

Biología de la Reproducción

Función del glutatión reducido durante la maduración y fecundación de ovocitos y desarrollo pre-implantatorio de embriones in vitro en mamíferos

Function of reduced glutathione during oocyte maturation and fertilization and pre-implantation embryo development in vitro in mammals

Rausell F, Tarín JJ

Departamento de Biología Funcional y Antropología Física, Facultad de Ciencias Biológicas, Universitat de València. Valencia

Resumen

Objetivos: *Realizar una puesta al día del papel del GSH durante la maduración y fecundación de ovocitos y desarrollo pre-implantatorio de embriones in vitro en mamíferos.*

Métodos: *Revisión de la literatura.*

Resultados y conclusiones: *Los ovocitos y embriones pre-implantatorios experimentan un descenso de la concentración intracelular de GSH tras la fecundación y la activación del genoma embrionario, respectivamente. Durante y después de estos estadios del desarrollo, los cigotos y embriones son más susceptibles de sufrir un daño oxidativo si se exponen a factores externos tales como unas condiciones de cultivo inapropiadas. La síntesis de novo de GSH acontece cuando se alcanza el estadio de blastocisto en el ratón o entre el estadio de 9 a 16 células en la vaca. Por lo tanto, la tolerancia de los embriones a un estrés oxidativo difiere a lo largo de los distintos estadios del desarrollo pre-implantatorio. La exposición a agentes oxidantes se asocia con una reducción del nivel de GSH intracelular, así como con una disminución del potencial de desarrollo embrionario pre-implantatorio. Por el contrario, la exposición a agentes reductores incrementan el nivel de GSH intracelular y el potencial de desarrollo embrionario pre-implantatorio.*

Palabras clave: Desarrollo embrionario pre-implantatorio. Fecundación. GSH. Maduración in vitro. Ovocito.

Correspondencia: Dr. Juan J. Tarín
Departamento de Pediatría. Obstetricia y Ginecología
Facultad de Medicina
Universidad de Valencia
Avda. Blasco Ibañez 17
46010 Valencia;
e-mail: tarinjj@uv.es

Summary

Objectives: *To analyze the state of the art of the function of GSH during oocyte maturation and fertilization, and pre-implantation embryo development in vitro in mammals.*

Methods: *A literature review.*

Results and conclusions: *Oocytes and pre-implantation embryos exhibit a decline in GSH content after fertilization and embryonic genome activation, respectively. During and after these developmental stages, zygotes and embryos are more vulnerable to suffer oxidative damage when exposed to external factors such as non-optimal culture conditions. De novo synthesis of GSH begins at the blastocyst stage in the mouse and between the 9- and 16-cell stage in the cow. Therefore, the embryonic tolerance to oxidative stress differs along the different stages of pre-implantation development. Exposure to oxidizing agents is associated with a depletion of intracellular content of GSH as well as a decline in the potential for pre-implantation embryo development. In contrast, exposure to reducing agents increases both intracellular content of GSH and the potential for pre-implantation embryo development.*

Key words: Fertilization. GSH. In-vitro maturation. Oocyte. Pre-implantation embryo development.

INTRODUCCIÓN

El glutatión reducido (GSH) es utilizado como almacenamiento y transporte de cisteína, participa también en la síntesis de DNA y proteínas, en el metabolismo y pasa por ser la principal defensa no enzimática de las células frente al estrés oxidativo ocasionado principalmente por factores como el envejecimiento, exposición a tóxicos, el propio metabolismo, etc.

El GSH está constituido por tres aminoácidos, γ -glu-cys-gly, y su síntesis tiene lugar en el citoplasma celular en dos pasos (Figura 1). En primer lugar, se une el glutamato con la cisterna, reacción catalizada por la γ -glutamylcisteína sintetasa (γ -GCS). A continuación, se une la glicina con la cisterna, reacción catalizada por la glutatión sintetasa.

El primer paso es la etapa limitante de la síntesis del GSH. La expresión de γ -GCS ha sido detectada en todos los estadios de desarrollo embrionario pre-implantatorio, tanto en el ratón como en embriones bovinos, lo cual confirma la presencia de GSH durante el desarrollo pre-implantatorio (1).

La disponibilidad de los tres aminoácidos necesarios para la síntesis del GSH puede suponer un punto de control de la misma a nivel intracelular (2).

El GSH es el sustrato de la glutatión peroxidasa (GPX), encargada de eliminar el H_2O_2 , así como los hidroperóxidos de lípidos (Figura 1). La GPX es, por tanto, una de las principales enzimas antioxidantes. Actúa reduciendo el H_2O_2 a H_2O y O_2 , al mismo tiempo que oxida el GSH a GSSG. Posteriormente, el GSH puede recuperarse gracias a la acción de la

GSH reductasa, la cual se encarga de reducir el GSSG a GSH. Parece ser que la GPX, también presente durante todo el desarrollo pre-implantatorio en embriones de ratón y bovinos (1), juega un papel central en la defensa ante la oxidación celular, permitiendo junto a la acción de la GSH reductasa y la γ -GCS, reducir las ROS (especies reactivas de oxígeno) y mantener una adecuada concentración intracelular de GSH (3).

Como veremos posteriormente, tanto los ovocitos madurados in vitro, como los embriones pre-implantatorios están sometidos a una serie de condiciones ambientales (concentración elevada de O_2 , luz visible, presencia de cationes metálicos, etc.) que incrementan las ROS externas, así como la producción endógena de las mismas. Todas estas condiciones que se dan in vitro hacen que los ovocitos y embriones cultivados estén expuestos a un mayor estrés oxidativo que aquellos que maduran y son fecundados in vivo (Figura 1). Tal circunstancia disminuye el potencial de maduración y desarrollo de ovocitos y embriones, dando lugar, incluso, a un bloqueo de la maduración o desarrollo.

Dada la importancia actual de las técnicas de fecundación in vitro, tanto en la producción ganadera como en el tratamiento de diversas patologías que afectan a la reproducción humana, esta revisión tiene como objetivo poner de manifiesto la importancia del GSH en la maduración ovocitaria, fecundación y desarrollo pre-implantatorio de embriones de mamífero in vitro, su papel frente al estrés oxidativo, así como las ventajas de la adición de agentes antioxidantes en el medio de cultivo.

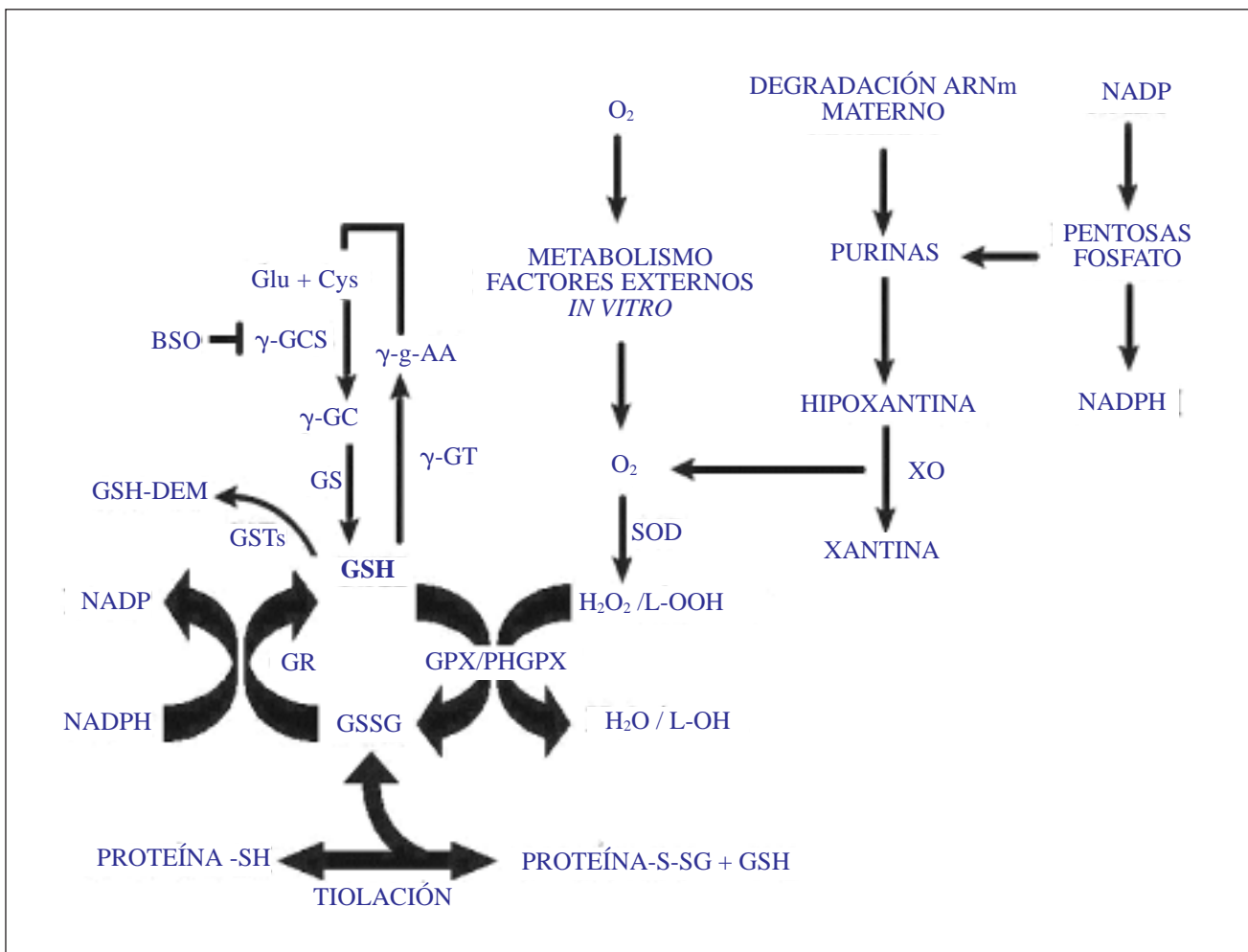


Figura 1

Síntesis y degradación del GSH en el ciclo γ -glutamilo. Proceso de oxido-reducción del GSH para la eliminación del exceso de ROS, generadas durante el desarrollo embrionario pre-implantatorio. Se muestran también los efectos de agentes tóxicos causantes de estrés oxidativo, en concreto BSO y DEM. Abreviaturas: Glu: glutamato; Cys: cisteína; γ -GC: γ -glutamilcisteína; γ -GCS: γ -glutamilcisteína sintetasa; GS: glutatión sintetasa; γ -GT: γ -glutamilo transpeptidasa; γ -g-AA: γ -glutamilo-aminoácido; GR: glutatión reductasa; GPX: glutatión peroxidasa; PHGPX: fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa; SOD: superóxido dismutasa; XO: xantina oxidasa; BSO: butirato de sulfoximina; DEM: dietilmaleato; L-OOH: hidroperóxidos de lípidos; L-OH: peróxidos de lípidos.

ESTRÉS OXIDATIVO Y PAPEL DE LAS ROS

Las ROS presentan uno o más electrones desapareados (4). Pueden ejercer un potencial oxidante muy importante sobre moléculas celulares. Las ROS pueden tener tanto un origen endógeno como exógeno (3). Las fuentes exógenas de ROS dependen de:

(I) La concentración ambiental de O_2 . Cuanta más alta sea, mayor es la actividad enzimática de las oxidasas y, por tanto, mayor es la concentración intracelular del anión superóxido (O_2^-). Se comprobó que

embriones bovinos, cultivados in vitro bajo una concentración de O_2 atmosférico (20%), presentaban un menor desarrollo hasta el estadio de blastocisto y mayor daño en el DNA que aquellos cultivados bajo una concentración del 5 % de O_2 (5).

(II) La presencia de cationes metálicos.

(III) La luz visible.

(IV) La actividad amino oxidasa, presente en medios de cultivo tras ser liberada por los espermatozoides muertos.

Endógenamente, las ROS pueden proceder de:

(I) La fosforilación oxidativa. El 70% del oxígeno consumido en el blastocisto de ratón y < 30% del consumido en el embrión de 2-4 células se debe a este proceso mitocondrial. Sin embargo, no parece que las mitocondrias sean la principal fuente de ROS puesto que la inhibición de la fosforilación oxidativa no ocasiona un descenso importante de ROS en el embrión (3).

(II) La actividad de la NADPH oxidasa, que ha sido evidenciada en la superficie del blastocisto de conejo, pero igualmente secundaria en la producción de ROS (3).

(III) La actividad de la xantina oxidasa, la principal fuente de ROS en embriones pre-implantatorios de ratón (3, 4).

La contribución de cada una de estas fuentes depende de la especie en cuestión, del estadio de desarrollo embrionario y de las condiciones de cultivo. De hecho, mientras los embriones de ratón se desarrollan hasta el estadio de blastocisto *in vitro*, en un medio simple con una fuente de proteínas y carbohidratos, los embriones bovinos necesitan cocultivo con células somáticas que podrían aportar agentes antioxidantes. Al parecer, los embriones de ratón muestran unas defensas antioxidantes más completas que los embriones bovinos, incluyendo la expresión de algunas enzimas antioxidantes como Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD) (1).

Se conoce desde hace tiempo que los embriones de mamíferos tienden a sufrir un bloqueo del desarrollo embrionario *in vitro* (4). Dicho bloqueo se produce cuando se activa la expresión del genoma embrionario, al final del estadio de 2 células en el ratón. Los embriones de ratón cultivados *in vitro* muestran unos niveles de peróxidos y superóxidos en el período G₂/M del segundo ciclo celular mayores que los mostrados por embriones *in vivo* en el mismo período. Este incremento requiere una activación del ovocito, bien por fecundación, bien por estímulos partenogénicos. En ovocitos fecundados y cultivados *in vitro*, se ha observado una disminución en el contenido de GSH intracelular respecto a los embriones desarrollados *in vivo*, en embriones de 2 y 4 células, mórula o blastocisto (6).

La activación del genoma embrionario se asocia con la eliminación de RNAm materno en el estadio tardío de dos células. Dicha eliminación provoca la aparición de purinas endógenas que son transformadas en hipoxantina. La hipoxantina es el sustrato para la xantina oxidasa, la cual transforma a la hipoxantina en xantina, dando lugar al ión O₂⁻ (3, 4) (Figura 1). También se ha comprobado que un exceso de glucosa puede inducir un aumento de las ROS en el embrión

de ratón, ocasionando un bloqueo del desarrollo. Un exceso de glucosa supone la activación de la ruta de las pentosas-fosfato y, por tanto, la producción de purinas que acaban degradándose en el sistema xantina/xantina oxidasa (3). Así pues, se puede señalar a la xantina oxidasa como la principal fuente de ROS en el embrión de ratón y como responsable principal del bloqueo del desarrollo pre-implantatorio *in vitro*.

Hay todo un conjunto de medidas protectoras frente al estrés oxidativo que disminuyen el efecto negativo de las ROS. Dentro de éstas, podemos encontrar mecanismos de defensa enzimáticos (superóxido dismutasa, GPX, catalasa, GSH reductasa, γ -GCS, etc.) y no enzimáticos (GSH, cisteamina, taurina e hipotaurina, ascorbato, vitamina E, piruvato, etc.).

Sin embargo, en lo concerniente al GSH, las diferencias en el contenido de GSH entre distintas cepas de ratón y entre embriones cultivados *in vivo* o *in vitro* no son suficientes para explicar el bloqueo del desarrollo embrionario. Se ha observado que el cultivo *in vitro* supone un incremento en la producción de ROS por parte del embrión y que dicha producción varía según el estadio del desarrollo. El bloqueo del desarrollo embrionario es tan solo el extremo del retraso general en el desarrollo que se da *in vitro*. Las variaciones en el nivel endógeno de hidroperoxidación lipídica, capacidad para quelar metales de transición o actividad antioxidante en general determinan que el embrión se bloquee o prosiga su desarrollo normal (3, 4).

CONTENIDO DE GSH Y VARIACIÓN EN LA MADURACIÓN OVOCITARIA, FECUNDACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO PRE-IMPLANTATORIO

El GSH está implicado en diversas funciones ovocitarias y embrionarias (7):

(I) Permite la descondensación de la cromatina espermática al reducir los puentes disulfuro (S-S) de las protaminas, proteínas que protegen y empaquetan la cromatina de los espermatozoides.

(II) En el blastocisto, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), presente en el fluido del blastocelo, juega un papel importante en la diferenciación, provocando la apoptosis de células del pre-trofectodermo, es decir, con potencial para dar lugar al trofectodermo. Mientras que estas células pierden la capacidad de sintetizar GSH, las otras células embrionarias sintetizan GSH, protegiéndose, de este modo, frente a los efectos oxidativos del H₂O₂ (7, 8).

(III) Los xenobióticos, sustancias tóxicas sintéticas, pueden ser responsables de la destrucción de ovocitos, menopausia precoz y muerte temprana de los embriones, por tanto, las condiciones del sistema GSH pueden ser importantes en la detoxificación de estos contaminantes.

Se demostró que, en el ratón, existe una reducción del contenido de GSH desde una concentración de 7 mM en el ovocito no fecundado hasta una concentración de 0.7 mM en el blastocisto. El contenido de GSH desciende en un 20-25 % durante el proceso de fecundación y un 45% cuando se llega al final de la fase de 2 células (6, 7, 9). La mayor reducción del contenido de GSH coincide, por tanto, con la activación del genoma embrionario.

En ovocitos bovinos madurados *in vitro*, se observaron elevados niveles de GSH durante la maduración, se mantuvieron elevados después de la fecundación *in vitro* y bajaron en el estadio de 8 células (10).

Según los trabajos de Gardiner & Reed (6, 7), en un principio, el embrión cuenta sólo con el GSH acumulado por el ovocito. No obstante, cuando alcanza el estadio de blastocisto empieza a sintetizar GSH *de novo*. Por lo tanto, los estadios de división embrionaria previos al blastocisto son más sensibles a los tóxicos que disminuyen el contenido de GSH.

A continuación vamos a analizar las funciones del GSH, así como su contenido en la maduración ovocitaria, la fecundación y el desarrollo embrionario. Intentaremos establecer una comparación de cómo varían estos factores en los procesos *in vivo* frente a los procesos *in vitro*, y cuales son los avances que se han llevado a cabo en la reproducción *in vitro* de mamíferos.

MADURACIÓN OVOCITARIA

Se conoce desde hace tiempo que el GSH del ovocito es sintetizado durante la primera meiosis (meiosis I). Si se bloquea la síntesis de GSH durante su desarrollo, se disminuye el potencial de fecundación del ovocito (11). La maduración del citoplasma del ovocito incluye procesos como la síntesis de compuestos bioquímicos, fosforilación de proteínas o la activación de rutas metabólicas. La síntesis de GSH forma parte de esta maduración y es, por tanto, requerida para una fecundación y desarrollo embrionario normales (12).

El GSH actúa sobre los microtúbulos y su polimerización, y también, por consiguiente, sobre la formación del huso acromático. Esto quedó demostrado en experiencias con diamida. La diamida es un com-

puesto que muestra una gran afinidad por el GSH y actúa oxidándolo a GSSG. Se utilizaron distintas concentraciones de diamida (0, 25, 50, 100 μ M) y se comprobó que la diamida altera, de forma dependiente del tiempo y la dosis, tanto el huso acromático como la oxidación de GSH a GSSG (13). Al cabo del tiempo, dejando los ovocitos en un medio libre de diamida, recuperaban la razón GSH/GSSG por acción de la actividad GSH reductasa. La posibilidad que la diamida actuara sobre otros grupos -SH de los microtúbulos parece poco probable dada la gran afinidad de la diamida por el GSH.

En otros estudios se utilizó la sonda Cell tracker Green 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) para analizar la distribución de la actividad intracelular de la glutation S-transferasas (GSTs) y tioles, incluido el GSH, en ovocitos de ratón durante la maduración meiótica (14). Este colorante pasa libremente a través de las membranas celulares. Una vez en su interior, el colorante se conjuga con GSH, reacción catalizada por el enzima GSTs, produciendo un tioéter que es impermeable a la membrana plasmática. El conjugado formado no muestra sus propiedades fluorescentes hasta que sus grupos acetato son escindidos por esterasas citosólicas. Este estudio (14) mostró que durante la fase de vesícula germinal, la fluorescencia aparecía distribuida en manchas de diferente tamaño que se localizaban en el córtex, por debajo de la membrana plasmática, y más profundamente en el citoplasma, con unas grandes acumulaciones alrededor de la vesícula germinal. En metafase de la primera división meiótica (metafase I), las manchas aparecían por todo el ovocito aunque las mayores se encontraban en el córtex. El primer huso de la meiosis se mostraba rodeado por un anillo libre de fluorescencia, correspondiente al anillo mitocondrial que envuelve dicho huso. Durante la transición entre anafase I y telofase I, podían detectarse manchas brillantes en el área cortical junto al huso. Sin embargo, estas manchas no se observaban tras la expulsión del primer corpúsculo polar.

Zuelke y colaboradores (15) estudiaron la variación del contenido de GSH de ovocitos de hámster durante la maduración *in vivo*. El contenido de GSH durante 0-2 h post-hCG era de 1 pmol/ovocito. En cambio, a las 4 h post-hCG era de 1.62 pmol/ovocito. Este incremento se asoció con el estadio de prometafase I, en el cual, los cromosomas se han condensado y el huso acromático está empezando a formarse. Estos niveles se mantuvieron durante la metafase I (6 h post-hCG), llegando a alcanzar un máximo de 3.24 pmol/ovocito durante la metafase de la segunda división meiótica (metafase II) (16 h post-hCG). Durante

esta maduración meiótica in vivo, el incremento en GSH aconteció tanto en los ovocitos como en las células del cúmulus. El metabolismo del GSH en el folículo ovárico puede estar bajo regulación hormonal, permitiendo que las células del cúmulus puedan transferir GSH al ovocito. El GSH aumenta rápidamente durante la maduración temprana del ovocito apareciendo como un regulador de la maduración citoplasmática y nuclear.

La concentración intracelular del GSH al final de la maduración in vitro de los ovocitos es mucho menor que la de ovocitos madurados in vivo. Tal circunstancia, no debe extrañarnos ya que como hemos mencionado anteriormente, existen condiciones de cultivo que incrementan los niveles de ROS en el medio de cultivo. Al comparar ovocitos de cerdo madurados in vitro, en tres medios diferentes, frente a ovocitos madurados in vivo se encontró que, en los ovocitos madurados in vitro, el contenido de GSH era entre 3 y 4 veces menor que los madurados in vivo (16).

Además del mayor nivel de ROS, en la maduración in vitro, pueden aparecer otros problemas como por ejemplo: una falta de sustratos adecuados para la síntesis de GSH, la inestabilidad de la cisteína que se oxida a cistina, o una exposición inadecuada a un pico de LH antes de la ovulación que podría interrumpir las vías de síntesis de GSH (16).

Por todo ello, se ha estudiado también la posibilidad de suplementar los medios de cultivo utilizados en la maduración in vitro de ovocitos. Por ejemplo, se utilizó cisteamina (50 μM), cisteína (0.3 mM) y una combinación de ambas durante la maduración in vitro de ovocitos de búfalo (17). En los tres tratamientos aplicados se obtuvo un aumento de la concentración intracelular de GSH, asociada a una mejora en la producción in vitro de embriones de esta especie. La maduración in vitro de ovocitos de búfalo no produce suficiente GSH para mantener el desarrollo después de la fecundación. En cambio, gracias a la adición de cisteamina al medio de cultivo de los ovocitos, se logró aumentar el contenido intracelular de GSH, permitiendo a los embriones, que todavía no podían sintetizar GSH de novo, seguir con su desarrollo una vez las reservas de GSH procedentes del ovocito se habían agotado (18). Estos resultados son también consistentes con la utilización de cisteamina (100 μM) y factor de crecimiento epidérmico (10 ng/ml) sobre la maduración in vitro de ovocitos bovinos (19).

De Matos et al. (20) aplicaron tratamientos con β -mercaptoetanol (100 μM), cisteína (0.6 mM) y cistina (0.6 mM) durante la maduración in vitro de ovocitos bovinos. Tanto durante la maduración ovocitaria co-

mo después de la fecundación in vitro, los embriones tratados mostraron una mayor concentración de GSH intracelular. Sin embargo, en el estadio de 6-8 células, no se encontraron diferencias significativas en el contenido intracelular de GSH con respecto a los embriones controles. Aún así, los tres compuestos mejoraron significativamente el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto.

En ovocitos de cabra, la adición de cisteamina (400 μM) durante la maduración in vitro consiguió aumentar significativamente la proporción de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II (21).

En ovocitos de cabra, madurados in vitro, se observó un incremento en el contenido intracelular de GSH de los ovocitos al suplementar el medio de cultivo con 1 mM GSH (22). No obstante, en este estudio (22), la suplementación del medio de cultivo con cisteína no consiguió incrementar el contenido intracelular de GSH.

Estudios más recientes, centrados en la maduración in vitro de ovocitos de cabra prepúberes, se consiguió incrementar la concentración intracelular de GSH con cisteamina (100 μM), β -mercaptoetanol (100 μM), cisteína (0.57 mM) y cistina (0.57 mM) en ovocitos en metafase II, pero solo la cisteamina consiguió mejorar el porcentaje de fecundación in vitro y de desarrollo embrionario hasta la fase de blastocisto expandido (23).

En ovocitos de oveja, madurados in vitro durante 24 horas en presencia de cisteamina (200 μM) y en metafase II, se consiguió incrementar el contenido de GSH y el porcentaje de blastocistos obtenidos tras fecundación. En cambio, con β -mercaptoetanol (50 μM) también se consiguió dicho incremento de GSH, pero no un aumento en el porcentaje de blastocistos. Ambos compuestos bajaron la cantidad de H_2O_2 (24).

El β -mercaptoetanol también demostró tener efectos positivos sobre la maduración in vitro de ovocitos de perro, aumentando significativamente el porcentaje de ovocitos madurados hasta metafase II (25). Hay que remarcar que los ovocitos caninos completan la meiosis después de la ovulación, entre los días 2 y 5 de residencia en el oviducto, y que los efectos beneficiosos del β -mercaptoetanol sólo se observaron en ovocitos recogidos en el estadio folicular, es decir, en hembras en fase de estro.

En ovocitos de cerdo, al añadir 500 μM de cisteamina al medio de cultivo durante la maduración in vitro, se logró mejorar significativamente el desarrollo embrionario resultante de la fecundación in vitro posterior. En concreto, el 37%, 19% y 12% de los embriones alcanzaron el estadio de 8 células, mórula y blastocisto, respectivamente, frente a un 16%, 6% y <

1%, respectivamente, en el grupo de ovocitos madurados en ausencia de cisteamina (26).

Posteriormente, se ha experimentado con la adición de intermediarios del ciclo γ -glutamil durante la maduración in vitro (27). A pesar de no encontrar un efecto de la L-glicina, se logró incrementar la concentración interna de GSH en ovocitos en metafase II mediante la adición de L-glutamato (1 mM), cisteína (33 mM) y L- α -aminobutirato (3.3 mM). También, se logró incrementar la concentración de GSH en ovocitos en metafase II mediante agentes reductores como la cisteamina (150 μ M) y β -mercaptoetanol (25 μ M). No obstante, debemos recordar que para obtener una mayor cantidad de embriones de buena calidad se ha de actuar sobre la maduración, fecundación y primeras 24 h de cultivo embrionario (27).

Tanto el β -mercaptoetanol como la cisteamina son grupos tioles de bajo peso molecular que estimulan la síntesis de GSH. En concreto, tanto el β -mercaptoetanol como la cisteamina favorecen la reducción de la cistina, dímero de cisteína formado por autooxidación de dos moléculas de cisteína, a cisteína en el medio de cultivo, dejando a la cisteína, incorporada a través del sistema de transporte alanina-serina-cisteína (ACS), a disposición del ovocito o del blastocisto para la síntesis del GSH en el ciclo γ -glutamil (28). La utilización de compuestos reductores o antioxidantes durante la maduración in vitro de los ovocitos de búfalo también mejora los parámetros de la fecundación, ya que la utilización durante dicho proceso in vitro de cisteína y cisteína más cisteamina logra incrementar el porcentaje de ovocitos con dos pronúcleos sincrónicos y favorece la formación del pronúcleo masculino (17).

Las células del cúmulus juegan un papel importante en la síntesis intracelular de GSH en ovocitos de vaca, cerdo y hámster (12). Las células del cúmulus se comunican entre ellas y el ovocito por uniones tipo "gap" que permiten el paso en ambas direcciones de pequeñas moléculas, tales como el GSH. Las células del cúmulus producen parte del GSH durante la maduración ovocitaria, supliendo así la capacidad limitada de síntesis que poseen los ovocitos. Las células del cúmulus participan también en la maduración del citoplasma ovocitario, continuación de la meiosis y en la expansión del cúmulus mediante la síntesis y liberación de glucosaminoglucanos y ácido hialurónico. En células del cúmulus in vivo, se pasa de un contenido de GSH de 36 pmol/ μ g proteína durante las 0-2 h post-hCG a 77 pmol/ μ g proteína a las 4 h post-hCG y 102 pmol/ μ g proteína a las 6 h post-hCG. Este aumento es el que se corresponde con la expansión del cúmulus que comienza a las 4 h y se hace más acusada a las 6 h post-hCG (15).

En experimentos de maduración in vitro de ovocitos bovinos inducidos por FSH (29) se añadieron ovocitos rodeados de cúmulus durante la maduración in vitro de ovocitos libres de células de cúmulus. Dicha adición permitió que los ovocitos libres de células del cúmulus recuperaran su capacidad de desarrollo. En cambio, si se cultivaban los ovocitos libres de células del cúmulus con células de granulosa libres no producía ninguna mejora en dicha capacidad. También se comprobó que la adición de cisteamina producía un aumento de la concentración intracelular de GSH, tanto en ovocitos desnudos cultivados solos, como en ovocitos desnudos co-cultivados con complejos ovocito-cúmulus. Sin embargo, el aumento en la concentración de GSH fue mayor en el cocultivo con los complejos ovocito-cúmulus. Parece ser que en los complejos ovocito-cúmulus se mantiene la comunicación fisiológica entre las células de granulosa y el ovocito generando factores solubles que permiten que ovocitos desnudos recuperen la capacidad de desarrollo normal de ovocitos mantenidos junto a las células de granulosa. La matriz extracelular de moléculas que aparece en la expansión del cúmulus asegura una correcta maduración y un aprovisionamiento correcto de GSH durante la maduración in vitro.

La adición al medio de cultivo de fragmentos de la pared folicular durante la maduración in vitro de ovocitos de cerdo mejora el contenido de GSH intracelular cuando se compara con ovocitos madurados in vitro en ausencia de dichos fragmentos (8.7 \pm 1.6 pmol/ovocito vs. 6.4 \pm 1.8 pmol/ovocito, respectivamente), también, de forma significativa el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto (36% vs. 18% de blastocistos obtenidos) (30, 31). Los fragmentos de la pared folicular pueden mejorar la relación entre las células del cúmulus y los ovocitos, así como secretar factores adecuados para el desarrollo embrionario. Estos fragmentos pueden contribuir a incrementar la concentración intracelular de GSH manteniendo una menor tensión de oxígeno en el cultivo, que además de representar un menor estrés oxidativo, permite que la cisteína presente en el medio de cultivo no se oxide a cistina y quede disponible para ser transportada por el sistema ACS al interior del ovocito y, por tanto, pueda ser utilizada para la síntesis de GSH.

FECUNDACIÓN

Debido al papel del GSH durante la fecundación, su contenido en el ovocito desciende durante dicho proceso. En la fecundación in vivo de ovocitos de

hámster, poco después de la penetración del espermatozoide, en el estadio pronuclear temprano (G1), la concentración de GSH cae un 20% (de 3.24 a 2.61 pmol/cigoto); en el estadio pronuclear tardío (G2) desciende un 30% (quedando en 1.71 pmol/cigoto) (15).

En la cabra, tras la penetración del espermatozoide, la γ -glutamyl transpeptidasa (GGT), cataliza la primera reacción de degradación del GSH en el ciclo γ -glutamyl (Figura 1). Esta enzima está presente en la superficie del acrosoma y en distintas regiones de la pieza media del espermatozoide. Se encarga de catalizar la transformación del GSH en cisteinil-glicina (32). La introducción de GGT dentro de los ovocitos cuando entra el espermatozoide parece ser el principal responsable del descenso de GSH y GSSG que acontece durante la fecundación. La concentración intracelular del cisteinil-glicina en los ovocitos aumenta al mismo tiempo que disminuye el contenido de GSH (33). De ahí, que las principales sospechas recaigan en la GGT espermática. Este descenso en el contenido total de GSH en el ovocito puede incluso inhibir la formación del pronúcleo masculino, ya que el GSH es el encargado de reducir los puentes disulfuro de las protaminas espermáticas y favorecer la descondensación espermática (32). El GSH reduce los puentes disulfuro de las protaminas que hipercondensan y empaquetan el DNA espermático y permite que sean sustituidas por histonas procedentes del ovocito, dando lugar al pronúcleo masculino.

Existen, también, otras partes de los espermatozoides que también tienen abundantes puentes disulfuro sensibles a agentes reductores como el GSH (11). En ovocitos de rata, se observó que mientras el cociente GSH/GSSG se mantenía constante durante la penetración espermática, el contenido de GSH del ovocito descendió entre la descondensación y la formación del pronúcleo. En cambio, en cerdos, se produjo dicho descenso entre la penetración y la descondensación. Esta diferencia en el momento del descenso de la concentración de GSH se corresponde con la diferencia en el momento de la incorporación de la cola del espermatozoide al citoplasma de los ovocitos de ratas y cerdos respectivamente. Siendo, por tanto, distinto el momento de incorporación de la GGT (33).

En el trabajo de Tarín & Cano (14), noventa minutos después de la inseminación, las manchas de tinción CMFDA, las cuales evidencian actividad intracelular de GSTs y presencia de tioles, incluyendo al GSH, se presentaban distribuidas de forma más o menos uniforme a través del citoplasma, aunque había todavía una ligera tendencia a que las más grandes

estubieran en el córtex, por debajo de la membrana plasmática. Tras la penetración del espermatozoide, se detectaba un foco brillante de CMFDA en el área cortical, entre la membrana plasmática y la cabeza del espermatozoide. Éste foco aumentaba de tamaño durante la formación del pronúcleo masculino. En cambio, el pronúcleo femenino nunca se rodeaba de parches de tinción CMFDA.

El GSH ayuda también a mantener la morfología del huso acromático frente al estrés oxidativo, permitiendo una formación normal del cigoto (12). En experimentos con diamida (13), esta no afectó parámetros de fecundación o desarrollo del pronúcleo masculino, pero sí afectó al pronúcleo femenino, debido al daño efectuado sobre los microtúbulos del ovocito.

La adición de GSH (1 mM) durante la fecundación in vitro de ovocitos de cabra aumentó significativamente la proporción de ovocitos fecundados y ovocitos con dos pronucleos (21), aunque no se lograba mejorar el porcentaje de blastocistos obtenidos. El GSH extracelular en este caso disminuyó la presencia de ROS en el medio y favoreció la estabilización de espermatozoides, ovocitos y embriones tempranos. No obstante, ni las distintas concentraciones de cisteína (0, 150, 300, 600 y 900 μ M) ni de GSH (0, 0.25, 0.5 y 1 mM) utilizadas previamente por Mayor et al. (22) lograron mejorar el porcentaje de fecundación in vitro de los ovocitos de cabra. Hay que tener presente que la cisteína no es el único compuesto responsable de la síntesis de GSH en ovocitos de cabras prepúberes. En concreto, el factor de crecimiento del pronúcleo masculino, podría controlar la formación del pronúcleo masculino tras la fecundación.

Las células del cúmulus también son importantes en los procesos de fecundación, ya que el microambiente que ayudan a crear durante la expansión del cúmulus favorece la interacción espermatozoide-ovocito y la fecundación (29).

DESARROLLO EMBRIONARIO PRE-IMPLANTATORIO

Como ya hemos visto, tras la acumulación de GSH que se produce durante la maduración ovocitaria y tras la posterior caída del contenido del mismo en la fecundación, el embrión contará con un bajo contenido de GSH para afrontar el desarrollo embrionario temprano. En el desarrollo embrionario temprano del hámster in vivo, los niveles de GSH se mantienen por debajo del 10% del contenido de GSH de los

ovocitos en metafase II, es decir, pasan de 3.24 pmol/ovocito a 0.21 pmol/embrión en dos células, 0.25 pmol/embrión en cuatro células y 0.29 pmol/embrión en blastocistos (15). Esta reducción todavía es más acentuada en las experiencias in vitro.

Tratamiento con sustancias oxidantes

En tratamientos con hidróperóxido de butilo terciario (tBH), un agente oxidante que provoca la oxidación de GSH a GSSG a través del enzima glutatión peroxidasa, se observó que el contenido de GSH disminuyó un 75% en embriones de 2 células y un 25% en blastocistos (6). El tBH disminuyó el desarrollo de embriones de 2 células hasta la fase de mórula y blastocisto. Este descenso se asoció con un aumento de los niveles de GSSG y GS-Sproteína.

Gardiner & Reed (34) trataron embriones de ratón en distintas fases del desarrollo, con dietil maleato (DEM), un tóxico electrofílico, y sulfoximina de butionina (BSO), inhibidor del enzima γ -glutamyl-cisteína sintasa, que participa en la síntesis del GSH (Figura 1). Dichos embriones experimentaron un desarrollo in vivo hasta el momento de aplicar el tratamiento in vitro. Tanto en embriones de 2 células como en blastocistos, se evidenció que la exposición a BSO durante 16 h provocaba una reducción en el contenido de GSH. Sin embargo, dicha reducción afectaba en menor grado a los blastocistos. Posteriormente, se demostró que, en embriones de ratón cultivados in vitro, la BSO disminuyó el porcentaje de blastocistos formados (10), afectando, del mismo modo, el desarrollo embrionario de búfalos (18).

Se pudo observar también que la presencia de DEM durante 30 minutos en cultivo reducía el contenido de GSH en embriones de 2 células y en blastocistos. De hecho, una concentración de 125 μ M provocó una bajada del nivel de GSH hasta 0,04 pmol/embrión, tanto en embriones de 2 células como en blastocistos, lo que significó una pérdida del 90% del GSH en embriones de 2 células y alrededor del 80% en blastocistos.

Después del tratamiento con DEM, los embriones de 2 células y los blastocistos fueron cultivados en presencia de cisteína. Tras 5 h, los blastocistos habían logrado recuperar los niveles de GSH, sin embargo, no ocurrió lo mismo con los embriones de 2 células. La exposición de los blastocistos a 500 μ M de DEM, durante 30 minutos no afectó significativamente el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto expandido. En cambio, una concentración de 62.5 μ M de DEM fue suficiente para disminuir significati-

vamente el desarrollo embrionario de embriones de 2 células hasta dicho estadio, lo cual indica que la capacidad de recuperar el GSH oxidado y protegerse de electrófilos es muy limitada en embriones de 2 células.

Gardiner & Reed (34) también demostraron que la BSO más el DEM provocaban una disminución en la concentración de GSH mayor que la provocada por cada uno de los agentes por separado. Además, la BSO impidió la recuperación de los niveles de GSH intracelulares después del tratamiento con DEM, al afectar directamente a la síntesis de novo del GSH. La BSO, por consiguiente, impide que se pueda aprovechar la cisteína para recuperar los niveles de GSH.

Los blastocistos parecen tener mayor capacidad para recuperar los niveles de GSH tras un estrés oxidativo puesto que los embriones de 2 células no tienen la capacidad de sintetizar GSH. En el embrión de 2 células, la recuperación se debe a la GSSG reductasa, encargada de reducir el GSSG a GSH, mientras que en el blastocisto, aparte de esta enzima, acontece además una síntesis de novo del GSH. Por tanto, el ciclo redox del glutatión no parece ser el responsable de la disminución del GSH entre el estadio de 2 células y el blastocisto. El papel de las ROS y los mecanismos protectores dependientes de GSH en la diferenciación del embrión pre-implantatorio y apoptosis de células del pre-trofotodermo es el responsable de la variación en el contenido de GSH.

De todos estos resultados cabe concluir que el blastocisto recupera sus niveles de GSH principalmente a partir de la síntesis de novo del mismo, comprobado con la adición de cisteína al medio de cultivo. La capacidad que mostraron los blastocistos recogidos tardíamente en el día 3 para recuperar los niveles de GSH tras estos tratamientos no apareció, sin embargo, en aquellos recogidos de forma temprana en dicho día (34). Se cree que dicha capacidad se asocia con la expresión de los genes implicados en la síntesis de novo del GSH, es decir, los genes de la γ -glutamylcisteína sintasa y de la GSH sintasa. A partir del día 3 de desarrollo, el blastocisto empieza a expresar las proteínas necesarias para la síntesis de GSH. Las experiencias de estos investigadores con BSO demuestran la dependencia de la recuperación del GSH de los enzimas implicados en su propia síntesis.

La importancia del GSH en el desarrollo embrionario quedó de manifiesto en el trabajo de Shi et al. (35), el cual mostró que los embriones homocigotos de ratón, carentes del gen responsable de la subunidad mayor de la γ -GCS, no lograron superar el desarrollo embrionario y murieron entre el día 7.5 y el

8.5. Sin embargo, en el día 6.5, el desarrollo embrionario era similar al de embriones de ratones normales (controles) y al de los heterocigotos. En los embriones homocigotos (carentes del gen), en el día 7.5, no se detectó GSH mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), mientras que sí se detectó en embriones de fenotipo salvaje. Las anomalías detectadas en estos embriones homocigotos fueron: detención de la gastrulación, fallo en la inducción del mesodermo y una disminución de talla de los embriones mutantes. Al parecer, la mutación provoca una ausencia de GSH en el día 7.5, 4 días después de la esperada síntesis de GSH en el blastocisto. La causa de la mortalidad es un incremento de la apoptosis celular en el embrión, favorecida por un descenso en el contenido de GSH. El porcentaje de GSH en las células mutantes fue de alrededor del 2% del contenido de GSH de las células normales. No obstante, se consiguieron hacer crecer de forma indefinida líneas celulares rescatadas de los embriones mutantes homocigotos en medios libre de GSH y en presencia de N-acetilcisteína, antioxidante derivado de la cisteína. Así pues, parece ser que la acción antioxidante del GSH, más que el propio GSH en sí mismo, es indispensable en un sistema de cultivo. No obstante, en el desarrollo in vivo de los embriones de mamífero, también se necesita la presencia del GSH.

Feugang et al. (36) aplicaron tratamientos con dos agentes responsables de generar estrés oxidativo, el 2,2'-azobis(2-amidinopropano)dihydrochloride (AAPH) y el BSO, para analizar su efecto sobre el desarrollo embrionario bovino desde el día 5 hasta el día 8. Aunque estos tratamientos no parecían afectar los porcentajes y cinéticas de formación de blastocistos, una proporción de blastocistos acababa degenerando en los grupos tratados con AAPH y BSO. A mayor dosis de estos agentes, mayor era el porcentaje de blastocistos degenerados, siendo los blastocistos que iban del quinto al sexto día los más resistentes. El AAPH no pareció afectar significativamente al contenido de GSH de los blastocistos. En cambio, la BSO produjo un importante descenso en dicho contenido.

Los resultados anteriores se explican porque a lo largo de los 3 días de la experiencia se fueron acumulando ROS hasta que aparecieron los primeros daños visibles. Por otra parte, los blastocistos del día 8 son más sensibles al estrés oxidativo. Los blastocistos expandidos tienen un metabolismo más oxidativo, incrementándose la concentración de ROS. Mórulas y blastocistos tempranos son más resistentes. Ambos agentes provocan tensiones en la membrana provocando un incremento de las células que entran en apoptosis, principalmente en la masa celular interna.

No obstante, ambos actúan de forma diferente: el AAPH actúa provocando un aumento de la concentración de ROS, mientras BSO disminuye la concentración de GSH inhibiendo el enzima γ -GCS.

Tratamiento con sustancias antioxidantes

La adición de 1 mM de GSH al medio de cultivo de embriones de ratón de 2 células aumentó el porcentaje de embriones que se desarrollaron hasta el blastocisto, aunque no aumentó significativamente el contenido de GSH intracelular de los blastocistos (6). Esta circunstancia está en consonancia con el hecho que los embriones de ratón en el estadio de mórula no son capaces de incorporar el GSH del fluido del oviducto o del fluido uterino (34).

La proporción de ovocitos de vaca fecundados y que alcanzaron las fases de mórula y blastocisto también se incrementó cuando se suplementó el medio de cultivo con 1 mM GSH (37, 38). Sin embargo, este efecto beneficioso del GSH en el medio de cultivo puede ser variable. Al utilizar semen de 4 toros distintos para fecundación in vitro, suplementando el medio de cultivo de la fecundación in vitro con 1 mM de GSH se obtuvieron efectos beneficiosos sobre el porcentaje de embriones que llegaron al estadio de blastocisto, únicamente en uno de los 4 casos (38). Este resultado pudo ser debido a la distinta producción de ROS en el semen de cada uno de los toros. En embriones de cerdo, también se comprobó que la adición de GSH (0.125 y 0.25 mM) durante la maduración in vitro de los ovocitos y durante la fecundación in vitro mejoró los porcentajes de obtención de blastocistos (39). Aún así, este tratamiento no incrementó el número de células de la masa celular interna, células del trofoctodermo, ni pareció afectar a la concentración intracelular de GSH. No obstante, Wang & Day (40) al suplementar el medio de cultivo de embriones de cerdo con 0.5 mM de GSH observaron un incremento significativo en el número de células del blastocisto, así como el porcentaje de embriones que alcanzaron la fase de blastocisto. Estos mismos investigadores añadieron también al medio de cultivo BSA, además del GSH, logrando incrementar el porcentaje de formación de blastocistos sin incrementar el número de células. Al parecer, el GSH y la BSA tienen efectos sinérgicos sobre el desarrollo embrionario hasta la fase de blastocisto (40).

El GSH presente en secreciones del oviducto de mamíferos podría ayudar a los embriones pre-implantatorios a superar el descenso en el GSH intracelular que acontece tras la fecundación. Sin embargo, dado que el contenido endógeno de GSH de los ovocitos y

de los embriones es elevado no es de extrañar que el GSH exógeno, en el medio de cultivo, solo pueda ejercer un efecto limitado y variable, pudiendo evitar la peroxidación de los lípidos de la membrana inducida por la presencia de ROS extracelulares (4).

Existen diferentes tratamientos que han sido utilizados para incrementar la concentración de GSH en embriones cultivados *in vitro*. Se comprobó que la adición de cisteína (concentraciones comprendidas entre 0.1-0.4 mg/l), precursor biosintético del GSH, al medio de cultivo de ovocitos de cerdo fecundados *in vitro* aumentó la proporción de embriones que alcanzaron la fase de blastocisto, independientemente de las distintas concentraciones de cisteína utilizadas (31).

También, se comprobó que la suplementación del medio de cultivo de ovocitos con cisteína y β -mercaptoetanol en cerdos (31) y vacas (41), con cisteamina en ratones (10), búfalos (17, 18, 42) y vacas (24, 43), y con β -mercaptoetanol en embriones de vaca (28) mejoró el desarrollo embrionario *in vitro* hasta el estadio de blastocisto.

Takahashi et al. (44) demostraron que concentraciones de β -mercaptoetanol y cisteamina, comprendidas entre 10-50 μ M, durante el cultivo de embriones bovinos de 6-8 células, obtenidos a través de maduración y fecundación *in vitro*, aumentaban los niveles totales de GSH (GSH+GSSG) en dichos embriones y mejoraban el porcentaje de los mismos que llegaban al estadio de blastocisto.

El β -mercaptoetanol incrementó la incorporación de cistina marcada tanto en cigotos, embriones de 8 células, mórulas y blastocistos, mientras la presencia de BSO, inhibidor de la síntesis de GSH, disminuyó la toma de cistina marcada (28). La cisteamina también contribuye probablemente a disminuir la cantidad de ROS, favorece la sincronización de la formación del pronúcleo masculino y femenino, además de aumentar la concentración intracelular de GSH y mejorar el desarrollo embrionario (10, 43).

Se evidenció síntesis de GSH intracelular en ovocitos de vaca y búfalo madurados *in vitro* en presencia de cisteamina, β -mercaptoetanol, cisteína y combinaciones de cisteamina y cisteína (45, 17, 18). Estos tratamientos lograron incrementar los porcentajes de blastocistos obtenidos. Sin embargo, en ningún caso, el porcentaje de blastocistos desarrollados *in vitro* alcanzó el porcentaje obtenido utilizando ovocitos madurados *in vivo*, pese a la utilización de dichos compuestos.

Durante el desarrollo embrionario bovino, los niveles más bajos de GSH aparecen en el estadio de 2-8 células. Los niveles más altos de GSH, en cambio,

acontecen cuando se alcanza la fase de blastocisto. La síntesis de novo de GSH en bóvidos empieza en el estadio de 9-16 células, cuando se produce la activación del genoma embrionario (18).

Para tratar de contrarrestar el estrés oxidativo asociado a un envejecimiento post-ovulatorio en ovocitos de ratón se han utilizado distintas sustancias antioxidantes, tales como el ácido ascórbico, EDTA, trolox (análogo hidrosoluble de la vitamina E), L-cistina (precursor de la síntesis de GSH) y los agentes reductores de puentes disulfuro β -mercaptoetanol y ditiotreitól (DTT) (46). Se encontró que concentraciones comprendidas entre 0 y 500 μ M, de ácido ascórbico, EDTA, y trolox no tenían efecto sobre la fragmentación celular y potencial de desarrollo embrionario de los ovocitos. Incluso agentes como el β -mercaptoetanol y la L-cistina tenían efectos negativos sobre el desarrollo embrionario. Sin embargo, el DTT incrementó los porcentajes de fecundación y el número de células a las 81 h de la inseminación *in vitro*, haciendo similares estos valores a los de ovocitos frescos controles, no envejecidos. El DTT también logró prevenir, en parte, la fragmentación asociada al envejecimiento, observada a las 24 h tras la inseminación, así como la reducción del potencial de desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto.

En contraste con los numerosos estudios publicados que analizan el efecto de la suplementación de los medios de cultivo con compuestos antioxidantes en ovocitos y embriones pre-implantatorios de varias especies de mamífero, existe un escaso número de estudios que analizan ovocitos o embriones humanos. Tarín et al. (47) analizaron el efecto de suplementar el medio de cultivo con vitamina C o ascorbato sobre la fecundación *in vitro* y desarrollo embrionario hasta el día 3 post-inseminación. Dicho tratamiento no ejerció ningún efecto beneficioso sobre la fecundación y desarrollo embrionario. Las causas de esta ausencia de efecto positivo de la vitamina C podrían deberse a que el cultivo fue de corta duración. Es decir, hasta el día tercero post-inseminación, momento en el que se produce la activación del genoma embrionario (estadio de 4 a 8 células). Recordemos que durante este proceso, el embrión se enfrenta a un estrés oxidativo como consecuencia de la eliminación del ARNm materno. También, cabe la posibilidad que si se hubiesen utilizado mayores dosis de ascorbato, se hubiera observado un efecto positivo, dado que se empleó una concentración fisiológica de sólo 62.5 μ M de ascorbato.

Toda la información referida anteriormente, tanto de la maduración como de la fecundación de ovocitos, muestra que el contenido de GSH intracelular en

ovocitos se asocia estrechamente con el éxito de la fecundación y posterior desarrollo embrionario hasta la fase de blastocisto, de tal forma, que a mayor concentración intracelular de GSH en el ovocito, mayor porcentaje de embriones alcanzan el estadio de blastocisto tras la fecundación (30, 31). De hecho, se ha observado, en bóvidos, que la inhibición de la síntesis de GSH en embriones de 6-8 células reduce significativamente el desarrollo de estos embriones hasta el estadio de blastocisto (31).

Otras funciones del GSH en el desarrollo embrionario temprano

El incremento de la temperatura es capaz de producir un aumento de ROS que modifican a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (48). Otra de las posibles funciones que podría ejercer el GSH en el embrión es la de actuar limitando los efectos de los ROS generados durante un estrés térmico. De hecho, se constató que las mórulas de ratón expuestas a 40°C durante 1 h toleraron mejor un aumento de la temperatura hasta 43°C. El hecho de que Arechiga et al. (49) evidenciaran que la exposición de mórulas de ratón a una temperatura de 41°C redujese en un 46% el contenido de GSH en dichas mórulas apoyaría esta función protectora del GSH frente a un estrés térmico de los embriones. Arechiga et al. (49) también demostraron que el tratamiento de las mórulas durante 15 h con 100µM S-adenosil-L-metionina (SAM), estimulante de la síntesis de GSH, ayudó a disminuir el efecto perjudicial de la temperatura sobre el desarrollo y supervivencia de los embriones, aumentando la proporción de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto.

La presencia de GSH en el medio de cultivo de embriones bovinos hizo que los embriones incrementasen su resistencia cuando se sometieron a una temperatura de 42°C. por otra parte, la adición de BSO al medio de cultivo de embriones de ratón provocó la disminución de la termotolerancia de mórulas de ratón (48).

Hay que tener en cuenta que los períodos de diferente sensibilidad a la temperatura coinciden con la variación de los niveles de GSH embrionario. El estadio de 2 células (cuando la concentración y capacidad de síntesis de GSH es menor), presenta una mayor sensibilidad frente a aumentos de temperatura que los estadios de blastocisto y post-implantatorios, cuando comienza la síntesis de novo del GSH (48).

El GSH puede ser útil y necesario para una correcta y plena expansión del cúmulus in vitro, la cual juega un papel importante en el desarrollo embrionario

hasta el estadio de blastocisto (50). La glutamina (GLN) mejoró la expansión del cúmulus. Sin embargo, un exceso de la misma puede actuar como inhibidor competitivo de la toma de cisteína por parte de la célula, interfiriendo por tanto en la biosíntesis de GSH. De hecho, se observó que la adición de GLN al medio de cultivo de ovocitos en concentraciones de 1-3 mM no afectó al nivel total de GSH presente en los embriones bovinos (6-8 células) cultivados en dicho medio. No obstante, el exceso de GLN en el medio provocó, en ovocitos y células del cúmulus, una bajada inicial de los niveles de GSH intracelulares (50). Dicho descenso, sin embargo, no pareció afectar al desarrollo embrionario posterior, ya que en el estadio de 6-8 células los embriones habían recuperado los niveles normales de GSH y llegaron a blastocisto en un porcentaje normal.

RESUMEN-CONCLUSIÓN

En esta revisión, hemos mostrado que los ovocitos y los embriones pre-implantatorios sufren un descenso importante de la concentración intracelular de GSH tras la fecundación y la activación del genoma embrionario. Durante estos momentos determinados del desarrollo, los cigotos y embriones son más susceptibles de sufrir un daño oxidativo inducido por factores tales como las condiciones de cultivo utilizadas.

El GSH es el principal agente antioxidante no enzimático presente en el ovocito y el embrión pre-implantatorio y, de ahí, su importancia para asegurar un correcto desarrollo de la maduración, fecundación y desarrollo embrionario en técnicas de fecundación in vitro.

El GSH sintetizado durante la maduración ovocitaria es el único con el que cuenta el ovocito para hacer frente a la fecundación y posterior desarrollo embrionario in Vitro, ya que la síntesis de novo del GSH no acontece hasta que se alcanza el estadio de blastocisto en ratones o la fase de 9-16 células en bóvidos. La resistencia de los distintos estadios embrionarios pre-implantatorios a los procesos oxidativos será diferente a lo largo del desarrollo embrionario, puesto que desde la fecundación hasta que se inicia la síntesis de novo del GSH se produce un descenso del GSH en el embrión, principalmente y como ya hemos reseñado anteriormente como consecuencia de la activación del genoma embrionario.

Los tratamientos con tóxicos causantes de un mayor nivel de oxidación (tBH, DEM, AAPH y BSO) causan una reducción del nivel de GSH intracelular,

así como una disminución en el potencial de desarrollo embrionario pre-implantatorio. Por el contrario, tratamientos con compuestos que estimulan la síntesis de GSH intracelular (cisteína, N-acetilcisteína) o que favorecen un estado más reducido del medio de cultivo (β -mercaptoetanol, cisteamina, DTT, GSH) logran incrementar el desarrollo embrionario pre-implantatorio superando el retraso o bloqueo del desarrollo in vitro.

Hay pocos estudios que utilizan sustancias antioxidantes en medios de cultivo de ovocitos y/o embriones humanos. Por el contrario, la literatura muestra un mayor número de estudios que utilizan tratamientos antioxidantes in vitro de espermatozoides o in vivo (suplementación dietética con antioxidantes orales) en mujeres y hombres con problemas de fertilidad.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido realizado gracias a la ayuda BFI2003-04761 del Ministerio de Ciencia y Tecnología, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER); y la ayuda GV2004-B-206 de la Generalitat Valenciana, Conselleria d'Empresa, Universitat i Ciència.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Harvey MB, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Schultz GA, Watson AJ.**: Expression of genes encoding antioxidant enzymes in pre-implantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture. *Biol Reprod* 1995; 53: 532-540.
2. **De Matos DG, Herrera C, Cortvrindt R, Smitz J, Van Soom A, Nogueira D, Pasqualini RS.**: Cysteamine supplementation during in vitro maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine in vitro embryo production. *Mol Reprod Dev* 2002; 62: 203-209.
3. **Guérin P, El Mouatassim S, Ménéz Y.**: Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 175-189.
4. **Johnson MH, Nasr-Esfahani.**: Radical Solutions and Cultural Problems: Could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of pre-implantation mammalian embryos in vitro? *Bio Essays* 1994; 16: 31-38.
5. **Takahashi M, Keicho K, Takahashi H, Ogawa H, Schultz RM, Okano A.**: Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in vitro cultured bovine embryos by comet assay. *Theriogenology* 2000; 54: 137-145.
6. **Gardiner SC, Reed DJ.**: Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the pre-implantation mouse embryo. *Biol Reprod* 1994; 51: 1307-1314.
7. **Gardiner SC, Reed DJ.**: Glutathione redox cycle-driven recovery of reduced glutathione after oxidation by tertiary-butyl hydroperoxide in pre-implantation mouse embryos. *Arch Biochem Biophys* 1995; 321: 6-12.
8. **Pierce GB, Parchment RE, Lewellyn AL.**: Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. *Differentiation* 1991; 46: 181-186.
9. **Nasr-Esfahani MH, Johnson MH.**: Quantitative analysis of cellular glutathione in early pre-implantation mouse embryos developing in vivo and in vitro. *Hum Reprod* 1992; 7: 1281-1290.
10. **De Matos DG, Nogueira D, Cortvrindt R, Herrera C, Adriaenssens T, Pasqualini RS, Smitz J.**: Capacity of adult and prepubertal mouse oocytes to undergo embryo development in the presence of cysteamine. *Mol Reprod Dev* 2003; 64: 214-218.
11. **Sutovsky P, Schatten G.**: Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. *Biol Reprod* 1997; 56: 1503-1512.
12. **Luberda Z.**: The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol* 2005; 5: 5-17.
13. **Zuelke KA, Jones DP, Perreault SD.**: Glutathione oxidation is associated with altered microtubule function and disrupted fertilization in mature hamster oocytes. *Biol Reprod* 1997; 57: 1413-1419.
14. **Tarín JJ, Cano A.**: Distribution of 5-chloromethylfluorescein diacetate staining during meiotic maturation and fertilization in vitro of mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1998; 114: 211-18.
15. **Zuelke KA, Jeffay SC, Zucker RM, Perreault SD.**: Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. *Mol Reprod Dev* 2003; 64: 106-12.
16. **Brad AM, Bormann CL, Swain JE, Durkin RE, Johnson AE, Clifford AL, Krisher RL.**: Glutathione and adenosine triphosphate content of in vivo and in vitro matured porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2003; 64: 492-498.
17. **Gasparrini B, Boccia L, Marchandise J, Di Palo R, George F, Donnay I, Zicarelli L.**: Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology* 2006 ;65: 275-287.

18. **Gasparrini B, Sayoud H, Neglia G, De Matos DG, Donnay I, Zicarelli L.:** Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. *Theriogenology* 2003; 60: 943-952.
19. **Oyamada T, Fukui Y.:** Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J Reprod Dev* 2004; 50: 107-17.
20. **De Matos DG, Furnus CC.:** The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 2000; 53: 761-771.
21. **Urdaneta A, Jimenez AR, Paramio MT, Izquierdo D.:** Cysteamine, glutathione and ionomycin treatments improve in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote* 2004; 12: 277-84.
22. **Mayor P, López-Béjar M, Rodríguez-González E, Paramio MT.:** Effects of the addition of glutathione during maturation on in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote* 2001; 9: 323-330.
23. **Rodríguez-González E, Lopez-Bejar M, Mertens MJ, Paramio MT.:** Effects on in vitro embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. *Mol Reprod Dev* 200; 65: 446-453.
24. **De Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini SR, Thompson JG.:** Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* 2002; 57: 1443-1451.
25. **Kim MK, Fibrianto YH, Oh HJ, Jang G, Kim HJ, Lee KS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS.:** Effect of β -mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on in vitro maturation of canine oocytes collected from dogs with different stages of the estrus cycle. *J Vet Sci* 2004; 5: 253-258.
26. **Grupen CG, Nagashima H, Nottle MB.:** Cysteamine enhances in vitro development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Biol Reprod* 1995; 53: 173-178.
27. **Whitaker BD, Knight JW.:** Exogenous γ -glutamyl cycle compounds supplemented to in vitro maturation medium influence in vitro fertilization, culture, and viability parameters of porcine oocytes and embryos. *Theriogenology* 2004; 62: 311-322.
28. **Takahashi M, Naqgai T, Okamura N, Takahashi H, Okano A.:** Promoting effect of β -mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. *Biol Reprod* 2002; 66: 562-567.
29. **Luciano Am, Lodde V, Beretta MS, Colleoni S, Lauria A, Modina S.:** Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glutathione. *Mol Reprod Dev* 2005; 71: 389-397.
30. **Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Day BN.:** Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular glutathione. *Biol Reprod* 1998; 58: 213-218.
31. **Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN.:** Glutathione content and embryo development after in vitro fertilisation of pig oocytes matured in the presence of a thiol compound and various concentrations of cysteine. *Zygote* 1999; 7: 203-210.
32. **Funahashi H, Machaty Z, Prather RS, Day BN.:** γ -glutamyl transpeptidase of spermatozoa may decrease oocyte glutathione content at fertilization in pigs. *Mol Reprod Dev* 1996; 45: 485-490.
33. **Funahashi H, Bandoh N, Nakahira S, Oh SH, Tsuboi S.:** Changes in intracellular content of glutathione and thiols associated with γ -glutamyl cycle during sperm penetration and pronuclear formation in rat oocytes. *Zygote* 1999; 7: 301-305.
34. **Gardiner SC, Reed DJ.:** Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. *Arch Biochem Biophys* 1995; 318: 30-36.
35. **Shi ZZ, Osei-Frimpong J, Kala G, Kala SV, Barrios RJ, Habib GM, Lukin DJ, Danney CM, Matzuk MM, Lieberman MW.:** Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 5101-5106.
36. **Feugang JM, Van Langendonck A, Sayoud H, Rees JF, Pampfer S, Moens A, Dessy F, Donnay I.:** Effect of prooxidant agents added at the morula/blastocyst stage on bovine embryo development, cell death and glutathione content. *Zygote* 2003; 11: 107-118.
37. **Luvoni CG, Keskinetepe L, Brackett BG.:** Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. *Mol Reprod Dev* 1996; 43: 437-443.
38. **Kim IH, Van Langendonck A, Van Soom A, Vanroose G, Casi Al, Hendriksen PJM, Bevers MM.:** Effects of exogenous glutathione on the in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1999; 52: 537-547.
39. **Boquest AC, Abeydeera LR, Wang WH, Day BN.:** Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos in vitro. *Theriogenology* 1999; 51: 1311-1319.
40. **Wang WH, Day BN.:** Development of porcine embryos produced by IVM/IVF in a medium with or without protein supplementation: effects of extracellular glutathione. *Zygote* 2002; 10: 109-115.
41. **Hamano S, Kuwayama M, Takahashi M, Okamura**

- N, Okano A, Nagai T.:** Effect of β -mercaptoethanol on the pre-implantation development of bovine embryos fertilized in vitro. *J Reprod Dev* 1994; 40: 355-359.
42. **Gasparrini B, Neglia G, Di Palo R, Campanile G, Zicarelli L.:** Effect of cysteamine during in vitro maturation on buffalo embryo development. *Theriogenology* 2000; 54: 1537-1542.
43. **De Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Baldassarre H.:** Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. *Mol Reprod Dev* 1995; 42: 432-436.
44. **Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N, Okano A.:** Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol Reprod* 1993; 49: 228-232.
45. **De Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martínez AG, Matkovic M.:** Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev* 1996; 45: 451-457.
46. **Tarín JJ, Ten J, Vendrell FJ, Cano A.:** Dithiothreitol prevents age-associated decrease in oocyte/conceptus viability in vitro. *Hum Reprod* 1998; 13: 381-386.
47. **Tarín JJ, de los Santos MJ, de Oliveira MNM, Pellicer A, Bonilla-Musoles F.:** Ascorbate-supplemented media in short-term cultures of human embryos. *Hum Reprod* 1994; 9: 1717-1722.
48. **Edwards JL, King WA, Kawarsky SJ, Ealy AD.:** Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. *Theriogenology* 2001; 55: 209-223.
49. **Arechiga CF, Ealy AD, Hansen PJ.:** Evidence that glutathione is involved in thermo-tolerance of pre-implantation murine embryos. *Biol Reprod* 1995; 52: 1296-1301.
50. **Furnus CC, De Matos DG, Moses DF.:** Cumulus expansion during in vitro maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 76-83.