

Maduración oocitaria en mamíferos y dinámica de las proteínas motoras

Autores: Dr. Alejandro Español, Lic. Florencia Nodar, Lic. Mariano Lavolpe y Dra. Vanesa Rawe
Laboratorio de Embriología y Laboratorio de Biología, Investigación y Estudios Especiales Prof.
Dr. Aníbal A. Acosta. Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción, CEGyR, Buenos Aires,
Argentina

Resumen

Aunque las tasas de fecundación obtenidas a partir de oocitos madurados in vivo e in vitro son similares después del ICSI, la maduración in vitro de oocitos humanos se ha asociado a una disminución de la capacidad de desarrollo embrionario y en consecuencia a menores tasas de embarazo. Algunos trabajos realizados previamente han reportado una inadecuada segregación cromosómica en oocitos madurados in vitro y consecuentemente, una elevada tasa de aneuploidía en los embriones. En este sentido, el mantenimiento de la estructura de los microtúbulos así como el papel de las proteínas motoras asociadas a microtúbulos (HSET, Eg5 y NuMA) son esenciales para la correcta formación del huso meiótico. En el presente trabajo, estudiamos la presencia y distribución de HSET, Eg5 y NuMA durante la maduración in vitro de oocitos humanos y bovinos.

Se estudiaron un total de 32 oocitos humanos (16 maduros y 16 inmaduros) y 184 oocitos bovinos (98 inmaduros y 86 maduros). La maduración in vitro de los oocitos humanos fue realizada en H-HTF suplementado con 15% de suero sintético incubados en 5% de CO₂ y 100% de humedad a 37°C por 24 horas. La maduración in vitro de los oocitos bovinos fue realizada en medio M199, suplementado con 5% de suero fetal de ternero y 2 µg/ml FSH, incubados en 5% CO₂ y 100% humedad a 39°C por 24 horas. Para realizar

las técnicas de inmunocitoquímica, los oocitos humanos y bovinos fueron fijados con un buffer estabilizador de microtúbulos basado en glicerol descrito previamente. A fin de estudiar la asociación de las proteínas motoras a los microtúbulos, se utilizaron anticuerpos específicos contra las proteínas motoras HSET, Eg5 y contra la proteína del polo del huso NuMA. La incubación con los anticuerpos primarios y secundarios fue realizada durante toda la noche a temperatura ambiente o una hora a 37°C respectivamente. El ADN fue marcado utilizando TOTO-3 y las muestras fueron observadas mediante un microscopio confocal. También se estudió la distribución de los microtúbulos de la placa metafásica y de los cromosomas luego de la utilización del Monastrol, inhibidor específico de la actividad de la proteína motora Eg5.

Nuestras observaciones han demostrado por primera vez la presencia de HSET, Eg5 y NuMA en oocitos humanos y bovinos. En aquellos oocitos MII madurados in vivo se observó una distribución normal de estas proteínas en el huso meiótico. Contrariamente, en la mayoría de los oocitos humanos madurados in vitro se observó la ausencia o localización ectópica de NuMA, Eg5 y HSET. La inhibición de la actividad de la proteína motora Eg5 en bovinos, indujo la formación de husos meióticos aberrantes así como una anómala distribución de los cromosomas durante la maduración oocitaria.

Sobre la base de estos resultados podemos concluir que durante la maduración oocitaria en mamíferos, el papel de HSET, Eg5 y NuMA (cuya presencia observamos en oocitos de mamífero madurados in vivo e in vitro) parece ser necesaria para el control de la dinámica microtubular. El ensamblado de un huso bipolar en oocitos humanos y bovinos depende de los microtúbulos y de las proteínas motoras. La inhibición de la actividad de la proteína motora Eg5 durante la maduración oocitaria afecta severamente la distribución de los microtúbulos y cromosomas. En un futuro próximo deben realizarse más investigaciones sobre estas proteínas para determinar su contribución específica durante la maduración oocitaria y sobre el desarrollo embrionario consecuente.

Introducción

La mayoría de los oocitos de mamíferos están detenidos en metafase de la segunda división meiótica (metafase II, MII) antes de ser fecundados. La activación de un oocito quiescente por parte de un espermatozoide capaz de fecundar, resulta en la culminación de la segunda meiosis y la expulsión de las cromátides hermanas de cada uno de los cromosomas maternos en forma de segundo cuerpo polar. Como consecuencia, una adecuada organización estructural e integridad cromosómica de la gameta femenina, son esenciales para una exitosa fecundación. Durante la maduración del oocito hasta alcanzar el estadio de MII, el mismo adquiere la competencia citoplásmica y nuclear necesaria para ser fecundado y sostener el futuro desarrollo embrionario temprano. Este proceso es muy dinámico e incluye la formación de una adecuada arquitectura oocitaria con la coordinación de diversos mensajes intracelulares; fosforilación de proteínas y otras importantes modificaciones pos-transduccionales.

Durante la estimulación de la ovulación propia de los tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad no siempre se obtienen mayoritariamente

oocitos maduros (MII) dentro del ovario (categoría a la que denominamos 'maduración in vivo'). En ciertas ocasiones, la obtención de oocitos en estadios inmaduros (profase I o metafase I) involucra la maduración de los mismos en el ámbito del laboratorio (categoría a la que denominamos 'maduración in vitro') con el fin de obtener las condiciones idóneas para la fecundación.

Aunque los valores de fecundación de oocitos humanos madurados in vitro e in vivo son similares después de ICSI, los oocitos madurados in vitro se asocian a un menor desarrollo y tasa de nacimientos. Dado que la única diferencia entre los oocitos madurados in vivo e in vitro son las condiciones en las que se realiza la maduración de los mismos, es importante estudiar cómo el medio ambiente (medio de cultivo) afecta los distintos eventos intracelulares involucrados en este proceso.

Diversas anomalías en la estructura y funcionalidad oocitaria resultan en la incapacidad para completar exitosamente la maduración. Estos defectos en la arquitectura celular se han vuelto evidentes sólo en tiempos recientes debido a que el proceso de la maduración oocitaria en mamíferos puede estudiarse con más detalle en el laboratorio. La aplicación de microscopía de fluorescencia en conjunto con inmunocitoquímica y la utilización de un modelo animal como el bovino con eficientes tasas de maduración oocitaria in vitro y con disponibilidad de gametas en gran número, han permitido un avance significativo en el entendimiento de los eventos involucrados.

Entre las anomalías más importantes que pueden producirse durante la maduración oocitaria se encuentran los defectos en la arquitectura del citoesqueleto (Hyttel, 1989; Kim, 1996a y b), de proteínas motoras asociadas a los microtúbulos (HSET, Eg5, complejo dineína-dinactina) y de proteínas estructurales del huso (NuMA, Nuclear Mitotic apparatus Antigen; Merdes, 1996).

Los microtúbulos son complejos macromoleculares polarizados que en sus

extremos tienen diferentes propiedades de ensamblaje y desensamblaje (Mitchison, 1984; Desai, 1997). El polo negativo está anclado cerca o en el centrosoma y el polo positivo es distal al mismo. Esta polaridad está en parte determinada por las proteínas motoras microtubulares que tienen direccionalidad y consisten en dos grandes super familias; dineínas y kinesinas, que transportan vesículas, organelas, cromosomas y elementos del citoesqueleto con la guía de los microtúbulos (Sharp, 2000) (Esquema 1).

La dineína y su complejo co-activador dinactina, funcionan en los polos del huso, cinetocoros y corteza celular (Karki y Holzbaur, 1999) Se puede ver la estructura de la molécula en el Esquema 2.

Dineína, dinactina y NuMA también forman un complejo tri-molecular en los polos negativos del huso para provocar fuerzas centrípetas de arrastre (Compton, 1998). Las kinesinas HSET y Eg5 son motores mitóticos en los microtúbulos que trabajan de manera opuesta; HSET trafica cargas hacia el centrosoma (polo negativo) y Eg5 hacia el polo positivo (ya que se encuentra apareada con los cinetocoros de las cromátides hermanas).

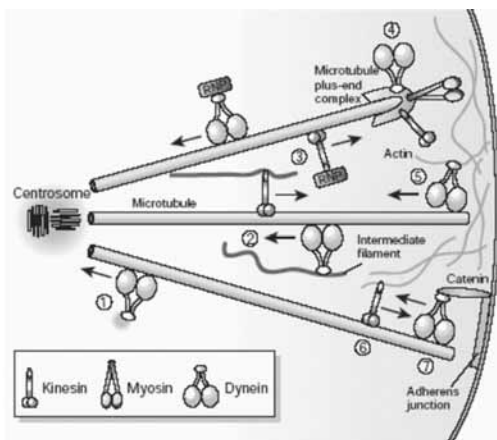
La adecuada segregación de los cromosomas durante la meiosis y mitosis requiere de la presencia de husos bipolares constituidos por centrosomas, proteínas motoras asociadas a microtúbulos, cromosomas y las propiedades dinámicas de los microtúbulos

(Compton, 1998, 2000; Heald, 2000; Whittman, 2001; Surrey, 2001).

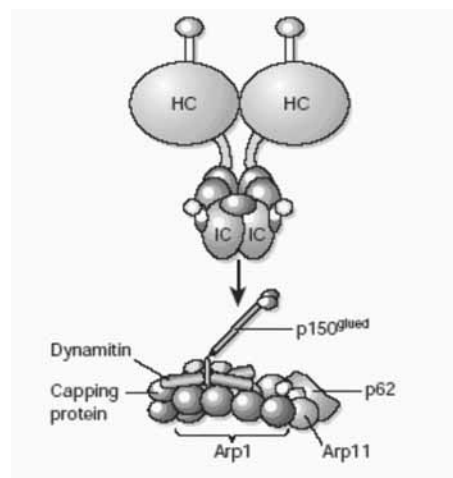
Ensayos previos realizados en humanos y monos han demostrado que las proteínas motoras HSET y Eg5 así como la proteína estructural del huso NuMA, son necesarias para el armado correcto del huso así como para la correcta segregación de los cromosomas durante la fecundación (Simerly et al., 2006, trabajo enviado a PNAS).

Aunque se sabe que la tasa de fecundación de los oocitos madurados in vitro y la de aquellos madurados in vivo es similar en ICSI, los valores de la tasa de embarazos y nacidos vivos es significativamente menor en el caso de la maduración in vitro. En este sentido, Long (1993, 1994) observó que en los oocitos bovinos, la maduración in vitro producía un ensamblado anormal del citoesqueleto e incorrecto posicionamiento de la cromatina en la metafase; ensayos análogos realizados en porcinos tuvieron resultados similares y mostraron anomalías en el desarrollo embrionario temprano (Kim, 1996a, 1996b).

Las alteraciones en la expresión o funcionalidad de las proteínas motoras asociadas a microtúbulos o de las estructuras del huso dan como resultados la formación de husos aberrantes. En este sentido Mailhes y col. (2004), trabajando con oocitos murinos, observaron que la inhibición



Esquema 1. Papel de las moléculas motoras asociadas al citoesqueleto.



Esquema 2. Representación esquemática del complejo dineína-dinactina.

de la actividad de la proteína Eg5 conlleva la formación de husos meióticos con geometría anormal, cromosomas mal orientados y aneuploidía. Merdes y col. (1998) observaron en oocitos de *Xenopus* que la depleción de NuMA da lugar a husos elongados mientras que Compton y Cleveland (1993) trabajando con células tsBN2 observaron que esta proteína es necesaria para que ocurra apropiadamente la mitosis. En 2004 Chacravarty y col., trabajando con células HeLa, observaron que la inhibición de la actividad de HSET produce la presencia de husos aberrantes, mientras que Wang y col. (2004) utilizando oocitos murinos observaron que el bloqueo de las dineínas implica alteraciones en la maduración de los mismos.

Es posible que una expresión o distribución alterada de estas proteínas esté relacionada con la menor tasa de embarazos y nacidos vivos observada en oocitos madurados *in vitro* y esa fue nuestra premisa de trabajo.

Sobre la base de estos antecedentes nos propusimos estudiar cuál es la distribución normal de las proteínas motoras asociadas a microtúbulos y al huso meiótico durante el reinicio de la meiosis en oocitos humanos, desde el estadio de profase de la primera meiosis (vesícula germinal, VG) hasta MII. Estudiamos también a las proteínas del huso (NuMA) y proteínas motoras asociadas a los microtúbulos (Eg5 y HSET) que son retenidas o perdidas en el oocito maduro. Dimos especial énfasis al estudio comparativo de la distribución de estas proteínas en los oocitos madurados *in vitro* respecto de aquellos madurados *in vivo*.

Utilizando oocitos de bovinos, se observó el efecto del bloqueo de Eg5 durante la maduración oocitaria *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

Procedencia del material madurado *in vivo*

Los oocitos humanos fueron obtenidos como material sobrante de punciones

foliculares de pacientes sometidos a técnicas de fecundación de alta complejidad, aportados por el Laboratorio de Embriología del CEGyR. Los mismos fueron procesados para su estudio por inmunocitoquímica (ver luego).

Los oocitos bovinos fueron obtenidos por punción folicular de ovarios provistos por un matadero local, hasta ser procesados para su estudio por inmunocitoquímica (ver luego).

Procedencia del material madurado *in vitro*

Los oocitos humanos (profase I) fueron obtenidos como material sobrante de punciones foliculares de pacientes sometidos a técnicas de fecundación de alta complejidad, aportados por el Laboratorio de Embriología del CEGyR bajo consentimiento informado de los pacientes. Los mismos fueron incubados en fluido tubárico humano sintético (HTF) suplementado con 15% de suero sintético, en una atmósfera con 5% de CO₂, 100% de humedad y 37°C por 20-24hs horas. A continuación fueron procesados para su estudio por inmunocitoquímica, según se describe más adelante, previa visualización del estado de madurez nuclear según la expulsión de cuerpo polar.

Los oocitos bovinos fueron obtenidos por punción folicular de ovarios provistos por el matadero y madurados por 20-24hs horas en presencia de células del cúmulus en medio M199 con 5% de suero fetal bovino y FSH en una atmósfera con 5% de CO₂, 100% de humedad y 39°C. A continuación fueron procesados para su estudio por inmunocitoquímica.

Inmunocitoquímica y anticuerpos

• Oocitos bovinos y humanos

Los oocitos fueron sometidos a cortas incubaciones con 1 mg/ml de hialuronidasa y 1,5 mg/ml de pronasa (bovinos) o ácido tirodes (humanos) para remover las células del cúmulus y la zona pelúcida respectivamente. Los oocitos libres de la zona pelúcida fueron ubicados en cubre objetos con poli-lisina en medio TALP

libre de Ca²⁺ y fijados según la metodología descrita por Simerly y Schatten (1993). Brevemente, los oocitos ubicados en cubreobjetos con poli-lisina fueron extraídos con un buffer de extracción de tubulinas no polimerizadas denominado buffer M (Berchadsky, 1978) que contiene 25% de glicerol, 5 mM de KCl, 0,1 mM de EDTA, 0,1 mM de EGTA, 0,5 mM de MgCl₂, 1 mM de 2-beta-mercaptoetanol y 50 mM de imidazol hidrociorado, pH: 6.8 con 1% de Triton X-100 y 10% de metanol por 5 minutos. Luego fueron incubados en 100% de metanol frío por 10 minutos y se dejaron incubando en PBS con 0,1% de Triton X-100 hasta ser procesados por inmunocitoquímica.

Los anticuerpos primarios fueron aplicados al material por 12 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente (TA) y luego lavados 4 veces por 10 minutos cada vez, previo al agregado de anticuerpos secundarios. Los anticuerpos secundarios utilizados (AlexaFluor 488 y 568) fueron incubados por 1 hora a 37°C y el ADN fue visualizado luego de la incubación con 10 ñg/ml de TOTO-3 (Molecular Probes) por 30 minutos a TA.

Los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos de vidrio con medio Vectashield para retardar el fotoenvejecimiento. Los oocitos fueron visualizados con microscopio confocal Olympus (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires) con rayos láser de longitud de onda 488, 543 y 633nm.

En todos los casos, los experimentos fueron realizados utilizando suero preinmune hecho en ratón a una concentración de 1:20 como controles negativos. Como controles adicionales se realizaron preincubaciones de los anticuerpos primarios por una hora con sus correspondientes antígenos o se incubaron los anticuerpos secundarios en ausencia de los primarios.

Los estudios de inmunocitoquímica se realizaron por inmunofluorescencia con el uso de los siguientes anticuerpos primarios e intercalantes de ADN que fueron utilizados en diferentes diluciones determinadas experimentalmente.

NuMA: anticuerpo policlonal de conejo (Gaglio, 1995). Dilución 1:200.

Eg5: anticuerpo policlonal de conejo contra el dominio central de la proteína (Whitehead, 1998). Dilución 1:200.

HSET: anticuerpo obtenido inmunizando conejos con la proteína recombinante expresada en bacteria. Dilución 1:200.

Tubulinas: anticuerpo anti α -tubulinas clon E7 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, Iowa). Dilución 1:5.

TOTO-3: Intercalante de ADN (Molecular Probes). Concentración 10 ñg/ml.

Monastrol: Inhibidor específico de la actividad de la proteína Eg5. Biomol Z-3089d. Concentración 45 ñg/ml.

Inhibición funcional de la proteína motora Eg5 en oocitos bovinos

La inhibición de la funcionalidad de la proteína motora Eg5 se logró con el agregado de Monastrol (45 ñg/ml). Brevemente, los oocitos bovinos fueron punzados y colocados en el medio de maduración correspondiente en presencia del inhibidor de la actividad de Eg5 por diferentes tiempos (0-20 hs). Luego de esta incubación, los oocitos se lavaron y colocaron en medio de maduración hasta completar las 20hs de maduración in vitro.

Como grupo control se utilizaron oocitos bovinos madurados en medio de maduración suplementado con 1% de DMSO (disolvente del Monastrol) por el tiempo correspondiente luego del cual fueron lavados e incubados en medio de maduración convencional hasta completar las 20 hs de maduración in vitro.

Análisis de los resultados

Siendo este un estudio de localización y dinámica de varios componentes de oocitos humanos y bovinos, los métodos de estudio fueron microscópicos mediante inmunofluorescencia y observación por microscopía confocal.

Se analizó la localización de las proteínas motoras asociadas a microtúbulos

(Eg5 y HSET) y NuMA así como su relación con los patrones de microtúbulos de los oocitos en profase I y metafase II.

El análisis estadístico de las muestras se realizó por el método Chi cuadrado mediante la utilización del programa Stata.

RESULTADOS

Durante la maduración oocitaria una adecuada distribución y función de las proteínas motoras y estructurales es importante para una correcta función del huso meiótico para asegurar la normal segregación cromosómica. Sobre esta base, se estudiaron oocitos madurados *in vivo* e *in vitro* mediante técnicas de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos específicos contra las proteínas de interés.

Al estudiar la distribución de la proteína estructural NuMA observamos que en todos los oocitos humanos madurados *in vivo*, la misma se expresa homogéneamente en todo el núcleo durante el estadio de vesícula germinal (Figura 1-A) mientras que en el estadio de metafase II se posicionan sólo en los polos del huso meiótico (Figura 1-B). En el 77% (14/18) de los oocitos humanos en metafase II que fueron madurados *in vitro*, se observa una expresión ectópica de la proteína NuMA (Figura 1-C flechas, detalle en 1-C'). Una ectópica distribución de NuMA podría ocasionar de esta manera una disposición anómala

del huso meiótico que daría como consecuencia una incorrecta segregación del material genético oocitario.

Cuando exploramos la distribución de las proteínas motoras Eg5 y HSET durante la maduración oocitaria, observamos que en todos los oocitos humanos madurados *in vivo* ambas proteínas se expresan homogéneamente en todo el citoplasma durante el estadio de vesícula germinal co-localizando con las tubulinas del citoesqueleto (Figura 2-A y 3-A). Durante el estadio de MII en el 100% de los oocitos madurados *in vivo*, se observa que la proteína Eg5 se expresa en forma puntillada sobre la zona ecuatorial del huso meiótico, en una zona próxima a los cromosomas (Figura 2-B, flechas), mientras que la proteína HSET se expresa ocupando el espacio entre los cromosomas y los polos del huso meiótico (Figura 3-B).

Al observar la distribución de estas proteínas motoras en oocitos humanos madurados *in vitro*, encontramos que Eg5 presenta una distribución ectópica durante el estadio de metafase II en el 100% de los casos (Figuras 2-C), mientras que HSET hace lo propio en el mismo porcentaje de los casos (Figura 3-C punta de flecha). Esta ectópica expresión de las proteínas motoras se correlaciona con una incorrecta formación del huso meiótico y una segregación anómala

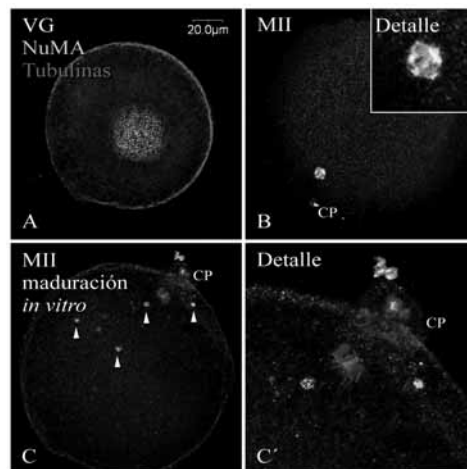


Figura 1: Microscopía confocal de oocitos madurados *in vivo* e *in vitro*. Localización de la proteína NuMA (verde), tubulinas (rojo) y ADN (azul) en los estadios de Vesícula Germinal (6/6 oocitos) (A) y Metafase II (11/11 oocitos) (B) durante la maduración de los oocitos *in vivo*. Expresión ectópica de NuMA en oocitos madurados *in vitro* durante el estadio de Metafase II (14/18 oocitos) (C) y detalle del mismo (D). CP: cuerpo polar; VG: vesícula germinal; MII: metafase II.

del material genético oocitario (Figuras 2-C, 2-C' flechas, 3-C flechas y 3-C').

Dada la evidencia que indica una marcada similitud entre la fertilización en humanos y bovinos así como una abundancia relativa de oocitos bovinos provenientes de mataderos, se utilizaron oocitos bovinos para estudiar el efecto del bloqueo de la actividad de la proteína motora Eg5 mediante la utilización del inhibidor específico monastrol (Mon) sobre la maduración oocitaria. En la Figura 4 observamos que durante la maduración *in vitro*, la presencia de Mon por 9 hs induce un incremento del número de oocitos bovinos en el estadio de anafase I

(control: 8%; Mon 9 hs: 18,3%; $p=0,1$). Este efecto es dependiente del tiempo de incubación con Mon, dado que al incubar los oocitos durante 16 hs, se incrementa el número de anafases I observadas (Mon 16 hs: 53,6%; $p<0,001$). En el tiempo de incubación con Mon por 9 hs se observa un fuerte incremento del número de husos meióticos aberrantes respecto del control (control: 2,5%; Mon: 22%; $p<0,01$); que se correlacionan con un incremento de la segregación anómala de los cromosomas oocitarios.

En tiempos de incubación con Mon menores a 9 hs no se observan diferencias entre el grupo control y aquel que fue

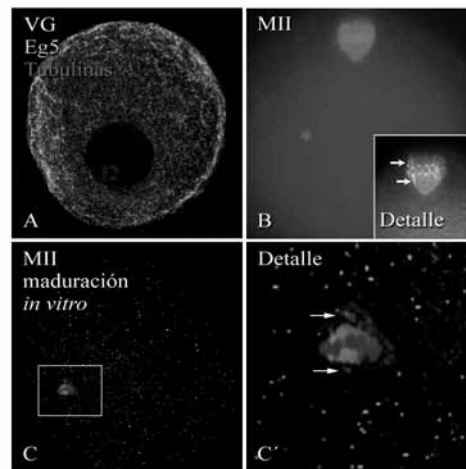


Figura 2: Microscopía confocal de oocitos madurados *in vivo* e *in vitro*. Localización de la proteína Eg5 (verde), tubulinas (rojo) y ADN (azul) en los estadios de Vesícula Germinal (5/5 oocitos) (A) y Metafase II (17/17 oocitos) (B) durante la maduración de los oocitos *in vivo*. Expresión anómala de las mismas proteínas en oocitos madurados *in vitro* durante el estadio de Metafase II (5/5 oocitos) (C) y detalle del mismo (D). VG: vesícula germinal; MII: metafase II.

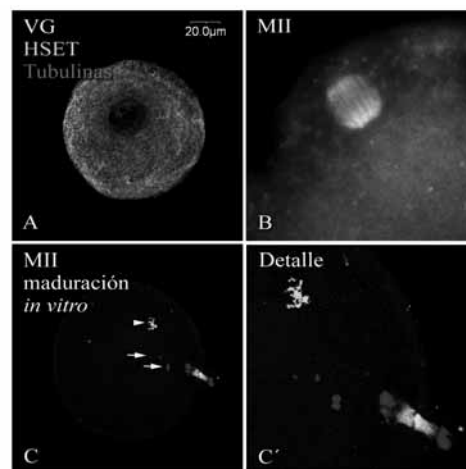


Figura 3: Microscopía confocal de oocitos madurados *in vivo* e *in vitro*. Localización de la proteína HSET (verde), tubulinas (rojo) y ADN (azul) en los estadios de Vesícula Germinal (5/5 oocitos) (A) y Metafase II (17/17 oocitos) (B) durante la maduración de los oocitos *in vivo*. Expresión anómala de las mismas proteínas en oocitos madurados *in vitro* durante el estadio de Anafase I-Metafase II (7/7 oocitos) (C) y detalle del mismo (D). VG: vesícula germinal; MII: metafase II.

incubado en presencia de Mon. Para tiempos de incubación mayores a 16 hs se observa degradación celular (Figura 4).

En un grupo de oocitos bovinos (n= 55), también estudiamos el efecto del bloqueo de la actividad de la proteína motora Eg5 sobre la maduración oocitaria in vitro mediante el estudio de la distribución diferencial del aparato de Golgi, un parámetro que puede utilizarse para determinar el estadio madurativo de los oocitos (Payne y Schatten 2003) y que según Whitehead y col. (1998) es regulado en su distribución por efecto de la proteína motora Eg5 durante la mitosis. Sin embargo, en nuestro estu-

dio observamos que el 100% de los oocitos bovinos incubados en Mon por 9 hs no ven afectada la distribución del aparato de Golgi respecto del control (Figuras 5-A y 5-B) aunque se observa un incremento el número de oocitos en el estadio de anafase I (control: 7,9%; Mon 9hs: 20,0%; p=0.1) (Figura 5-B), así como la presencia de husos meióticos aberrantes (control: 2,7%; Mon 9 hs: 25,4%; p<0.01) (Figuras 5-C flecha y 5-C').

DISCUSIÓN

Durante la maduración in vitro de los oocitos humanos se observó un incremento de las anomalías cromosómicas y

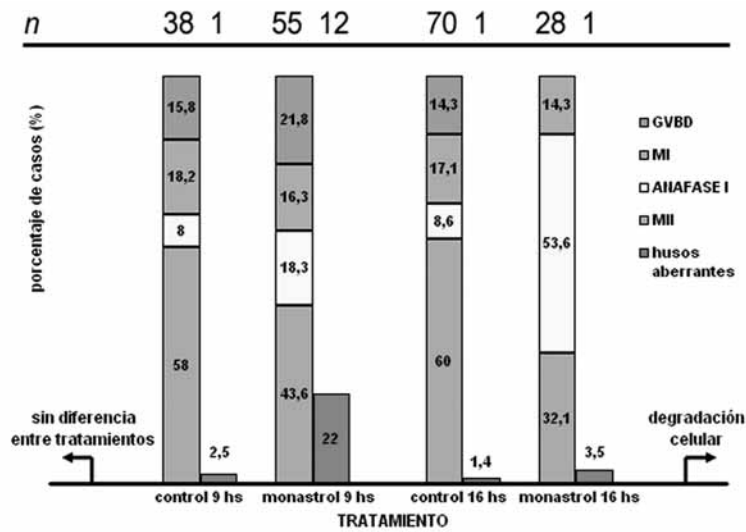


Figura 4: Efecto del monastrol sobre la maduración oocitaria. Porcentaje de cada estadio oocitario en presencia de monastrol, incubados in vitro durante 9 o 16 hs. porcentaje de husos meióticos aberrantes.

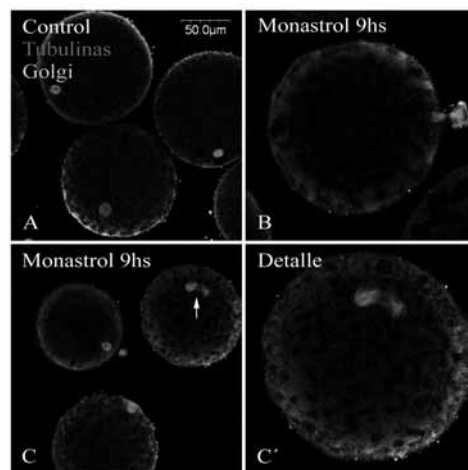


Figura 5: Efecto del monastrol sobre la distribución de las tubulinas y del Aparato de Golgi. Localización normal del Aparato de Golgi (verde) en la periferia celular y las tubulinas (rojo) en el estadio de Metafase II (37/38 oocitos) (A). La incubación con Mon indujo un incremento del número de Anafase I (11/55 oocitos) (B) y del número de husos aberrantes (12/55 oocitos) (C, flecha); detalle del mismo (C').

del huso meiótico respecto de aquellos oocitos madurados *in vivo*, situación que coincide con lo reportado en la literatura (Delimitreva y col., 2006). En esta situación pueden estar involucradas las proteínas motoras y estructurales. La importancia de las proteínas motoras y estructurales se basa principalmente en su papel decisivo durante la formación de un huso meiótico funcional que permita una correcta segregación cromosómica. En este sentido, diversos autores han descrito que la inhibición de la actividad de estas proteínas es perjudicial para la maduración oocitaria y desarrollo embrionario (Compton and Cleveland, 1993; Zeng, 2000; Chakravarty y col, 2004).

Al estudiar la expresión de la proteína estructural NuMA, pudimos determinar por primera vez su presencia en los oocitos humanos madurados *in vivo* en el estadio de Vesícula Germinal (VG) preferencialmente situada en el núcleo. En el mismo estadio observamos que el citoesqueleto de tubulinas se dispone en forma periférica (cortical) y comenzando a polimerizarse en el resto del citoplasma. Resultados análogos fueron obtenidos por Tang y col. (2004) así como por Lee y col. (2000) quienes trabajando con oocitos murinos y porcinos indicaron la presencia de NuMA en el centrosoma y núcleo de los mismos en el estadio de VG, así como la importancia de esta proteína en el ensamblado correcto del huso meiótico. También observamos que al madurar *in vivo* los oocitos a MII, existe una redistribución de NuMA hacia los polos del huso meiótico a fin de poder ejercer la función de proteína estructural que le es propia. Esto también fue observado por Tang y col. (2004) así como por Lee y col. (2000) quienes, al trabajar con los oocitos murinos y porcinos, observaron la difusión de la localización nuclear de NuMA durante el estadio ruptura de la vesícula germinal (GVBD) y la re-localización de esta proteína asociada a los cromosomas, para luego, en el estadio de MII, ubicarse en forma polar sobre el huso meiótico. Esto último también fue observado por Simerly y col. (2006) trabajando con oocitos de primates.

Cuando la maduración oocitaria se realiza en condiciones *in vitro*, observamos que los oocitos en el estadio MII presentan un marcado incremento de expresión ectópica de la proteína estructural NuMA. En el 77% de los casos esta proteína se encuentra en forma de agregados citoplasmáticos que dan como consecuencia una incorrecta formación del huso meiótico, que se observa como un agrupamiento de microtúbulos posicionados con una tendencia a la monopolaridad en vez de ser bipolares. Esta anormal formación del huso meiótico da lugar a una anómala distribución del material genético oocitario con la consecuente posibilidad del incremento de las aneuploidías embrionarias. Estos resultados se conllevan con los obtenidos por diversos autores que han observado que durante la maduración *in vitro* de los oocitos se producen defectos en la arquitectura del citoesqueleto (Hotel, 1989; Kim, 1996a y 1996b), y de proteínas estructurales como NuMA, cuya expresión ectópica se corresponde con la formación de husos meióticos aberrantes (Compton and Cleveland, 1993; Zeng, 2000; Chakravarty y col, 2004).

Al estudiar la expresión de la proteína motora Eg5, la misma fue detectada en oocitos humanos madurados *in vivo* en el estadio de VG a nivel citoplasmático en forma de un tramado correspondiéndose, como era de esperar, con el patrón de tubulinas ya que es una proteína motora asociada a microtúbulos. Durante la maduración *in vivo* de estos oocitos hasta el estadio de MII se observa un reordenamiento de dicha proteína motora, que se ubica en forma puntillada sobre el huso meiótico en su parte ecuatorial en una zona cercana a los cromosomas. Resultados análogos fueron obtenidos por Simerly y col. (2006) quienes observaron, trabajando con oocitos humanos y de mono, la presencia de la proteína Eg5 asociada a las tubulinas del huso meiótico en el estadio MII (ver Figura 2 y 3), dispuesta en una forma puntillada así como también durante la partenogénesis y en cigotos fertilizados.

Al realizar ensayos de maduración *in vitro* de los oocitos observamos una distribución ectópica de la proteína en cuestión que se corresponde con la formación aberrante del huso meiótico dando como resultado una anómala segregación cromosómica. En concordancia con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, diversos autores han realizado ensayos demostrando que la distribución ectópica de la proteína Eg5 se refleja en la formación del huso meiótico. En este sentido, Mitchinson y col. (2005) así como Miyatomo y col. (2004) trabajando en oocitos de *Xenopus* observaron que la proteína Eg5 se encuentra sobre el huso meiótico durante el estadio de MII. Estos autores demostraron que el bloqueo de la actividad de esta proteína motora induce la presencia de husos aberrantes, los cuales redundan en un incremento de las aneuploidías cromosómicas dadas por una mala segregación cromosómica. Resultados equivalentes fueron obtenidos por Simerly y col. (2006) quienes trabajando con oocitos de primates observaron que el bloqueo de la actividad de la proteína HSET mediante la utilización de anticuerpos específicos se refleja en la presencia de husos meióticos aberrantes y segregación cromosómica anómala. Esto también fue observado por Mailhes y col. (2004) trabajando con oocitos murinos así como Whitehead y Ratter (1998) trabajando con células somáticas HeLa, lo cual indicaría que la actividad de esta proteína esta conservada entre las distintas especies.

En el presente estudio, la proteína motora HSET fue detectada en oocitos humanos madurados *in vivo* en el estadio de VG a nivel citoplasmático en forma de un tramado similar al observado para Eg5. Durante la maduración *in vivo* de estos oocitos hasta el estadio de MII se observa un reordenamiento de dicha proteína motora, que se ubica sobre los microtúbulos del huso meiótico entre los polos del mismo. Estos resultados son concordantes con los obtenidos en ensayos análogos por Simerly y col.

(2006) quienes trabajando con oocitos humanos y de mono, observaron que la proteína HSET se detecta en los microtúbulos del huso meiótico, durante la partenogénesis y en cigotos fertilizados.

Al realizar ensayos de maduración *in vitro* de los oocitos observamos una distribución ectópica de la proteína en cuestión que se corresponde con la formación aberrante del huso meiótico dando como resultado una incorrecta segregación cromosómica, en concordancia con los resultados obtenidos por Simerly y col. (2006).

Para completar el estudio, exploramos el efecto del bloqueante selectivo de la actividad de la proteína motora Eg5, el monastrol, durante diversos tiempos de incubación en oocitos de bovinos por tratarse de un sistema comparable al del ser humano en términos de maduración oocitaria y por contar con un mayor número en las muestras. Con tiempos de incubación menores a 9 hs y mayores a 16 hs no se observaron diferencias entre los tratamientos control y monastrol. Probablemente esto se deba que a tiempos menores a 9 hs de incubación no se sobrepasa el umbral necesario para gatillar la respuesta mediada por el monastrol. A tiempos mayores a 16hs, la presencia del vehículo (DMSO) produce degradación celular. Durante los tiempos de incubación entre 9 y 16 hs se observa un incremento del porcentaje de oocitos en el estadio anafase I en contraposición de una disminución en el porcentaje de oocitos en MII respecto del grupo control (ver Figura 4). También se observa que aquellos oocitos en el estadio MII, presentan un mayor porcentaje de husos meióticos aberrantes en concordancia con resultados observados por diversos autores al bloquear la actividad de la proteína motora Eg5 por medio de anticuerpos (Simerly, 2006) o bloqueantes selectivos (Mailhes, 2004). El efecto del Monastrol sobre la inhibición de Eg5 y la consecuente aparición de husos meióticos aberrantes estaría simulando nuestros hallazgos anteriores en los que se observaron defectos en la distribución de Eg5 y anomalías en los husos meióticos luego de la maduración *in vitro* de los oocitos.

Las fallas en la funcionalidad y o distribución de las proteínas estudiadas, tanto estructurales (NuMA) como motoras (Eg5, HSET), dan lugar a la generación de husos meióticos aberrantes y fallas en la segregación cromosómica que derivarán en un aumento de las aneuploidías y una mayor tasa de abortos. Un mayor conocimiento de los procesos de maduración oocitaria redundará en un incremento de las posibilidades de poder contar con un sistema de maduración de oocitos eficiente con los consecuentes beneficios que esto generaría a la paciente que consulta por problemas reproductivos.

Esperamos que la realización de estos estudios aporte respuestas a diferentes preguntas pendientes sobre los mecanismos subcelulares involucrados en la generación de aneuploidías durante la maduración in vitro de oocitos, con especial énfasis en el entendimiento del ensamblaje del aparato microtubular y sus alteraciones celulares.

AGRADECIMIENTOS

Especial agradecimiento a los médicos del Staff de CEGyR y al Dr. Sueldo por la revisión del manuscrito y curiosidad para el estudio del material. Los fondos para la realización del presente trabajo se obtuvieron de Asociación CEGyR.

Bibliografía

- Berchadsky A, Gelfand V, Svitkina T and Tint I. (1978). "Microtubules mouse embryo fibroblasts extracted with Triton X-100". *Cell Biol Intl Rep.* 2: 425-32.
- Chakravarty A, Howard L and Duane A. Compton. (2004). "A Mechanistic Model for the Organization of Microtubule Asters by Motor and Non-Motor Proteins in a Mammalian Mitotic Extract". *Mol Biol of Cell.* 15: 2116-32.
- Compton D and Cleveland D. (1993). "NuMA is required for the proper completion of mitosis". *J Cell Biol.* 120: 947-957.
- Compton D. (1998). "Focusing on spindle poles". *J Cell Sci.* 111: 1477-81.
- Compton D. (2000). "Spindle assembly in animal cells". *Annu Rev Biochem.* 69: 95-114.
- Delimitreva S, Zhivkova R, Isachenko E, Umland N and Nayudu P. (2006). "Meiotic abnormalities in in vitro-matured marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) oocytes: development of a non-human primate model to investigate causal factors". *Hum Rep.* 21: 240-247.
- Desai A and Mutchison T. (1997). "Microtubule polymerization dynamics". *Ann Rev Cell Dev Biol.* 13: 83-117.
- Gaglio T, Saredi A and Compton D. (1995). "NuMA is required for the organization of microtubules into aster-like mitotic arrays". *J Cell Biol.* 131: 693-708.
- Gaglio T, Saredi A, Bingham J, Hasbani M, Gill S, Schroer T and Compton D. (1997). "Opposing motor activities are required for the organization of the mammalian mitotic spindle pole". *J Cell Biol.* 135: 399-414.
- Heald R. (2000). "Motor function in the mitotic spindle". *Cell.* 102:399-402.
- Hyttel P, Callesen H and Greve T. (1989). "A comparative ultrastructural study of in vivo versus in vitro fertilization of bovine oocytes". *Anat Embryol.* 179: 435-42.
- Karki S and Holzbaur EL. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=10047518&query_hl=5&itool=pubmed_docsum> (1999). "Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport". *Curr Opin Cell Biol.* 11(1):45-53.
- Kim N, Funahashi H, Prather R, Schatten G and Day B. (1996a). "Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation". *Mol Reprod Dev.* 43: 248-55.
- Kim N, Moon S, Prather R and Day B. (1996b). "Cytoskeletal alteration in aged oocytes and parthenogenesis". *Mol Reprod Dev.* 43: 513-18.

15. Lee, J; Miyano, T; Moor, R. (2000). "Spindle formation and dynamics of g-tubulin and nuclear mitotic apparatus protein distribution during meiosis in pig and mouse oocytes". *Biol of Rep.* 62: 1184-1192.
16. Long CR, Damiani P, Pinto-Correa C, MacLean R, Duby R and Robl J. (1994). "Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions of fertilization". *J Reprod Fertil.* 102: 361-9
17. Long CR, Pinto-Correia C, Duby R, Ponce de León F, Boland M, Roche J and Robl J. (1993). "Chromatin and microtubule morphology during the first cell cycle in bovine zygotes". *Mol Reprod Dev.* 36: 23-32.
18. Mailhes J, Mastromatteo C and Fuseler J. (2004). "Transient exposure to the Eg5 kinesin inhibitor monastrol leads to syntelic orientation of chromosomes and aneuploidy in mouse oocytes". *Mutation Res.* 559: 153-167.
19. Merdes A, Ramyar K, Vechio J and Cleveland D. (1996). "A complex of NuMA and cytoplasmatic dynein is essential for mitotic spindle assembly". *Cell.* 84: 447-58.
20. Mitchison T and Kirschner M. (1984). "Dynamic instability of microtubule growth". *Nature.* 213: 237-42.
21. Payne C and Schatten G
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Search&itool=pubmed_Abstract&term=%22Payne+C%22%5BAuthor%5D>
and Schatten G
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Search&itool=pubmed_Abstract&term=%22Schatten+G%22%5BAuthor%5D> . (2003). "Golgi dynamics during meiosis are distinct from mitosis and are coupled to endoplasmic reticulum dynamics until fertilization". *Dev Biol.* <javascript:AL_get(this,%20'jour',%20'Dev%20Biol.');"> 264: 50-63.
22. Sharp D, Rogers G and Scholey J. (2000). "Microtubule motors in mitosis". *Nature.* 407: 41-47.
23. Simerly C and Schatten G. (1993). "Techniques for localization of specific molecules in oocytes and embryos". *Methods Enzymil.* 225: 516-52.
24. Simerly C, Navarra C, Rawe V, Lenahan K, Balczon R, Compton D, Silber S and Schatten G. (2006). "Mitotic spindles in human and monkey eggs are organized by oppositely-oriented maternal motors and NuMA regardless of sperm centrioles". Trabajo enviado a PNAS.
25. Surrey T, Nédélec F, Leibler S and Karsenti E. (2001). "Physical properties determining self-organization of motors and microtubules". *Science.* 292: 1167-71.
26. Tang, C; Hu, H and Tang T. (2004). "NuMA expression and function in mouse oocyte and early embryos". *J. Biomed. Sci.* 11: 370-376.
27. Wang XM, Huang TH, Xie QD, Zhang QJ and Ruan Y. (2004). "Effect of dynein inhibitor on mouse oocyte in vitro maturation and its cyclin B1 mRNA level". *Biomed Environ Sci.* 17: 341-9.
28. Whitehead C and Ratter J. (1998). "Expanding the role of HsEg5 withing the mitotic and post-mitotic phases of the cell cycle". *J Cell Sci.* 111: 2551-2561.
29. Whittman T, Hyman A and Desai A. (2001). "The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors". *Nature cell biol.* 3: E28-E34.