culture.* Reprod Fertil 1978; 54: 379-383, 1978.
61. Nagai T, Niwa K, and I. A., *Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes.* Reprod Fertil 1984; 70:271-275, 1984.
62. Mattioli M, et al., *Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro.* Theriogenology. 1989 Jun;31(6):1201-7., 1989.
63. Petters RM and W. KD., *Culture of pig embryos.* J Reprod Fertil Suppl. 1993;48:61-73, 1993.
64. Beckmann LS and D. BN., *Effects of media NaCl concentration and osmolarity on the culture of early-stage porcine embryos and the viability of embryos cultured in a selected superior medium.* Theriogenology. 1993 Mar;39(3):611-22, 1993.
65. Funahashi H and Day BN, *Advances in in vitro production of pig embryos.* J Reprod Fertil Suppl. 1997;52:271-83, 1997.
66. Abeydeera, L.R., et al., *Effect of incubation temperature on in vitro maturation of porcine oocytes: nuclear maturation, fertilisation and developmental competence.* Zygote, 2001. 9(4): p. 331-7.

67. Nagai, T., *The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes*. Theriogenology 2001; 55: 1291-1301, 2001.
68. Niemann H and R. D., *Progress in reproductive biotechnology in swine*. Theriogenology. 2001 Nov 1;56(8):1291-304, 2001.
69. Zheng YS and S. MA., *The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on in vitro maturation and fertilization of porcine oocytes*. Theriogenology. 1992 Apr;37(4):779-90, 1992.
70. Yoshida M, *Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro*. Mol Reprod Dev. 1993 May;35(1):76-81, 1993.
71. Funahashi, H., T.C. Cantley, and B.N. Day, *Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization*. Biol Reprod, 1997. 57(1): p. 49-53.
72. Abeydeera, L.R. and B.N. Day, *In vitro penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium*. Theriogenology, 1997. 48(4): p. 537-44.
73. Da-Woon Jung, et al., *Novel use of fluorescent glucose analogues to identify a new class of triazine-based insulin mimetics possessing useful secondary effects*. Mol Biosyst. 2011 Feb;7(2):346-58, 2010.
74. Biggers, J.D., D.G. Whittingham, and R.P. Donahue, *The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1967. 58(2): p. 560-7.
75. Cetica, P.D., et al., *Effect of lactate dehydrogenase activity and isoenzyme localization in bovine oocytes and utilization of oxidative substrates on in vitro maturation*. Theriogenology, 1999. 51(3): p. 541-50.
76. Gutnisky C, et al., *Influence of hyaluronic acid synthesis and cumulus mucification on bovine oocyte in vitro maturation, fertilisation and embryo development*. Reprod Fertil Dev. 2007;19(3):488-97, 2007.
77. Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, and T. J, *The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence* Reproduction. 2010 Apr;139(4):685-95, 2010.
78. Roberts, R., et al., *Energy substrate metabolism of mouse cumulus-oocyte complexes: response to follicle-stimulating hormone is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway and is associated with oocyte maturation*. Biol Reprod, 2004. 71(1): p. 199-209.
79. Anjali G, et al., *FSH stimulates IRS-2 expression in human granulosa cells through cAMP/SP1, an inoperative FSH action in PCOS patients*. Cell Signal. 2015 Sep 24;27(12):2452-2466, 2015.
80. Dan-Goor, M., et al., *Expression of glucose transporter and glucose uptake in human oocytes and preimplantation embryos*. Hum Reprod, 1997. 12(11): p. 2508-10.
81. Zheng P, Vassena R, and L. KE., *Effects of in vitro oocyte maturation and embryo culture on the expression of glucose transporters, glucose metabolism and insulin signaling genes in rhesus monkey oocytes and preimplantation embryos*. Mol Hum Reprod. 2007 Jun;13(6):361-71. Epub 2007 Apr 7., 2007.

82. Augustin, R., et al., *Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos*. Mol Reprod Dev, 2001. 60(3): p. 370-6.
83. Sturmev, R.G. and H.J. Leese, *Energy metabolism in pig oocytes and early embryos*. Reproduction, 2003. 126(2): p. 197-204.
84. Lee MS, et al., *The Beneficial Effects of Insulin and Metformin on In Vitro Developmental Potential of Porcine Oocytes and Embryos* Biol Reprod. 2005 Dec;73(6):1264-8. Epub 2005 Aug 17, 2005.