

# Regulación de la maduración del Oocito Bovino por ampc

## Regulation in the maturation of Bovine Oocyte

Neil A Vásquez<sup>1</sup>, Yuddy S López<sup>2</sup>, Elder E Escobar<sup>3</sup>, Biol, MSc; Bernardo Agudelo<sup>4</sup>,

### RESUMEN

---

*Durante la dinámica folicular, las hormonas estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH) actúan sobre las células somáticas (células de la teca y de la granulosa), activando una cascada de señalización a través del AMPc, responsable de la maduración citoplásmica, la competencia meiótica y la ovulación de un oocito apto para sustentar el desarrollo embrionario temprano. Este oocito se encuentra detenido en profase de la meiosis I, desde la vida embrionaria hasta que el pico preovulatorio de LH induce la continuación de la meiosis hasta metafase II, proceso conocido como maduración nuclear del oocito. Esta maduración puede ser modulada por sustancias que inhiben las fosfodiesterasas (PDE) aumentando los niveles de AMPc en el oocito o en células de la granulosa. Debido a la expresión específica de las PDE en la unidad folicular, es posible inhibir la PDE del oocito prolongando un bloqueo meiótico, o inducir la continuación de la meiosis inhibiendo la PDE de las células de la granulosa. Esto facilita el desarrollo de medicamentos específicos que modulen la señalización en los diferentes procesos reproductivos.*

### PALABRAS CLAVE:

---

*Oocito, Meiosis, AMPc, PDE, Fosfodiesterasa.*

### ABSTRACT

---

*During follicular dynamic, the Follicular Stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone (LH) works over somatic cells (theca cells and granulosa cells), activating a signaling way through cAMP, responsible of cytoplasmatic maturation, meiotic competence and ovulation of an oocyte able for sustain the embryo early development. This oocyte is arrested in prophase of meiosis I,*

---

1,2 Biol, MSc. Grupo de Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias - Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín,

3 Instituto Antioqueño de Reproducción – INSER, 4 Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Correspondencia: nvasquez@unalmed.edu.co

(Recibido el 15 de diciembre de 2005 y aceptado el 31 de enero de 2006)

*since embryo life, until metaphase II, process known like oocyte nuclear maturation. This maturation can be modulated by substances that inhibit the phosphodiesterases (PDE) increasing cAMP levels into oocyte or into granulosa cells. Because of specific expression of PDE into follicular unit, is possible inhibit the PDE from oocyte prolonging a meiotic blockage or to induce the resumption of meiosis inhibiting the PDE of granulosa cells. This make easy the specific drugs development that modulated the signaling in the different reproductive process.*

## **KEY WORD:**

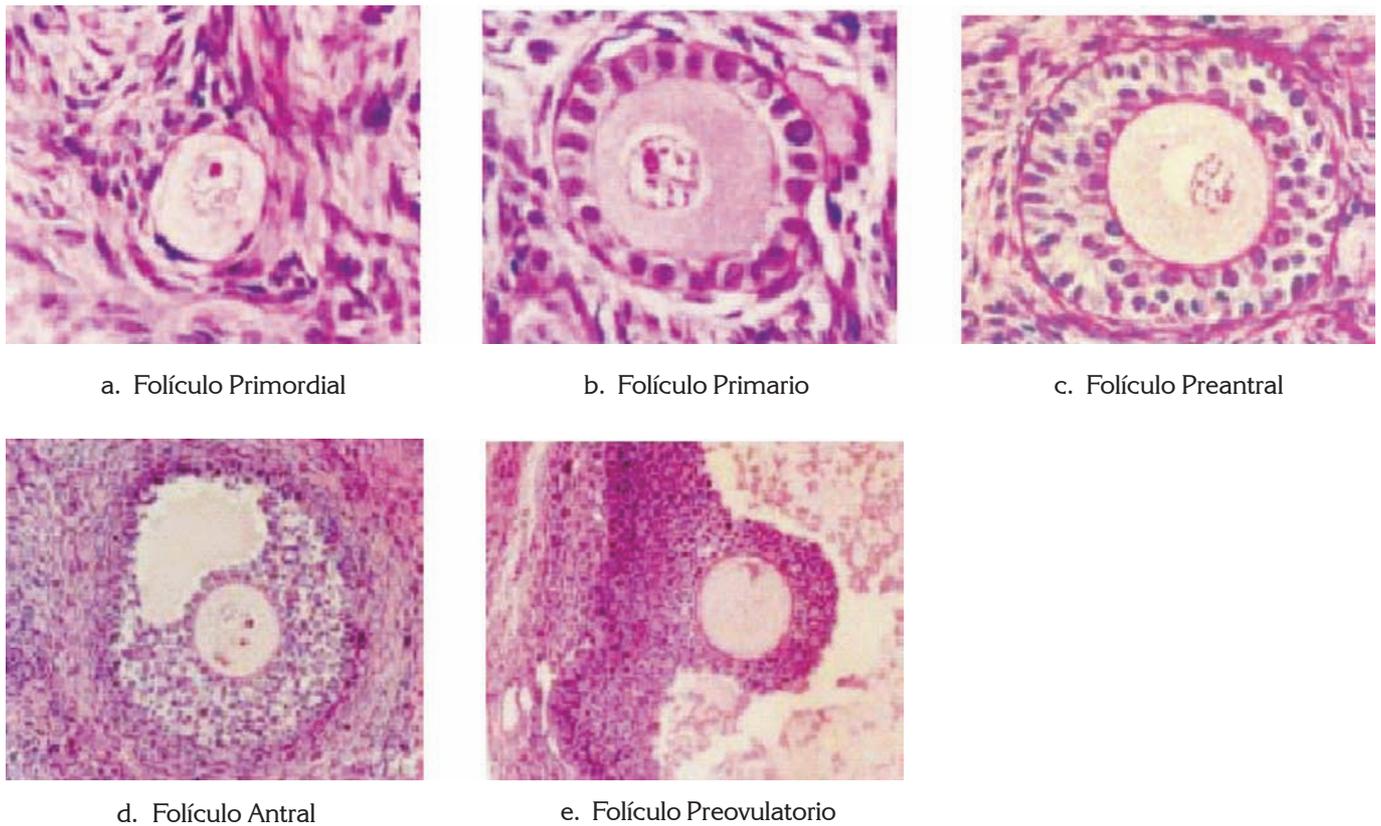
*Oocyte, Meiosis, cAMP, PDE, Phosphodiesterase.*

## **1. DINÁMICA FOLICULAR**

En el ciclo estral bovino, se dan procesos y cambios cíclicos en el ovario y el tracto reproductivo de la vaca que conducen a la formación de un folículo listo para ovular<sup>(39)</sup>. El proceso para la formación de éste folículo comienza muy temprano en el desarrollo embrionario, cuando después de la décima semana, la célula germinal primordial se transforma en oogonia, la cual prolifera por mitosis e invade la gónada indiferenciada. Al terminar la mitosis, la oogonia entra en el ciclo meiótico hasta el estado de diplotene de la profase I, donde adquiere el estadio de oocito primario, rodeado por una sola capa de células de la pregranulosa de forma aplanada, estableciendo así el denominado folículo primordial (ver figura 1). Este folículo inicia un proceso de crecimiento hasta alcanzar el estadio de folículo primario, caracterizado por una sola capa de células de la granulosa pero de forma cuboidal. El folículo primario pasa por

un período de transición hacia el estadio de folículo secundario, el cual está conformado por un oocito primario rodeado por dos a siete capas de células de la granulosa y por las células de la teca, ambos tipos de células tienen la capacidad de sintetizar esteroides. El crecimiento desde folículo primordial hasta secundario es mediado por factores de crecimiento intrínsecos de la unidad folicular, pero independiente de gonadotropinas. Durante el estadio de folículo secundario se adquiere la capacidad de responder a las gonadotropinas: hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH), las cuales estimulan el mayor potencial esteroidogénico y mitótico de las células somáticas de la unidad folicular, incluyendo la formación del antro folicular y su diferenciación al siguiente estadio, folículo antral, hasta llegar a folículo preovulatorio<sup>(2,3)</sup>, que ha alcanzado su máximo nivel de maduración conteniendo un oocito capacitado en citoplasma, pero no nuclearmente.

Durante el período preovulatorio, el pico de LH induce cambios marcados en el folículo y en el complejo cúmulo oocito (CCO). Entre ellos, está el desacoplamiento de las uniones gap en las células del cúmulo, como consecuencia de la disminución en la expresión de la conexina 43, una proteína transmembrana que participa en la formación de este tipo de unión<sup>(1)</sup> y la secreción de ácido hialurónico, un glucosaminoglucano no sulfatado que se hidrata, aumentando el espacio entre las células del cúmulo<sup>(14,28)</sup>. Estos eventos están íntimamente relacionados con la mucificación o expansión del cúmulo, requisito para el desprendimiento del CCO expandido de la pared folicular, la continuación de la meiosis hasta metafase II y el proceso ovulatorio<sup>(33,37)</sup>, adquiriendo la maduración nuclear y capacitándolo para interactuar con los espermatozoides y formar el nuevo embrión<sup>(11,15)</sup>.



**Figura 1.** *Dinámica folicular. Resumen de las principales etapas del crecimiento folicular. a. Folículo Primordial (oocito rodeado por una sola capa de células de la pregranulosa de forma aplanada), b. Folículo Primario (caracterizado por un oocito rodeado por una sola capa de células de la granulosa de forma cuboidal), c. Folículo Preantral (conformado por un oocito rodeado por dos a siete capas de células de la granulosa y por las células de la teca), d. Folículo Antral (caracterizado por la presencia de una cavidad folicular: Antro), e. Folículo Preovulatorio (máximo crecimiento folicular, el cual contiene un oocito detenido en profase I que continuara su meiosis después del pico de hormonas gonadotrópicas FSH y LH) (Tomado de Montgomery, et al., 2001)<sup>(24)</sup>.*

## 2. MADURACIÓN DEL OOCITO

La maduración del oocito es un fenómeno complejo que abarca dos procesos bioquímicamente caracterizados. El primero, la maduración citoplásmica, consiste en las modificaciones ultraestructurales de las organelas y la acumulación de macromoléculas necesarias para apoyar la maduración nuclear, la fertilización y el desarrollo temprano embrionario. El segundo, es la maduración nuclear, en la cual el oocito que se encuentra detenido en profase I progresa hasta el estadio de metafase II, estado evidenciado por la expulsión del primer cuerpo polar<sup>(11)</sup>.

### 2.1 Maduración Citoplásmica.

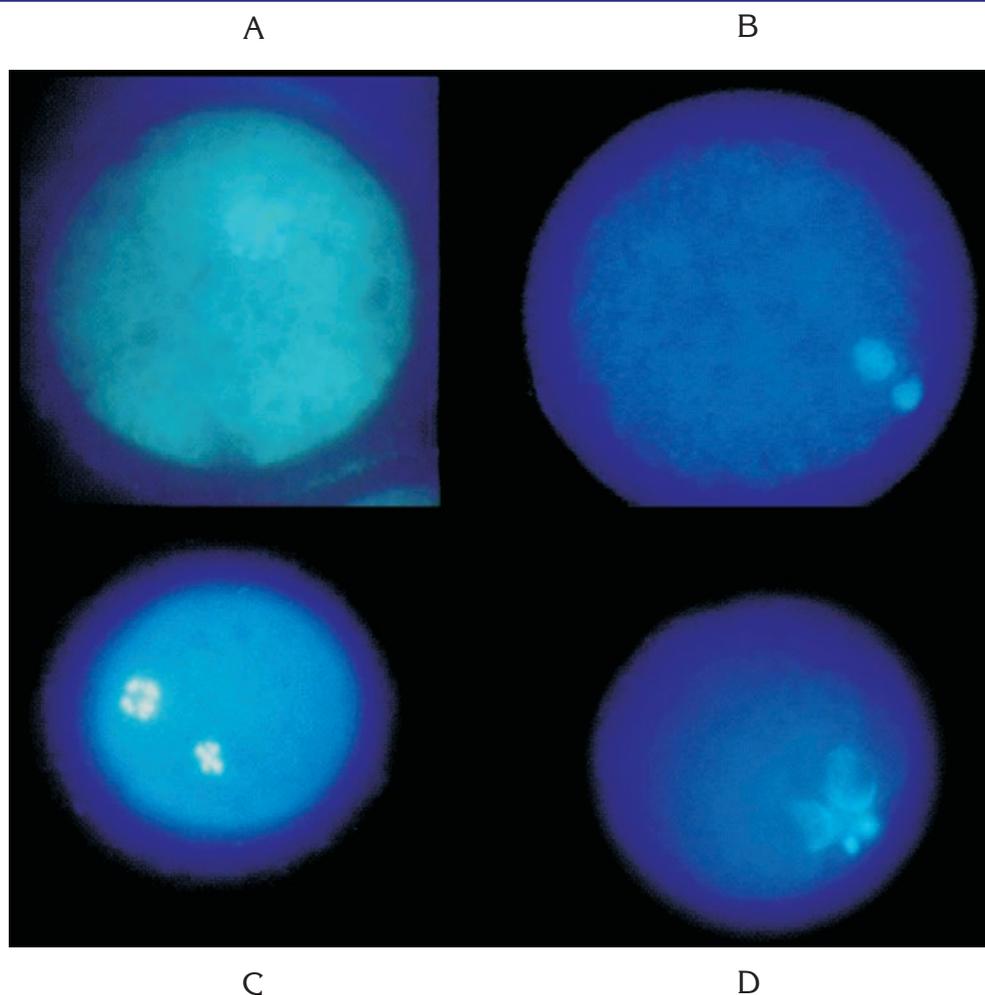
Comprende los cambios ultraestructurales que ocurren en el oocito durante el crecimiento folicular desde el estadio de vesícula germinal hasta metafase II<sup>(8,29)</sup>. Estos cambios ultraestructurales incluyen la migración de la vesícula germinal cerca a la zona pelúcida, la síntesis y acumulación de los diferentes tipos de RNA, ribosomas y polipéptidos<sup>(40)</sup>, localización de las mitocondrias en la periferia del oocito, aumento en el número de aparatos de golgi y en los niveles de glutation, translocación de los gránulos corticales desde el centro del oocito hacia la periferia y su unión a la membrana plasmática<sup>(12)</sup>.

## 2.2. Maduración Nuclear.

Durante el crecimiento folicular el oocito adquiere la competencia meiótica, la cual se refiere a la capacidad del oocito para completar el ciclo meiótico o maduración nuclear. Esta es adquirida progresivamente durante el crecimiento folicular y está estrechamente relacionada con el tamaño del oocito (110  $\mu$ m) y éste a su vez con el tamaño del folículo (2 a 3 mm)<sup>(12,13)</sup>.

El oocito se encuentra detenido en profase de la meiosis I, desde la vida embrionaria hasta que se da el pico preovulatorio de FSH y LH; en res-

puesta a éste, la meiosis continúa hasta metafase II, estadio en el que ocurre el segundo freno meiótico. Como consecuencia el folículo expulsa un oocito completamente maduro (ovulación) y apto para ser fecundado<sup>(40)</sup>. Este proceso de continuación de la meiosis involucra la desintegración de la envoltura nuclear (*GVBD*, *Germinal Vesicle Brake Down*), condensación de cromosomas, formación del huso en metafase I, separación de cromosomas homólogos con expulsión del primer cuerpo polar y freno en metafase II<sup>(12,21,27)</sup>. El oocito de bovino requiere un periodo de 24 horas para completar únicamente la maduración nuclear *in vitro*<sup>(31,30)</sup> (ver figura 2).



**Figura 2.** Estados de maduración nuclear y fertilización del oocito bovino. Oocito Inmaduro en vesícula germinal (A). Oocito maduro: Metafase II (B, C). Oocito fecundado (D). La tinción fue realizada con DAPI. Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.

### 3. REGULACIÓN DE LA MEIOSIS DEL OOCITO.

En los procesos de maduración *in vitro* (MIV), los complejos cúmulo oocito (CCO) aspirados de folículos con un diámetro entre 3 y 8 mm<sup>(35)</sup>, completan su maduración en 24 horas, mediante el uso de gonadotropinas, reflejada en la expansión o mucificación del cúmulo, la continuación de la meiosis y expulsión del primer cuerpo polar<sup>(10,39)</sup>.

Las hormonas gonadotrópicas FSH y LH se unen específicamente a receptores transmembranales acoplados a proteínas G, la cual está conformada por tres subunidades, alfa – beta – gama, y en su forma inactiva se encuentra asociada a Guanosina Difosfato (GDP). Al

unirse la hormona a su respectivo receptor, se genera un cambio conformacional que permite la interacción con varias proteínas G, induciendo la liberación del GDP y la unión por Guanosina Trifosfato (GTP). Esta última interacción estimula el desacoplamiento del complejo subunidad alfa – GTP que activará la adenil ciclasa, enzima que cataliza la producción de 3', 5'-adenosina monofosfato cíclico (AMPc) a partir del adenosina trifosfato (ATP) (ver figura 3). Los altos niveles de AMPc en las células de la granulosa inducen la mucificación caracterizada por el desacoplamiento de las uniones gap<sup>(1)</sup> y la secreción de ácido hialurónico<sup>(28,14)</sup>, disminuyendo los niveles de AMPc intraoocito, el cual es el principal factor involucrado en el freno meiótico, permitiendo la continuación de la meiosis y por tanto la maduración nuclear<sup>(36)</sup>.

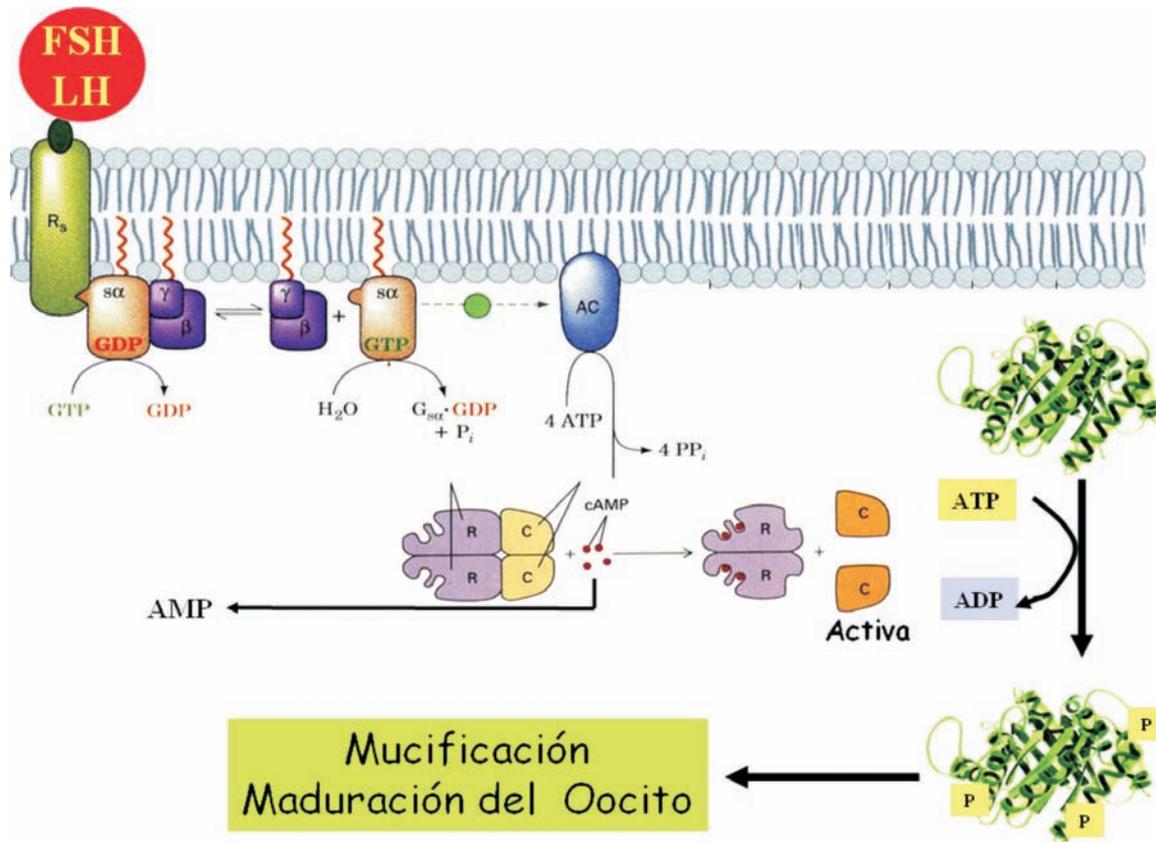
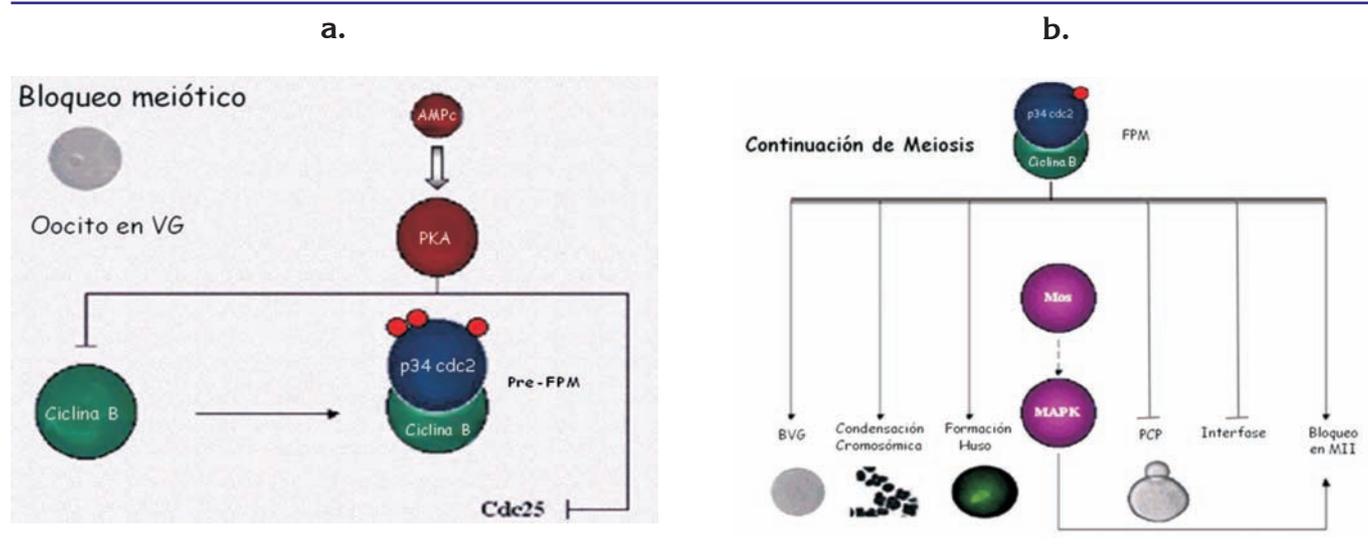


Figura 3. Vía del AMPc. Las hormonas FSH y LH se unen a receptores específicos localizados en las células de la granulosa del CCO, que están acoplados a proteínas G, las cuales a su vez activan la adenilato ciclasa, enzima que induce la producción de 3', 5'-adenosina monofosfato cíclico (AMPc) a partir de la adenosina trifosfato (ATP), activando la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) (Modificado de Voet and Voet, 1990)<sup>(38)</sup>.

En el bloqueo meiótico, el oocito es detenido en profase I (estadio de vesícula germinal, VG) debido al efecto inhibitorio de la PKA mediado por el AMPc. Esta inhibición es realizada en dos niveles: Evitando la activación del pre-Factor Promotor de la Maduración (pre-FPM) por la fosforilación de p34cdc2 y reprimiendo la síntesis de *novo* de ciclina B1 (Figura 4a). Después de la liberación del oocito del folículo ovárico, las concentraciones de AMPc intraoocito disminuyen y el pre-FPM se activa. El FPM activo, produce la continuación de la meiosis, caracterizada por la disolución de la

vesícula germinal, condensación cromosómica y formación de huso. La poliadenilación del RNAm de Mos es posterior a la activación del FPM, conduciendo a la expresión de Mos y la activación de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). La inactivación de FPM en metafase I (MI) es necesaria para la expulsión del primer cuerpo polar, mientras que su reactivación al inicio de la segunda división meiótica evita la entrada a interfase. El bloqueo del oocito en metafase II es mantenido hasta la fertilización por la acción de las MAPK y el FPM (Figura 4b)<sup>(20)</sup>.

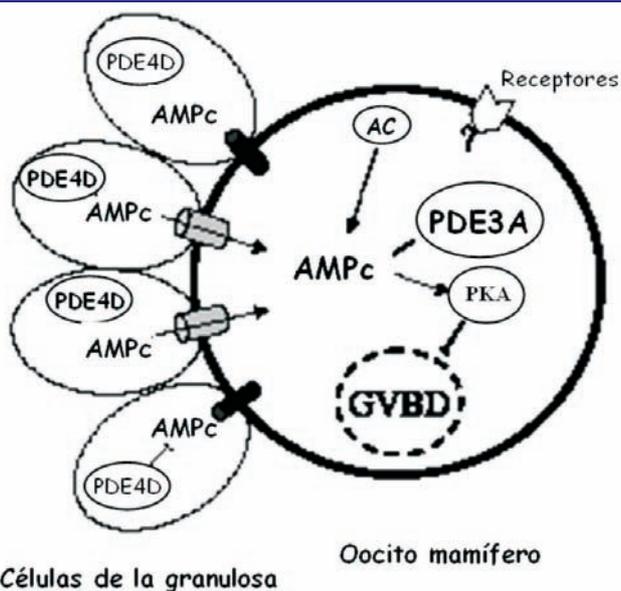


**Figura 4.** Regulación de la meiosis en oocitos de mamíferos. **a.** El bloqueo del oocito en profase I de la meiosis es mediada por la acción de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), la cual inactiva por fosforilación al factor promotor de la maduración (FPM), y disminuye la expresión de la ciclina B que es fundamental para la activación del FPM. **b.** Los bajos niveles de AMPc en el oocito permiten la activación del FPM por la proteína fosfatasa cdc25, desencadenando una serie de eventos que caracterizan la continuación de la meiosis (Tomado de Josefsberg and Dekel, 2002)<sup>(20)</sup>.

#### 4. REGULACIÓN DEL AMPc

Durante la continuación de la meiosis estimulada por el pico preovulatorio de FSH y LH, los niveles de AMPc intraoocito descienden debido a la disminución de la expresión de conexas formadoras de las uniones gap<sup>(1)</sup>, las cuales son necesarias para la difusión del AMPc desde las células de la granulosa al oocito, y por la hidrólisis del AMPc a su forma inactiva 5'-AMP<sup>(4,5)</sup>. Esta

hidrólisis es catalizada por fosfodiesterasas (PDE). En los mamíferos, estas enzimas son codificadas por mas de 20 genes, agrupados en 11 familias funcional y estructuralmente relacionadas<sup>(30-34)</sup>. La expresión de las PDE es específica de tejido<sup>(26)</sup>, y esta compartimentalizada en la unidad folicular de la siguiente manera: el oocito bovino expresa la PDE tipo 3, mientras que en las células de la granulosa se expresa la PDE tipo 4<sup>(2,36)</sup> (ver figura 5).



**Figura 5.** Compartimentalización de Fosfodiesterasas en la unidad folicular. Expresión específica de PDE tipo 4 en las células de la granulosa y PDE tipo 3 en el oocito (Tomado de Conti et al., 2002)<sup>(4)</sup>.

#### 4.1. Moduladores de la concentración intracelular del AMPc.

El aumento de la concentración intracelular de AMPc puede ser inducida por sustancias que regulan diversos mecanismos, entre ellos tenemos:

- Ligandos que se unen a receptores de membrana que activen la vía de la adenil ciclasa (b-adrenérgicos, Gonadotropinas) estimulando la síntesis de AMPc<sup>(32,34)</sup>.
- El bloqueo de la hidrólisis de AMPc por la inhibición de la enzima fosfodiesterasa-AMPc (Teofilina, IBMX, Cilostamida, Milrinona)<sup>(3,22)</sup>.
- La activación directa de la adenilato ciclasa (Forskolina)<sup>(34)</sup>.
- La modificación de la subunidad  $\alpha$  de la proteína G, estabilizando el complejo proteína Ga-GTP generando una activación persistente en la producción de AMPc (Toxina A del *Vibrio cholerae*)<sup>(38)</sup>.

#### 4.2. Inhibidores de fosfodiesterasas del AMPc

Las fosfodiesterasas (PDE) son las enzimas responsables de la hidrólisis del AMPc, y su bloqueo induce la acumulación de este segundo mensajero. Se ha utilizado diversos tipos de inhibidores de fosfodiesterasas específicos e inespecíficos. Entre los inhibidores inespecíficos están la pentoxifilina y los derivados de la xantina, como la teofilina (inhibidor reversible) y el isobutil metil xantina, IBMX (inhibidor irreversible)<sup>(3)</sup>. El diseño de inhibidores específicos de fosfodiesterasa como el rolipram, la cilostamida, la milrinona y el ORG 9935, permite el bloqueo de fosfodiesterasa específica de tejido, disminuyendo los efectos colaterales generados por inhibidores inespecíficos<sup>(7)</sup>.

En la unidad folicular, los inhibidores específicos de PDE tipo 3 (localizada en el oocito), como la cilostamida y la milrinona tienen un efecto bloqueador reversible de la maduración del oocito de mamíferos, sin afectar la viabilidad del oocito, ni el proceso ovulatorio<sup>(19,22,41)</sup>. Mientras que los inhibidores de PDE tipo 4, como el rolipram (ciclopentiloxi-metoxifenil-pirrolidona), no tienen efecto sobre el bloqueo de la maduración de oocitos desnudos, en complejos cúmulo oocitos cultivados en presencia de Rolipram maduran en un 80% aproximadamente tanto para murinos<sup>(36)</sup> como para bovinos<sup>(4,35)</sup>, provocando el aumento del AMPc en las células de la granulosa y consecuentemente induciendo la maduración nuclear.

### 5. PERSPECTIVAS

La alta heterogeneidad en las familias de PDE, su expresión específica de tejido y su regulación, hace de éstas enzimas blancos muy atractivos para el diseño de medicamentos y su evaluación en diferentes áreas de investigación.

## AGRADECIMIENTOS

---

Esta publicación se realizó con la colaboración de:

La Dirección de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín (DIME), proyectos 030802535, 030802736.

La FUNDACIÓN para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República proyecto 1156.

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Calder MD, Caveney AN, Smith LC and Watson AJ. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2003; 1 (14):1-12.
2. Conti M. Specificity of the Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Signal in Granulosa Cell Function. *Biology of Reproduction*. 2002; 67:1653-1661.
3. Conti M. Phosphodiesterases and Cyclic Nucleotide Signaling in Endocrine Cells. *Molecular Endocrinology*. 2000; 14(9):1317-1327.
4. Conti M, Nemoz G, Sette C and Vicini E. Recent Progress in Understand of Phosphodiesterases. *Endocrine Reviews*, 1995; 16(3): 370-389.
5. Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, Jin C and Tsafrii A. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002; 187:153-159.
6. Conti M, Richter W, Metas C, Livera G, Park Y and Jin C. Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *Journal Biology of Chemistry*. 2003; 8 (21): 5493-5496.
7. Cortijo M. Nuevos fármacos antiasmáticos: inhibición selectiva de isoenzimas de la fosfodiesterasa. *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina*. 2000, 66:1-23.
8. Ducibella T, Duffy P and Buetow J. Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biology of Reproduction*. 1994; 50:467-73.
9. Duranthon V and Renard JP. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology*. 2001; 55:1277-89.
10. Eckert J and Niemann H. In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocyte in protein-free media. *Theriogenology*. 1995; 43:1221-1225.
11. Eppig JJ. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reproduction Fertility and Development*. 1996; 8 (4):485-489.
12. Fair T, Hulshof SCJ, Hyttel P, Greve T and Boland M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*. 1997; 195:327-336.
13. Fair T, Lonergan L and Boland M. The acquisition of developmental competence in bovine oocytes. *Animal Science and Production, faculty of agriculture research report*. 2001; 30-32.
14. Fulop C, Salustri A and Hascall VC. Coding sequence of a hyaluronan synthase homologue expressed during expansion of

- the mouse cumulus-oocyte complex. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1997; 337:261-266.
15. Greenwald GS and Roy SK. Follicular development and its control. En: Knobil, E and Neill JD., ed. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press. 1994: 629-723.
  16. Houslay MD and Adams DR. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signaling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochemical Journal*. 2003; 370:1-18.
  17. Hyttel P, Callesen H and Greve T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1986a; 76:645-56.
  18. Hyttel P, Xu KP, Smith S and Greve T. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1986b; 78:615-25.
  19. Jensen JT, Schwinof KM, Zelinski-Wooten MB, Conti M, De Paolo LV and Stouffer RL. Phosphodiesterase 3 inhibitors selectively block the spontaneous resumption of meiosis by macaque oocyte *in vitro*. *Human Reproduction*. 2002; 17(8):2079-2084.
  20. Josefsberg LB and Dekel N. Translational and post-translational modifications in meiosis of the mammalian oocyte. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002; 187:161-171.
  21. Kubelka M, Motlik J, Fulka JJ, Prochazka R, Rimkevichova Z and Fulka J. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. *Gamete Research*. 1988; 19:423-431.
  22. Mayes, M.A. and Sirad, M.A. Effect of type III and type IV phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest. *Biology of Reproduction*. 2002; 66 (1):180-184.
  23. McGee EA and Hsueh AJW. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Review*. 2000; 21 (2):200-214.
  24. Montgomery GW, Galloway SM, Davis GH and McNatty KP. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction*. 2001; 121:843-852.
  25. Muller T, Engels P and Fozard Jr. Subtypes of the type 4 cAMP phosphodiesterases: structure, regulation and selective inhibition. *Tips*, 1996; 17:294-298.
  26. Richter W, Jin C and Conti M. Splice variants of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D are differentially expressed and regulated in rat tissue. *Biochemistry Journal*. 2005; 388:803-811.
  27. Salomone DF, Damiani P, Fissore RA, Robl JM and Duby RT. Biochemical and Developmental Evidence That Ooplasmic Maturation of Prepubertal Bovine Oocytes Is Compromised. *Biology of Reproduction*. 2001; 64:1761-1768.
  28. Salustri A, Yanagishita M, Underhill CB, Laurent TC and Hascall VC. Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Developmental Biology*. 1992; 151:541-551.
  29. Shamsuddin M, Larsson B and Rodriguez-Martinez H. Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture conditions. *Animal Reproduction Science*. 1993; 31:49-60.