



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

**PARTICIPACION DE LA CICLINA B  
EN LA MADURACION DE OVOCITOS DE  
CERDO IN VITRO**

Tesis que para obtener el Grado de Maestro en Biología Experimental

Presenta:

**BIOL. EDUARDO CASAS HERNANDEZ**

México, D.F.

Enero de 1996

---

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la Dirección del Dr. Miguel Betancourt Rule, del Laboratorio de Biología Celular de la UAM Iztapalapa, y la Dra. Raquel Trejo Albarrán, de la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, y con la Asesoría del M. en C. Edmundo Bonilla González, del Laboratorio de Biología Celular, UAM Iztapalapa. A todos ellos un profundo agradecimiento por su atención y dedicación constantes, fundamentales para la realización de este trabajo.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo financiero proporcionado por la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa por medio de una Beca para Estudios de Posgrado, y por CONACyT, a través de la beca número 83673

---

Preferiría comprender una sola causa, que ser Rey de Persia.

Demócrito de Abdera  
Filósofo griego, 460 - 370 a. C.

Mi trabajo consiste en enseñar a mis aspiraciones a acomodarse a la realidad, no intentar hacer que los hechos armonicen con mis aspiraciones...Sentaos ante los hechos como un niño pequeño, estad preparados para abandonar cualquier idea preconcebida; id humildemente donde quiera y a cualesquiera abismos a los que os guíe la Naturaleza o no aprenderéis nada.

Thomas Henry Huxley  
Naturalista Inglés, 1825 - 1895

...entonces conocerán la Verdad, y la Verdad los hará libres.

Juan 8:32

---

Para Ana y Rebeca Zoe,  
por quienes la Vida adquiere un  
sentido muy especial.

---

## Agradecimientos

A toda mi familia, pero en especial a mis padres que me enseñaron el camino del trabajo cotidiano y constante.

A todos mis compañeros del Lab. de Biología Celular: Miguel, Mundo, Cristina, Rocío, Yvonne, Irma, Reyna, Edith, Leonor, Héctor, Leticia, por su amistad y cooperación incondicionales.

A todos mis amigos, maestros, alumnos, y a todas aquellas personas que a lo largo de la Vida me han enseñado, aún sin darse cuenta, todo lo que me hace sentir una persona íntegra.

---

## RESUMEN

### **PARTICIPACION DE LA CICLINA B EN LA MADURACION DE OVOCITOS DE CERDO IN VITRO**

Los ovocitos de los mamíferos quedan detenidos en la profase de la primera división meiótica durante la gestación. El reinicio de la meiosis ocurre después de la pubertad y es desencadenado antes de la ovulación por señales hormonales que actúan sobre las células foliculares que rodean al ovocito y lo inducen al avance de la meiosis hasta la metafase II. En este proceso de maduración actúa de manera fundamental un complejo protéico conocido como Factor Promotor de la Maduración (FPM), que puede ser "transplantado" de ovocitos en maduración a ovocitos inmaduros, e inducir en éstos el reinicio de la meiosis. El FPM está constituido por una cinasa, p34<sup>cdc2</sup>, cuyos niveles permanecen constantes a lo largo del ciclo celular, y una proteína reguladora, ciclina B, cuya concentración es variable, alcanza su máximo durante la división celular y modula de este modo los niveles de actividad del factor. El FPM produce la fosforilación directa o indirecta de diversas proteínas relacionadas con la división celular y su participación en la maduración del ovocito ha sido ampliamente estudiada en almejas, estrellas de mar y anfibios, mientras que en los mamíferos su caracterización se limita a algunas especies de roedores y bovinos, y a células somáticas humanas. Restan por aclarar muchos puntos acerca de la participación de sus componentes durante el proceso de maduración de ovocitos de mamífero. En este trabajo se muestra la participación de la ciclina B en la maduración in vitro de ovocitos de cerdo.

Para madurar, los ovocitos extraídos de ovarios de cerdas recién sacrificadas se colocaron en medio 199 suplementado con FSH, LH y estradiol por 24 o 48 h. La maduración, medida por el rompimiento de la vesícula germinal, se detectó a las 36 h en el 30% de los ovocitos, por lo que se considera que a las 24 h los ovocitos son inmaduros, mientras que a las 48 h se presenta un alto porcentaje de ovocitos maduros. Por medio de la técnica de Dot Blot, empleando un

---

anticuerpo anti-ciclina B humana que reconoce una secuencia altamente conservada en todas las especies estudiadas a la fecha, se detectó una proteína homóloga a la ciclina B en extractos crudos de ovocitos de cerdo. La concentración de esta proteína parece aumentar entre las 24 y 48 h de maduración. Durante el proceso de maduración in vitro del ovocito, se observó un cambio en la localización intracelular de la ciclina. En los ovocitos inmaduros a las 24 h, la señal inmunofluorescente se detectó de forma difusa en todo el citoplasma, mientras que en los maduros, después de las 48 h, la inmunofluorescencia se encontró asociada exclusivamente a la cromatina, ya sea en forma de vesícula germinal o de cromosomas metafásicos condensados. Los cambios de localización que presenta esta proteína son semejantes a los reportados para las células somáticas en división de otras especies. Estos cambios podrían dar como resultado una fosforilación diferencial de los sustratos del FPM y pueden estar asociados a los fenómenos que ocurren durante la maduración in vitro de los ovocitos de cerdo.

---

## Abreviaturas empleadas

AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
CAK	cinasa activadora de cinasa
CDK	cinasa dependiente de ciclina
fase M	fase de división en el ciclo celular
FPM	Factor promotor de la maduración o de la fase M
FSH	Hormona estimulante de los folículos
G2	fase G2 del ciclo celular
kDa	kilodaltones
LH	Hormona Luteinizante
MAP cinasas	cinasas de proteínas activadas por mitógenos
PBS	solución salina amortiguada con fosfatos
PCNA	antígeno nuclear de proliferación celular
PKA	cinasa de proteínas, dependiente de AMPc
RVG	Rompimiento de la vesícula germinal
TBS	solución salina amortiguada con Tris
Tris	Tris (hidroximetil)-amino-metano
VG	Vesícula Germinal

---

# INDICE

	página
I. INTRODUCCION	1
1. Ovogénesis y maduración de ovocitos	1
1.1 Ovogénesis en mamíferos	1
1.2 Las células foliculares y su papel durante la gametogénesis	3
1.3 Efecto hormonal sobre la maduración del ovocito	3
1.4 Señales negativas que mantienen la detención en la primera profase meiótica.	4
1.5 Señales positivas para la inducción de la maduración	5
2. Factor Promotor de la Maduración o de la Fase M (FPM)	6
2.1 Función del FPM en el ciclo celular	6
2.2 Participación del FPM durante la división meiótica	7
2.3 Regulación de la actividad de FPM	9
2.4 Sustratos de FPM	12
2.5 Otras cinasas semejantes a p34 <sup>cdc2</sup>	13
2.6 Otras ciclinas que participan en el ciclo celular	13
2.6.1 Ciclinas mitóticas	15
2.6.2 Ciclinas de G1	15
II. JUSTIFICACION	17
III. HIPOTESIS	17
IV. OBJETIVOS	18
1. Objetivo General	18
1.1 Objetivos Particulares	18
V. MATERIAL Y METODO	
1. Reactivos y Materiales	19
2. Colecta de ovocitos y maduración in vitro	19
3. Análisis de la maduración	20
4. Cuantificación de la ciclina B	20
4.1 Preparación de extractos de ovocitos	20
4.2 Dot Blot	20

---

5. Localización intracelular de la ciclina B	21
5.1 Inmunocitoquímica	21
5.2 Solución de paraformaldehído	22
<b>VI. RESULTADOS</b>	<b>23</b>
1. Colecta y cultivo de ovocitos	23
2. Maduración in vitro	23
3. Cuantificación de la ciclina B durante la maduración in vitro	26
4. Localización intracelular de la ciclina B durante la maduración in vitro	27
<b>VII. DISCUSION</b>	<b>30</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>36</b>

---

# **I INTRODUCCION**

## **1. Ovogénesis y maduración de ovocitos.**

### **1.1 Ovogénesis en mamíferos.**

La gametogénesis en los mamíferos presenta características particulares según la especie y se produce por una combinación de divisiones mitóticas y meióticas (Wassarman y Albertini, 1994). En las primeras el número cromosómico diploide característico de la especie es mantenido, mientras que a través de la meiosis este número es reducido a la mitad para producir los gametos con un número cromosómico haploide.

En el caso de las hembras, las ovogonias ( $2n$ ) se producen a partir de las células germinales primordiales durante las primeras etapas del desarrollo embrionario y posteriormente inician la proliferación mitótica para convertirse en ovocitos primarios. En este punto se inicia la primera división meiótica y, en la mayoría de los mamíferos, ésta queda detenida en la profase I, en el estadio de diploteno, durante todo el período fetal y hasta que la hembra alcanza la pubertad. En este largo período en profase I el núcleo del ovocito es conocido como vesícula germinal (VG) y sus cromosomas en estado de diploteno difuso pueden inducir una transcripción activa que permite que los ovocitos primarios acumulen macromoléculas que requerirán durante su desarrollo posterior. En este lapso el crecimiento del ovocito depende de que sean mantenidas las uniones comunicantes entre el ovocito y las células somáticas acompañantes, las células de la granulosa o foliculares. Diversos estudios indican que éstas son también las responsables de mantener la detención del ovocito en la etapa de profase I (Jung et al, 1992; Eppig et al, 1993; Salustri et al, 1993).

Al inicio de la pubertad, la liberación de hormona estimulante de los folículos (FSH) induce la maduración de algunos de los folículos que contienen a los ovocitos primarios. Al término del crecimiento folicular, la ovulación se produce por la acción de la hormona luteinizante (LH) sobre las células accesorias, que por mecanismos parcialmente conocidos, liberan al ovocito de la detención en profase I y le permiten continuar a través del resto de la meiosis, hasta alcanzar la metafase II sin una interfase intermedia. El avance del ovocito desde el estado de diploteno I hasta la metafase de la segunda división meiótica se conoce como maduración meiótica y se caracteriza por el rompimiento de la vesícula germinal (RVG), la condensación de la cromatina en

---

cromosomas bivalentes, la segregación de los cromosomas homólogos y la formación del primer cuerpo polar. Después de esto la meiosis queda detenida nuevamente con los cromosomas alineados en el huso de la segunda metafase (Hunter, 1991; Phillips y Dryden, 1991; Eppig, 1993; Yazigi et al, 1993).

En el curso de este proceso de maduración ocurren también los procesos citoplásmicos esenciales para la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Sirard et al, 1989; Shalgi y Dekel, 1990; Van de Sandt et al, 1990). Al término de la maduración se produce la ovulación y sólo la unión con el espermatozoide desencadena el proceso de activación metabólica del ovocito que conduce a la terminación de la segunda división meiótica con la expulsión del segundo cuerpo polar (Mc Gaughey, 1978; Iritani, 1991)(Figura 1).

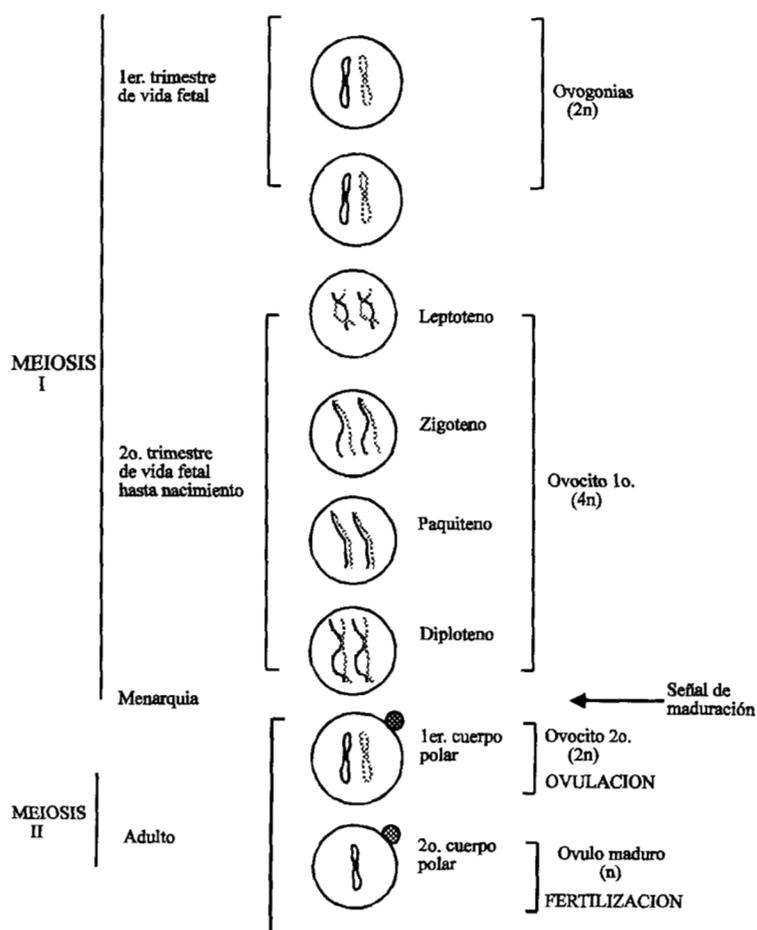


Figura 1. Proceso de división meiótica en ovocitos de mamífero.

## **1.2 Las células foliculares y su papel durante la gametogénesis.**

Los folículos primordiales de los ovarios de los mamíferos están constituidos por un ovocito detenido en la profase de la primera división meiótica y una capa aplanada de células de la granulosa en contacto íntimo con el primero (Salustri et al, 1993). Entre ambos tipos de células se establecen conexiones especializadas, las uniones comunicantes, por medio de proyecciones citoplásmicas de las células foliculares hacia el ovocito. Al final del período de crecimiento folicular el ovocito detiene su crecimiento y permanece rodeado de células de la granulosa asociadas muy de cerca a él, conocidas a partir de este momento como células cúmulo, formando el complejo ovocito-células cúmulo (Eppig, 1991).

El contacto físico y la comunicación intercelular entre las células germinales y somáticas en este complejo parecen ser necesarias para la supervivencia del ovocito y su desarrollo, ya que a través de las uniones comunicantes se transfieren sustancias de bajo peso molecular, principalmente nutrientes, como el piruvato y precursores metabólicos, como aminoácidos y nucleótidos, que además de permitirle crecer, en un momento dado le permiten concluir con la primera división meiótica y adquirir la capacidad para ser fertilizado exitosamente después de la ovulación (De Loos et al, 1991). Después de que se produce una subida en los niveles de LH, la señal hormonal que induce la ovulación, las uniones intercelulares se interrumpen por la producción de ácido hialurónico por parte de las células cúmulo que ocasiona una dispersión de ellas en una matriz viscosa. Aparentemente el ovocito es responsable de secretar un factor que induce la expansión de las células cúmulo (Eppig et al, 1993b).

Después de que las uniones se han roto, las células foliculares permanecen retenidas alrededor del ovocito durante el período preovulatorio y hasta después de la ovulación, lo que permite que factores que difunden desde ellas hasta el ovocito induzcan las etapas finales de la maduración, además de facilitar la captura del complejo ovocito-células cúmulo por parte de las fimbrias del oviducto y la penetración del ovocito durante la fertilización( Hunter, 1991).

## **1.3 Efecto hormonal sobre la maduración del ovocito.**

En estudios *in vitro* se ha logrado la maduración de ovocitos mediante el empleo de distintos medios de cultivo suplementados con suero o adicionados de hormonas, principalmente LH, FSH y estradiol (Lindner et al,

1983; Funahashi y Day, 1993a,b). Los ovocitos completan la primera división meiótica y quedan detenidos en metafase II, a semejanza de lo que ocurre con el desarrollo del ovocito in vivo, indicando que estas hormonas pueden ser las responsables de la señal de maduración de los ovocitos primarios. Sin embargo el ovocito carece de receptores para estas hormonas, por lo que su mecanismo de acción debe estar mediado por las células foliculares que rodean al ovocito (Chian et al, 1992).

El incremento preovulatorio de LH induce el RVG in vivo, mientras que en cultivo lo hace sólo con folículos intactos, por lo que es probable que la LH induzca el RVG por un mecanismo indirecto mediado por las células de la granulosa. En anfibios la maduración es inducida por la progesterona secretada por las células foliculares circundantes, en respuesta a la acción de la LH sobre ellas (Smith, 1989; Minshull, 1993; Stephano, 1993). En los mamíferos la maduración ocurre aparentemente por el dismantelamiento de las uniones comunicantes entre ovocito y células de la granulosa, que interrumpe el flujo de las sustancias responsables de la detención de la meiosis (Oda et al, 1990; Sirard y Bilodeau, 1990).

En el caso de la FSH, además de su participación en el crecimiento folicular in vivo, esta hormona estimula a las células de la granulosa a producir y secretar ácido hialurónico que dispersa a las células cúmulo que circundan al ovocito, además de que se ha demostrado que es indispensable para la maduración citoplásmica del mismo (Vanderhyden, 1993).

Aunque se conoce poco acerca de los requerimientos de estradiol para la maduración in vitro de ovocitos de mamífero, ciertos estudios apuntan en el sentido de que algunos de ellos (estradiol y 17- $\alpha$  OH progesterona) parecen promover la maduración citoplásmica y el desarrollo normal del pronúcleo masculino (Lindner et al 1983).

#### **1.4 Señales negativas que mantienen la detención en la primera profase meiótica.**

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar la detención de la profase I. Los ovocitos de mamífero, a diferencia de los ovocitos de equinodermos y anfibios, tienen la capacidad de madurar espontáneamente cuando son liberados de los folículos y cultivados in vitro, por lo que se propone a las células foliculares como las responsables de esta detención, a través de la producción y liberación de moléculas específicas tales como AMPc o purinas como adenina e hipoxantina (Lindner et al, 1983; Eppig, 1993; Törnell

y Hillensjö, 1993). Las señales inhibitorias provenientes de las células de la granulosa pueden ser transmitidas al ovocito a través del fluido folicular (ratón) o por las uniones comunicantes (rata) (Sirard y Bilodeau, 1990).

En el caso del AMPc se postula que niveles altos de él, suministrado principalmente por las células foliculares, permiten mantener la detención del ovocito en la profase I y que sólo es liberado de este efecto inhibitorio cuando se interrumpe la comunicación a través de las uniones comunicantes y los niveles de AMPc disminuyen. Esta disminución inactiva a la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) y a través de una cascada de eventos desconocida, esta inactivación de la PKA permite a su vez la activación de una fosfatasa que defosforila al Factor Promotor de la Maduración (FPM) (Goren y Dekel, 1994). Sin embargo en algunas especies (criceto y oveja) no se ha detectado la disminución de los niveles de AMPc que preceden al RVG (Jung et al, 1992), y en el caso específico de conejo y cerdo se ha mostrado que existe un incremento asociado a la maduración, que en este último parece actuar como una señal positiva para la maduración (Mattioli et al, 1994).

En el modelo propuesto para explicar la detención de la profase I por la acción de las purinas se postula que la adenosina estimula a la adenilato ciclasa del ovocito a través de un receptor en la membrana de éste, y que la hipoxantina transferida desde las células de la granulosa por las uniones comunicantes previene la hidrólisis del AMPc, ya que inhibe a la AMPc-fosfodiesterasa, y mantiene los niveles del nucleótido cíclico que mantienen la detención de la meiosis (Downs, 1993; Eppig, 1993).

### 1.5 Señales positivas para la inducción de la maduración.

222875

Algunos estudios proponen la producción de una señal positiva de inducción de RVG, en particular como respuesta a LH, más que por la sola interrupción de la comunicación intercelular (Salustri et al, 1993). La señal inductora no ha sido reconocida aún, pero algunos trabajos apuntan a la participación de los iones  $Ca^{+2}$  en este fenómeno (Homa et al, 1993; Carroll et al, 1994). El calcio actuaría por medio de una vía dependiente de calmodulina activando a la AMPc fosfodiesterasa y disminuyendo la concentración de AMPc por debajo de los niveles necesarios para mantener la detención de la meiosis I e iniciar la cascada de eventos que finalmente conducen al RVG (Guerrier, 1992; Eppig, 1993).

En ovocitos de *Xenopus* se propone también la participación de la proteína cinasa C en la inducción de la maduración de los ovocitos, regulando negativamente a una fosfoproteína inhibidora de la meiosis (Smith,

1989). Esta cinasa se activa por la acción de diacilglicerol, como segundo mensajero producido en respuesta a la acción de progesterona en la membrana del ovocito.

Recientemente se ha caracterizado a un esteroide (C29), purificado a partir de líquido folicular, que activa la meiosis in vitro en ratones, aún en ovocitos detenidos por hipoxantina y que se propone como la señal positiva que activa el reinicio de la meiosis (Byskov et al, 1995). Sin embargo se desconoce el posible mecanismo de acción de este factor.

## **2. Factor Promotor de la Maduración o de la Fase M (FPM)**

La liberación del ovocito de la detención de la primera división meiótica ha sido estudiado en especies tan diversas como anfibios, estrellas y erizos de mar, almejas y distintos mamíferos, e independientemente del sistema de señalización que inicia el RVG, la maduración de los ovocitos requiere de la activación de un complejo proteico heterodimérico conocido como factor promotor de la fase M o mitosis (FPM)(Nurse, 1990; Kirschner, 1992). El FPM, descrito originalmente en ovocitos de anfibios, es un complejo proteico ampliamente conservado desde el punto de vista evolutivo, ya que se han encontrado formas muy similares de él desde levaduras hasta humanos, tanto en células germinales como somáticas (Maller et al, 1989). En ovocitos de mamífero se ha determinado su presencia en distintas especies, entre ellas bovinos (Abeydeera et al, 1993), ratón (Sorensen et al, 1985), cerdo (Mattioli et al, 1991) y cabra (De Smedt et al, 1994).

### **2.1 Función del FPM en el ciclo celular.**

El FPM es un complejo de dos componentes. El primero es una proteína de 34 kDa, producto del gen *cdc2* de *Schizosaccharomyces pombe* y del gen *CDC28* de *Saccharomyces cerevisiae*, por lo que es conocida como  $p34^{cdc2}$  y tiene actividad de cinasa de serina/treonina, exhibiendo una marcada preferencia por la histona H1 como sustrato. Es una proteína altamente conservada en los eucariontes, y en todas las especies de protozoarios, plantas y animales analizadas a la fecha se han encontrado genes homólogos de ella. Estudios posteriores han mostrado que  $p34^{cdc2}$  pertenece a una gran familia de cinasas dependientes de ciclinas o CDK's, encargadas de fosforilar sustratos específicos en distintos momentos del ciclo celular (Nigg, 1995).

El segundo componente es la ciclina B, proteína con un peso molecular de 45 kDa y que tiene un patrón de síntesis y degradación periódico: se sintetiza durante la interfase, es degradada al final de la mitosis y se resintetiza durante la siguiente interfase, actuando como subunidad reguladora de la actividad del FPM (Minshull, 1993). Se propone que se debe acumular una cantidad de ciclina B más allá de cierto umbral para que la célula entre en mitosis nuevamente (King et al, 1994).

Al inicio de la mitosis, el complejo se acumula principalmente en el núcleo y en los centrosomas. En el núcleo es capaz de fosforilar a la histona H1, láminas nucleares, nucleolinas y ARN polimerasa, mientras que en el centrosoma lo hace con proteínas participantes en la polimerización de microtúbulos. La fosforilación de todas estas proteínas inicia los cambios que ocurren en la mitosis y que se sabe que son inducidos por FPM. Entre éstos se pueden mencionar cambios en la dinámica de los microtúbulos, incluyendo la formación del huso mitótico, la condensación de los cromosomas, la inhibición de la fusión de vesículas y la desintegración de la envoltura nuclear y del sistema de endomembranas (Haas y Jost, 1993; Keryer et al, 1993; Moreno, 1992; Norbury y Nurse, 1992).

Aparentemente la división celular está asociada a una oscilación acoplada de la actividad de FPM y la concentración de la ciclina B. En un sistema libre de células de ovocitos de *Xenopus* que reproduce los eventos del ciclo celular, se ha mostrado que la síntesis de ciclina B es suficiente para llevar al inicio de la mitosis, mientras que su degradación es requerida para salir de esta fase del ciclo celular (Murray y Kirschner, 1991).

## **2.2 Participación del FPM durante la división meiótica.**

El papel fundamental del FPM es desencadenar la transición de las células desde G<sub>2</sub> hacia M en el ciclo celular, pero como los cambios cíclicos en la activación del FPM son cruciales en la regulación del ciclo mitótico ordinario en las células somáticas, es muy probable que la maduración de los ovocitos involucre cambios cíclicos similares en la actividad del FPM. En la profase de la meiosis I, el DNA se ha replicado y es transcrito activamente, la cubierta nuclear está intacta y el huso mitótico no se ha formado, por lo que se asemeja notablemente a la fase G<sub>2</sub> de un ciclo de división mitótica ordinario (Van de Sandt et al, 1990).

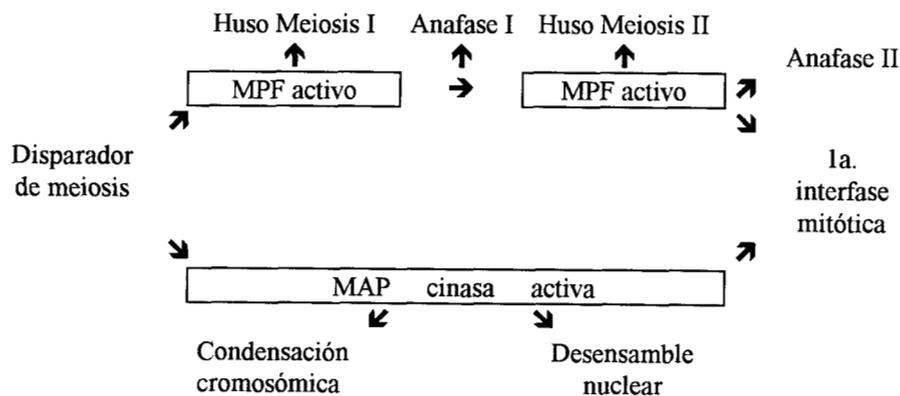
Los ovocitos de ratón en fase de VG no tienen una actividad detectable de FPM, pero ésta se incrementa al tiempo del RVG y alcanza su máximo en el estadio de metafase I. La actividad vuelve a disminuir

al momento de la emisión del segundo cuerpo polar y alcanza un nivel alto de nuevo en la metafase II (Draetta y Beach, 1989; Eppig, 1993).

Al final de la primera división meiótica la actividad del FPM decae, pero los cromosomas no se descondensan, ni los microtúbulos se rearreglan ni el núcleo se reforma, por lo que se sugiere la participación de otra cinasa diferente del FPM para este evento. Los candidatos más viables para ello son las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas), que son capaces de fosforilar a sustratos semejantes a los del FPM, y que previenen que el ovocito entre en una interfase entre la meiosis I y II (Murray y Hunt, 1993; Chesnel y Eppig, 1995) (figura 2). Como estas cinasas son activadas después de la activación de p34<sup>cdc2</sup> se propone que se encuentren colocadas por debajo del FPM en la cascada de cinasas responsables de la división celular, además de la posibilidad de que a semejanza de lo que ocurre con los anfibios, en los mamíferos una señal común sea capaz de activar a ambos tipos de cinasas de forma paralela (Dekel, 1995).

Al término del rearreglo celular que produce la mitosis (citoesqueleto, condensación de cromosomas, etc.), el MPF activa el sistema de degradación de la ciclina B (King et al, 1994). El ovocito en este momento ya ha sufrido la desaparición de la vesícula germinal y la expulsión del primer cuerpo polar, signos que indican una maduración nuclear de la célula gamética (Rose y Bavister, 1992).

**Figura 2.** Modelo para la participación de diversas cinasas durante la meiosis. Se impide el retorno de la célula a la interfase por la participación sincronizada de MAP cinasa y MPF. (Tomado de Murray y Hunt, 1993).



### 2.3 Regulación de la actividad de FPM.

El componente directamente responsable de la activación del FPM no ha sido identificado, pero algunos estudios sugieren una participación, directa o indirecta, del producto del oncogen c-mos: p39<sup>mos</sup>, una proteína citosólica soluble con actividad de cinasa de serina y treonina (Paules et al, 1989).

Por otro lado, tanto la subunidad catalítica como la reguladora del FPM, sufren una serie de reacciones de fosforilación/defosforilación que determinan el estado de actividad de éste. En el caso de la ciclina se desconoce aún la función que juega la fosforilación, pero en el caso de la cinasa se han establecido con claridad los sitios susceptibles de fosforilación y el papel que desempeñan en la activación de la cinasa. Se han determinado los sitios de fosforilación que controlan la actividad de la cinasa tanto positiva como negativamente, y en algunas otras de las CDK's se han encontrado residuos correspondientes a éstos. El ejemplo mejor caracterizado de la regulación de las CDK's por mecanismos de fosforilación-defosforilación, es el FPM. La regulación de la actividad catalítica de la p34<sup>cdc2</sup> está dada por cambios en el estado de fosforilación de los residuos de treonina 14 (T14), tirosina 15 (Y15) y treonina 161 (T161) (Doree et al, 1989; Norbury y Nurse, 1992; O'Connor et al, 1993). La fosforilación de los residuos T14 y Y15, en el sitio de unión del ATP, regula negativamente la actividad de la cinasa, ya que es necesaria su remoción al inicio de la transición G2/M para obtener la actividad catalítica (Sebastian et al, 1993). Los productos del gen de levadura *wee1* o *mik1*, y sus homólogos en los mamíferos que también actúan como cinasas de tirosina, fosforilan el sitio Y 15 para ejercer el efecto inhibitorio sobre la p34<sup>cdc2</sup>, mientras que se desconoce hasta el momento la responsable de fosforilar a T14. Para la activación del FPM se requiere de la fosfatasa dual *cdc25* que remueve a los fosfatos de T14 y Y15 previamente a la transición de G2/M. Las actividades tanto de *cdc25* como de *wee1/mik1* están reguladas a su vez por mecanismos de fosforilación. (Clarke et al, 1993; Millar y Russell, 1992; Wu y Russell, 1993). Por otro lado, la fosforilación de la T161, localizada en un sitio que controla el acceso de los sustratos al sitio catalítico, probablemente regula la unión de p34<sup>cdc2</sup> con la ciclina B y al término de la anafase es defosforilada (Nurse, 1990). (figura 3).

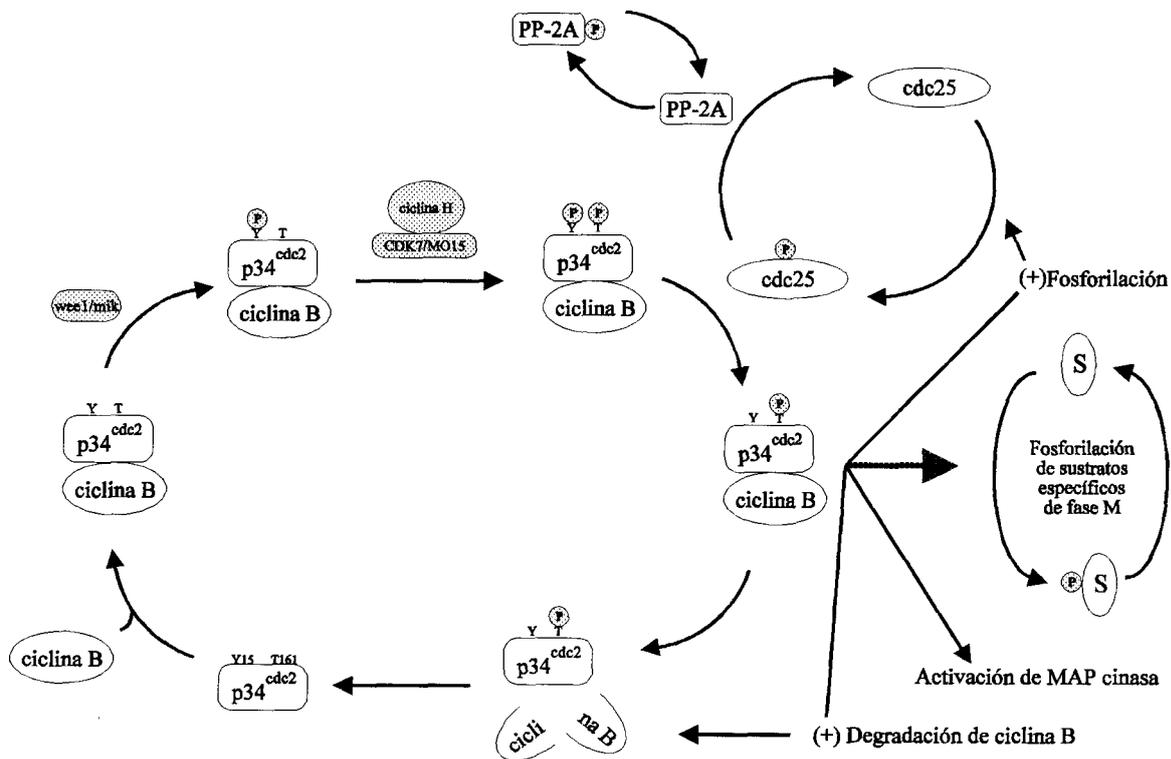


Figura 3. Mecanismo de regulación del FPM durante la división celular. Se observa como distintos eventos de fosforilación-defosforilación regulan la actividad del complejo p34-ciclina B. Cuando éste se encuentra fosforilado en la Thr161 se vuelve activo y es capaz de fosforilar a distintos sustratos que participan en la división celular.

La fosforilación de este residuo, T161, es llevada a cabo por una cinasa activadora de cinasa (CAK). Esta tiene como subunidad catalítica a una cinasa originalmente denominada MO15, que al determinarse que guarda estrecha relación con la familia de las CDK's se rebautizó como CDK7. La CAK humana presenta dos subunidades más, una de las cuales corresponde a la ciclina H con un peso de 36kDa y con cierta semejanza con la ciclina C. Los complejos ciclina E-CDK2 y ciclina D-CDK4 se fosforilan también en una Treonina por acción de la CAK MO15/CDK7-cycH (Sherr, 1994).

Además de que la actividad del FPM está regulada por un mecanismo de fosforilación-defosforilación, se ha observado también que el disparo de su actividad requiere de la síntesis de ciclina (Sebastian et al, 1993). También se ha observado que la activación de p34<sup>cdc2</sup> es inducida también por la traslocación al núcleo de la ciclina B (Nurse, 1990).

Algunos trabajos muestran que se requiere de la degradación de la ciclina para la inactivación del FPM y la salida de la mitosis (King et al, 1994). Aparentemente la degradación de la ciclina al término de la mitosis ocurre por el sistema de la ubiquitina (Sherwood et al, 1993). Aunque aún se desconocen los mecanismos que regulan esta rápida degradación existen dos posibilidades. La primera de ellas implicaría que una ligasa de ubiquitina específica de ciclina fuera activada súbitamente en la mitosis, mientras que en la segunda la ciclina sería convertida a una forma susceptible a la acción de la ubiquitina ligasa constitutivamente activa (Hershko y Ciechanover, 1992; Sherwood et al, 1993).

En años recientes se han descrito una serie de proteínas que funcionan como represores de la actividad de los complejos de CDK/ciclinas ya sea por el bloqueo de la interacción del complejo con sus sustratos o con la CAK, aunque también se han descrito otras funciones fisiológicas para estos inhibidores. Así por ejemplo p21, un inhibidor que se puede unir a diferentes complejos CDK/ciclina, se encuentra también como una proteína finamente regulada en las células senescentes o un producto génico inducido por el conocido supresor de tumores p53. También puede interactuar con la subunidad  $\delta$  de la DNA polimerasa e inhibir la replicación del DNA (Nigg, 1995) (cuadro 1). Estos inhibidores generalmente se encuentran ausentes en las células transformadas, por lo que se cree que pueden actuar como supresores de tumores (Hunter y Pines, 1994).

**Cuadro 1.** Inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas (CDK's).  
(Modificado de Nigg, 1995)

<u>Inhibidor<sup>a</sup></u>	<u>CDK blanco</u>	<u>Papel fisiológico<sup>b</sup></u>
p21	Diferentes CDK's	Gen responsivo a p53; diferenciación terminal
p16	CDK4/6	Transición G1/S
p15	CDK4/6	Respuesta a TGF- $\beta$
p27	CDK2	Respuesta a TGF- $\beta$ ; inhibición por contacto

<sup>a</sup>La mayoría de los inhibidores han recibido nombres múltiples. Los nombres alternativos son: para p21: CIP1, WAF1, CAP20 y SDI1; para p16: INK4, MTS1 y CDK4I; para p15: INK4B y MTS2; para p27: KIP1.

<sup>b</sup>No se ha establecido el total de las funciones para la mayoría de los inhibidores.

222875

## 2.4 Sustratos de FPM.

Los complejos CDK/ciclina actúan sobre residuos de Serina o Treonina seguidos de un residuo de Prolina, y de acuerdo con la combinación de CDK o ciclina presentan distintas especificidades de sustrato. Se conoce poco acerca de los verdaderos blancos fisiológicos del FPM, pero se han realizado diversos estudios que identifican a una serie de sustratos que pueden ser fosforilados in vitro (cuadro 2)(Murray y Hunt, 1993). Algunos de ellos presentan cierta relevancia fisiológica durante la transición G<sub>2</sub>/M lo que los hace candidatos viables a ser fosforilados in vivo por FPM durante dicha transición (cuadro 3)(Moreno y Nurse, 1990; Nigg, 1995).

**Cuadro 2.** Sustratos fosforilados por MPF in vitro. Se presentan las secuencias consenso que contienen una Ser o Treonina seguida de una Pro, acompañadas de cerca por aminoácidos básicos (Modificado de Murray y Hunt, 1993).

<u>Proteína</u>	<u>Secuencia fosforilada</u>
Lámina nuclear	PLSPTR...SPSPTS
Histona H1	SPKK, TPAK, TPKK
Receptor de lámina B1	TPEK
pp60 <sup>c-scr</sup>	QTPNKT, RTPSRS, SSPQRA
nucleolina	TPAK, TPGK, SPKK
Antígeno T de SV40	TPPKK
RNA polimerasa	YTPTSPSY
Cadena ligera de miosina	RATSNVF
Rab-4	SPRR
Ciclina A	ASPMVV
Ciclina B	PSPVPM

**Cuadro 3.** Sustratos posibles del FPM durante la transición G<sub>2</sub>/M y la fase M (Modificado de Moreno y Nurse, 1990 y Nigg, 1995).

1. Componentes de cromatina	Histona H1; HMG I, Y, P1; Nucleolina
2. Proteínas nucleolares	Nucleolina, No38
3. Proteínas de citoesqueleto	Láminas nucleares, vimentina, cadena reguladora ligera de la miosina, caldesmon
4. Proteínas asociadas a microtúbulos	MAP4/MAP1B
5. Proteínas motoras	CENP-E
6. Factores de transcripción y traducción	SWI, c-myb, Subunidades de EF-1
7. Cinasas y fosfatasa de proteínas	p60 <sup>src</sup> , CK II ( $\alpha$ y $\beta$ ), CDC25, PTP1B
8. Proteínas G y sus reguladores	Rab1Ap/Rab4Ap, Rap1GAP
9. Proteínas diversas	Antígeno t medio del polioma, Estatmina

## 2.5 Otras cinasas semejantes a p34<sup>cdc2</sup>.

El paso de una célula a través de las distintas fases del ciclo celular es debida a la activación sucesiva y secuencial de diferentes CDK's, que son controladas por la asociación transitoria con subunidades reguladoras de ciclina, péptidos inhibitorios o por reacciones reversibles de fosforilación. El complejo ciclina-CDK fosforila a un grupo único de sustratos que son esenciales en un evento determinado del ciclo celular (Heichman y Roberts, 1994). Los primeros miembros reconocidos de esta familia de cinasas están codificados por los genes homólogos a *cdc2* de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* con un peso de 34 kDa (también conocido como CDK1). En los organismos multicelulares esta cinasa es la subunidad catalítica del factor inductor de la fase M o FPM, y se han identificado subsecuentemente una serie de CDK's que participan en la regulación del ciclo celular (revisado en Nigg, 1995, Cuadro 4) Las subunidades reguladoras positivas de las cinasas, las ciclinas, constituyen una familia numerosa y creciente, y aunque originalmente se les llamó así por su patrón característico de síntesis y destrucción dependiente del ciclo celular, algunas de las que se han identificado más recientemente se expresan continuamente a niveles constantes y se les incluye en esta familia en base a criterios funcionales y estructurales. (Watson et al, 1992; Minshull, 1993) (cuadro 5).

Tanto las ciclinas como los CDK's pueden experimentar cambios de localización intracelular a lo largo del ciclo de vida de la célula, que les permiten regular la activación del complejo y determinar la especificidad de los sustratos que se han de fosforilar en cierto evento del ciclo (Inagaki et al, 1994).

## 2.6 Otras ciclinas que participan en el ciclo celular.

Las ciclinas son proteínas que actúan como subunidades reguladoras de proteína cinasas, como p34<sup>cdc2</sup> o CDK's, y que en combinación con ellas regulan la transición en puntos críticos del ciclo celular (Guerrier, 1992; Moreno, 1992). La síntesis y degradación programadas de las ciclinas permiten la activación de las cinasas en una secuencia temporal apropiada y se supone que pueden ser también responsables de impartir la especificidad de cada una de las cinasas por sus sustratos particulares, mediante una localización intracelular específica de las ciclinas en distintos momentos del ciclo celular (Norbury y Nurse, 1992; Connel-Crowley et al, 1993; Sebastian, 1993).

**Cuadro 4.** Cinasas dependientes de ciclina presentes en vertebrados y levaduras.  
(Modificado de Nigg, 1995)

Cinasa	Subunidad(es) reguladoras	Función
<b>Vertebrados</b>		
CDC2(=CDK1)	Ciclinas A, B1, B2, B3	Transición G <sub>2</sub> /M
CDK2	Ciclinas A, E, D1, (D2,D3?)	Transición G <sub>2</sub> /M y fase S
CDK3	?	Transición G <sub>1</sub> /S
CDK4	Ciclinas D1, (D2?), D3	Transiciones G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> y (G <sub>1</sub> /S?)
CDK5	p35 <sup>a</sup> , ciclinas D1, (D2?), D3	Fosforilación de neurofilamentos <sup>b</sup>
CDK6	Ciclinas D1, (D2, D3?)	Transiciones G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> y (G <sub>1</sub> /S?)
CDK7	Ciclina H, p36 <sup>c</sup>	Requerida para la activación de CDK 1-6
<b>Levaduras</b>		
CDC28 ( <i>S. cerevisiae</i> )	CLN1-3, CLB1-6	Distintas transiciones en el ciclo celular
PHO85 ( <i>S. cerevisiae</i> )	PHO80, PCL 1 (HCS26), PCL2 (ORFD)	Control nutricional de G <sub>1</sub> (?)
<i>cdc2</i> ( <i>S. pombe</i> )	<i>cdc13</i> , <i>cig1,2</i> , ( <i>puc1</i> , <i>cyc17</i> ?)	Distintas transiciones en el ciclo celular

<sup>a</sup>p35 es un activador específico de CDK5 en el cerebro; su estructura primaria no muestra similitudes con las ciclinas.

<sup>b</sup>No se ha demostrado la participación de CDK5 en el control del ciclo celular, sin embargo, se ha visto que esta cinasa fosforila a los neurofilamentos en las neuronas postmitóticas.

<sup>c</sup>La estructura primaria de p36 no muestra similitudes con ninguna de las ciclinas.

**Cuadro 5.** Ciclinas descritas en vertebrados.  
(Tomado de Nigg, 1995)

Nombre	Actúa en fase:	CDK compañera	Niveles de expresión <sup>b</sup>	Localización intracelular
A	S y G <sub>2</sub> /M	CDC2/CDK2	Máximo en G <sub>2</sub> /M <sup>c</sup>	Nuclear
B1	G <sub>2</sub> /M	CDC2	Máximo en G <sub>2</sub> /M <sup>c</sup>	Citoplásmica <sup>d</sup>
B2	G <sub>2</sub> /M	CDC2	Máximo en G <sub>2</sub> /M <sup>c</sup>	Citoplásmica <sup>d</sup>
B3 <sup>a</sup>	G <sub>2</sub> /M (y S?)	CDC2/CDK2	Máximo en G <sub>2</sub> /M <sup>c</sup>	Nuclear
C	?	?	?	?
D1	G <sub>1</sub>	CDK4/6 y CDK2/5 <sup>e</sup>	Principalmente en G <sub>1</sub>	Nuclear
D2	G <sub>1</sub>	?	?	Nuclear (?)
D3	G <sub>1</sub>	CDK4/6	Constante	Nuclear
E	?G <sub>1</sub> /S	CDK2	Máximo en G <sub>2</sub> /M	Nuclear
F	?	?	Máximo en G <sub>2</sub> /M	Nuclear/citoplásmica
G	?	?	?	?
H	Distintas fases	CDK7	?	?

<sup>a</sup>La ciclina B3 ha sido descrita sólo en aves.

<sup>b</sup>Determinado por cantidad de proteína.

<sup>c</sup>La ciclina A aparece un poco antes que las ciclinas B1/B2/B3; también desaparece antes que ellas en la mitosis.

<sup>d</sup>Algunas ciclinas de tipo B se traslocan al núcleo al inicio de la mitosis.

<sup>e</sup>Las CDK4 y 6 parecen ser las principales parejas de la ciclina D.

### 2.6.1 Ciclinas mitóticas.

Las ciclinas mitóticas, A y B, regulan la transición G<sub>2</sub>/M y la fase M y presentan en el extremo N terminal la secuencia reconocida para la ubiquitinación (**RTALGDIGN** para cycB1, y **RTVLGVIGD** para cycA), la caja de destrucción, que se activa al término de la división celular y que es requerida para la ubiquitinación de la ciclina (King et al, 1994; Murray y Hunt, 1993).

La ciclina A es requerida para el inicio de la mitosis, la transición G<sub>2</sub>/M y para conducir el avance en la fase S y se puede asociar tanto con cdc2 como con cdk2 (con CDK2 en fase S). Por otro lado, el complejo cdk2/ciclina A parece jugar un papel importante también en la transformación oncogénica por virus tumorales de DNA (Sherr, 1993). Se localiza en los sitios de replicación de DNA en la fase S (Inagaki et al, 1994).

La ciclina B fue descubierta por primera vez en ovocitos de erizo de mar fertilizados, como una proteína que era sintetizada durante la interfase, y después degradada subitamente al final de la metafase (Draetta y Beach, 1989). Originalmente se describieron las ciclinas B1 y B2 en células somáticas humanas, pero recientemente se ha descrito una ciclina denominada B3 con un patrón de expresión semejante al de la ciclina B2 pero que parece compartir funciones con las ciclinas A y B (Gallant y Nigg, 1994), ya que se localiza en el núcleo a lo largo del ciclo celular, y parece ser capaz de asociarse con p34<sup>cdc2</sup> y p33<sup>cdk2</sup> in vivo. El complejo ciclina B-cdc2 inhibe la expresión de las ciclinas de G1 y el ensamble de los complejos de inicio de replicación.

### 2.6.2. Ciclinas de G1.

Se han identificado tres tipos de ciclinas, C, D y E, que regulan la transición de G1 a S en las células de mamífero, por lo que se conocen como ciclinas de G1 (Sherr, 1993).

La ciclina C fue originalmente descrita en levaduras, y sus niveles oscilan mínimamente a lo largo del ciclo, con un ligero incremento al inicio de G1. Se desconoce a ciencia cierta su participación durante el ciclo celular.

La ciclina D se encuentra sobreexpresada en ciertos tumores, lo que sugiere que se trate de un oncogén. Su participación precisa en el ciclo celular no se conoce, pero el hecho de que se asocia con diferentes cdk's, antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y otras proteínas sugieren diversas funciones para ella (Buchou et al, 1993). La expresión de esta ciclina es inducida durante la fase G1 del ciclo en respuesta a factores

de crecimiento específicos (Palmero et al, 1993) y se propone que pudiera actuar como sensor a dichos factores (Hunter y Pines, 1994; Sherr, 1993). Esta ciclina tiene una vida media corta, de aproximadamente 30 min. Se han descrito tres subclases de ciclina D: D1, D2 y D3 que se asocian con CDK4 o CDK6.

La ciclina E forma un complejo con la cinasa cdk2 y tiene una actividad máxima durante la transición G1/S, en la que es importante en el inicio de la replicación del DNA (Hunter y Pines, 1994), y que declina a medida que progresa la fase S (Connell-Crowley et al, 1993). La ciclina E se asocia con CDK2 en la fase G1 tardía.

La sobreexpresión de las ciclinas D y E se asocia con una disminución en la duración de G1 y del ciclo celular total, y con la reducción de la dependencia de antígenos (Sherr, 1994).

Los experimentos en levaduras y ovocitos de *Xenopus*, en los que se ha descrito a profundidad la participación del complejo p34<sup>cdc2</sup>-ciclina B en el control de la fase M, proveen un elegante marco de referencia para el estudio del ciclo celular. Además, la mayoría de los componentes de la maquinaria reguladora del ciclo celular se ha conservado ampliamente a lo largo de la evolución lo que permite el intercambio de sus componentes entre las distintas especies y la información recopilada hasta el momento acerca de las funciones de los complejos CDDK/ciclina proviene de organismos tan diversos como levaduras, almejas, erizos, embriones de mosca, anfibios y cultivos celulares de mamífero (Murray y Hunt, 1993). Sin embargo no es posible hablar en forma genérica de la regulación del ciclo celular, por lo que se debe tener muy presente que los mecanismos individuales que lo regulan, dependen no sólo del organismo bajo estudio, sino también del estado de desarrollo de una célula dentro de un organismo dado, por lo que no resulta claro que estas conclusiones puedan extrapolarse por completo a todos los organismos.

## **II. JUSTIFICACION**

Se han reportado múltiples estudios en relación con la actividad del FPM durante la maduración de ovocitos de especies tan diversas como erizos y estrellas de mar y anfibios, principalmente *Xenopus*. En estos animales se ha observado que los cambios de actividad se relacionan con modificaciones intracelulares del complejo, ya sea por reacciones de fosforilación-defosforilación o por traslocaciones específicas entre diferentes compartimentos celulares. Sin embargo en los ovocitos de mamífero estos estudios se ven seriamente limitados por la falta de disponibilidad de un modelo animal que permita contar con un número suficiente de ovocitos que puedan ser estudiados a lo largo del proceso de maduración. En roedores, bovinos y cerdos se ha podido determinar la presencia de este factor a través de la medición de la actividad de histona H1, sin embargo no se han realizado estudios para determinar la localización intracelular de los componentes del FPM. En células somáticas de mamífero se ha demostrado que se presentan cambios de localización asociados a las distintas fases del ciclo celular y se propone que éstos puedan jugar un papel importante tanto en la activación como en la determinación de los sustratos sobre los que ha de actuar. En el presente trabajo se pretende montar un sistema experimental que permita la cuantificación de uno de los componentes del FPM, la ciclina B, así como también la localización intracelular de esta proteína durante el proceso de maduración in vitro.

## **III. HIPOTESIS**

Se ha demostrado la participación del FPM en la maduración de ovocitos de distintas especies, y ya que este factor esta compuesto de dos subunidades, la síntesis o localización de ellos en distintos tiempos del ciclo celular determinaría la activación del FPM y por lo tanto del reinicio de la meiosis. En los ovocitos de cerdo se han detectado cambios en la actividad del FPM coincidentes con las distintas etapas de maduración in vitro, por lo que es posible que se presenten cambios de localización o concentración de la ciclina B, la subunidad reguladora del FPM, durante la maduración in vitro

## **IV. OBJETIVOS**

### **1. Objetivo General.**

Determinar la participación de la ciclina B durante la maduración in vitro de ovocitos de cerdo, atendiendo a los cambios de localización o concentración que se presenten durante este proceso.

#### **1.1 Objetivos Particulares.**

- A) Optimizar la técnica de maduración de ovocitos de cerdo in vitro.
  
- B) Determinar la presencia de ciclina B en distintas etapas de la maduración del ovocito in vitro entre 0 y 48 horas, por métodos inmunocitoquímicos.
  
- C) Cuantificación de los niveles de ciclina B en ovocitos de cerdo durante su maduración in vitro.

## **V. MATERIAL Y METODO**

### **1. Reactivos y Materiales.**

El medio de cultivo 199 (sin bicarbonato) se compró de Microlab, México. Para suplementar el medio de cultivo se empleó Yectamicina (Schering, Méx.) con una concentración de 1 mg/ml de gentamicina, y Pergonal (Laboratorios Serono, Méx.) en presentación de 10 000 U/ml de FSH y LH. El estradiol y el suero de caballo de la línea Hybrimax se adquirieron de Sigma Chem., St. Louis, Mo. El anticuerpo primario empleado fue un anticuerpo monoclonal producido en ratón y dirigido contra ciclina B1 humana, de la casa Pharmingen, California, EU. El anticuerpo secundario fue un anticuerpo policlonal desarrollado en cabra, dirigido contra IgG de ratón y conjugado con isotiocianato de fluoresceína de la compañía Sigma Chem. El material de cultivo empleado (cajas de Petri, tubos de centrifuga y cajas de cultivo de 4 pozos) se adquirieron de la compañía Nunc (Dinamarca). El Tritón X-100, Tween-20, Tris-HCl, cloronaftol y el HEPES se obtuvieron de Sigma Chem. El resto de los reactivos empleados fueron de grado reactivo de la casa J. T. Baker, México.

### **2. Colecta de ovocitos y maduración in vitro.**

Para el cultivo y maduración in vitro de un gran número de ovocitos de cerdo, se emplearon las técnicas descritas por Yoshida et al (1990) y Betancourt et al (1993) con algunas modificaciones. Los ovarios se colectaron de cerdos hembra recién sacrificadas en el rastro y se transportaron al laboratorio en NaCl 0.9% a 35 °C aproximadamente. Los ovarios se lavaron tres veces con solución salina y se extrajeron los ovocitos con líquido folicular de folículos de 2-5 mm de diámetro, empleando una jeringa estéril. Se dejó sedimentar en un tubo de centrifuga durante 15 min. Se recuperaron los ovocitos y se lavaron dos veces con medio de maduración (Medio 199 suplementado con suero de caballo 10%, Glucosa 1 mg/ml, piruvato de sodio 0.25 mM, LH 2UI/ml, FSH 2UI/ml, Gentamicina 10µg/ml, estradiol 1 µg/ml; pH 7.4, 280-290 mOsm). Se seleccionaron sólo aquellos ovocitos que presentaron una masa compacta de células cúmulo.

Los ovocitos seleccionados se transfirieron a una microgota de 500 µl de medio de maduración contenida en una caja de cultivo de 4 pozos . Se colocaron 20 o más ovocitos por pozo. Se cultivaron por 48 h a 37°C con

humedad a saturación y 5% de CO<sub>2</sub>. Al término de este período la mayoría de los ovocitos mostraron una clara expansión en la capa de células cúmulo.

### **3. Análisis de la maduración.**

Se aplicó la técnica de Tarkowski (1966) modificada. Los ovocitos se colectaron del medio de maduración y se lavaron en una solución salina, haciéndolos pasar a través de una pipeta Pasteur adelgazada para desprender completamente las células cúmulo. Se incubaron con solución hipotónica (citrato de sodio 0.75%) durante 3 a 4 minutos. Se retiró completamente la sol. hipotónica e inmediatamente se agregaron 3 gotas de fijador de Carnoy (metanol - ác. acético, 3:1). Se dejó evaporar a sequedad y se tiñeron con orceína acética al 2% durante 5 min. Los ovocitos inmaduros se reconocen por la presencia de la vesícula germinal mientras que los maduros presentan cromosomas metafásicos, de la primera o segunda metafase meiótica, y en ocasiones el primer cuerpo polar.

### **4. Cuantificación de la ciclina B.**

#### **4.1 Preparación de extracto de ovocitos.**

Se realizó un extracto crudo de ovocitos de cerdo empleando la técnica de Sorensen et al (1985) con algunas modificaciones. Al término del período de maduración, los ovocitos se lavaron con solución salina (NaCl 0.9%) para retirar por completo las células foliculares. Se colocaron de 100 a 400 ovocitos en un tubo capilar sellado por uno de sus extremos con 5 µl de PBS y se congelaron a -70 °C al menos por 48 h. Se centrifugaron a 5600 x g durante 5 min. Se resuspendieron las células dentro del capilar y se centrifugaron por 10 min a 5600 x g. Se colectó el sobrenadante y se empleó como extracto crudo de proteínas totales de ovocito para Dot Blot.

#### **4.2. Dot Blot.**

Para la cuantificación de la ciclina B en los extractos de ovocitos se empleó una técnica de inmunotransferencia desarrollada por Hawkes et al (1982). Se sumergió un papel de nitrocelulosa en agua destilada por 2 a 5 min, hasta que se mojó completamente. Se dejó secar a temperatura ambiente y se colocó el

extracto de ovocitos obtenido por el método descrito previamente. Se dejó secar al aire y el papel de nitrocelulosa se bloqueó con una solución de leche en polvo al 5% en solución amortiguadora TBS (Tris 10mM, NaCl 0.9%; pH 7.4) durante toda la noche, manteniendo en agitación suave. Se retiró la solución bloqueadora y se incubó por una noche con una solución de anticuerpo primario en dilución 1:500 en TBS con 0.1% de Tween 20 y leche al 1%. Posteriormente se lavó con TBS-Tween 20 durante media hora haciendo 4 o 5 cambios. Se incubó por 2 h con una solución de anticuerpo secundario diluido 1:500 en TBS-Tween 20 con leche al 1%. Se repitió el lavado con TBS-Tween 20 y se reveló con una solución fresca de cloronaftol- $H_2O_2$  hasta la aparición de manchas de color violeta oscuro. Se enjuagó con agua corriente y se dejó secar al aire. Para la preparación de la solución de revelado se disolvieron 60 mg de cloronaftol en 20 ml de metanol absoluto, se agregaron 100 ml de TBS y se mezcló perfectamente. Al final se agregaron 200  $\mu$ l de una solución comercial (aprox. 30%) de  $H_2O_2$ .

## **5. Localización intracelular de la ciclina B.**

### **5.1. Inmunocitoquímica.**

Para la detección intracelular de la ciclina B se adaptó la técnica descrita por Sherwood et al (1993) y Kung et al (1993) para células somáticas. Los ovocitos se lavaron en solución salina, haciéndolos pasar a través de una pipeta Pasteur de punta fina, para retirar las células foliculares. Se fijaron en paraformaldehído al 2% a 4°C durante 2 horas. Se lavaron 2 veces con solución salina y se permeabilizaron con una solución de Tritón X-100 0.9%, HEPES 1 mM, NaCl 150 mM, suero 4% (pH 7.4) por 10 min. a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente y se incubaron con 30  $\mu$ l de anticuerpo primario, anti-ciclina B1 humana, en dilución 1:30 por 2 horas a 37 °C. Los controles negativos se incubaron con una solución salina con suero al 4%. Se repitió el lavado con solución salina y se incubaron con 30  $\mu$ l de anticuerpo secundario, en dilución 1:500 por 30 min. a 37°C. Finalmente se lavaron dos veces con solución salina, y se montaron con una gota de glicerol-PBS (9:1) y se sellaron con barniz de uñas. Se revisaron bajo el microsocopio de fluorescencia.

222875

## **5.2. Solución de paraformaldehído.**

Ya que los ovocitos de cerdo no pueden ser preparados adecuadamente con los fijadores comunes para inmunofluorescencia (ver resultados), se describe la técnica empleada para la preparación de la solución de paraformaldehído. Se disolvieron 4 g de paraformaldehído en 85 ml de PBS (pH 7.3), calentando a 70 °C con agitación. Se agregaron 5 ml de  $\text{CaCl}_2$  0.001M frío y se filtró en papel Whatman #1, y al final se agregaron 10 ml más de PBS. La solución es estable por 1 a 2 semanas a 4 °C y debe ser diluída el día de uso a la concentración requerida con PBS.

## **VI. RESULTADOS.**

### **1. Colecta y cultivo de ovocitos.**

Los ovocitos empleados en el presente trabajo se obtuvieron puncionando los folículos de ovarios de cerdas que habían sido sacrificadas no más de 2 horas antes. Se escogieron aquellos folículos con un tamaño que fluctuó entre 3 y 5 mm de diámetro, ya que aquellos con un tamaño menor contenían ovocitos muy pequeños que indicaban que no se había alcanzado el máximo crecimiento folicular. Por otro lado los folículos mayores del tamaño mencionado se descartaron para evitar la posibilidad de que se encontraran a punto de la ovulación, y que por lo tanto los ovocitos estuvieran estimulados previamente para madurar por efecto de la elevación de los niveles de LH in vivo.

Después de lavarse en medio de maduración se seleccionó sólo a aquellos ovocitos que presentaron una capa compacta de células foliculares de al menos 3 células de grosor, y que además presentaban un tamaño cercano o igual a 120  $\mu\text{m}$ , que corresponde al máximo que puede alcanzar un ovocito durante el desarrollo folicular.

Durante los ensayos preliminares para el montaje de la técnica de maduración in vitro se obtuvo un número promedio de 4 a 5 ovocitos por ovario, pero posteriormente éste se incrementó hasta obtener un promedio de 10 ovocitos de buena calidad por cada ovario empleado.

Durante una sesión de trabajo normal de alrededor de 3 horas se puncionaban entre 35 y 40 ovarios, llegando a obtener un máximo de 500 ovocitos.

De acuerdo al número total de ovocitos obtenido, se colocaron de 30 a 40 de ellos en 500  $\mu\text{l}$  de medio de maduración recién suplementado. En algunos experimentos se colocaron hasta 50 ovocitos por pozo, sin que se vieran alterados los porcentajes de maduración.

### **2. Maduración in vitro.**

Después de 30 horas o más de cultivo se observó una expansión de las células cúmulo que se desprendieron con mayor dificultad por la presencia de una matriz gelatinosa en la que se encontraban embebidas. La expansión puede ser considerada como un indicio de la maduración in vitro del ovocito; sin

embargo el fenómeno no se presentó en todos los caso, y aún en ovocitos que no mostraron la expansión se pudo determinar que habían madurado por medio de la técnica de tinción, por lo que no hay correlación directa entre el grado de expansión y el estado de maduración.

El estado de maduración de los ovocitos se evaluó por medio de la tinción con orceína acética. Aquellos en los que se observó la VG intacta fueron considerados como inmaduros, mientras que en los que se observaron cromosomas metafásicos, independientemente de que se tratara de la metafase I o II, se consideraron como maduros (Figura 4).

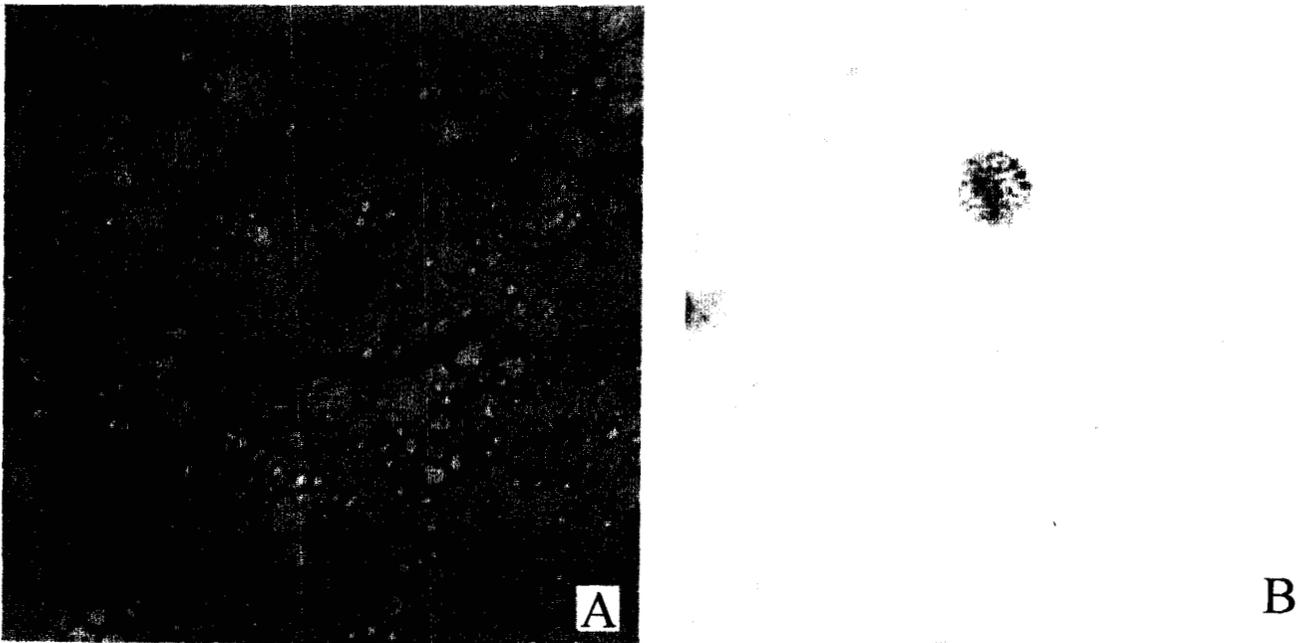


Figura 4. Análisis de la maduración por tinción con orceína acética. A) En los ovocitos inmaduros se observa la presencia de la vesícula germinal (1000X). B) en los ovocitos maduros se nota la condensación de la cromatina en cromosomas metafásicos (1000X).

Con esta metodología se determinó la cinética de maduración tomando muestras de ovocitos a diferentes tiempos de cultivo entre 0 y 72 horas. Originalmente las muestras se tomaron cada 24 horas entre las 0 y las 72, pero al observar que el inicio de la maduración ocurría antes de las 48 horas, se decidió tomar muestras a intervalos más cortos entre las 24 y las 48 horas, con el objeto de determinar el tiempo preciso de inicio de la maduración. En la Figura 5 se muestra el compendio de los resultados obtenidos. Con esto se pudo determinar que antes de las 30 horas la mayoría de los ovocitos se encontraron inmaduros, mientras que a las 36 horas ya se observa un porcentaje importante de ovocitos maduros (25%), para alcanzar el máximo (60%) a las 72 horas. Con este resultado se determinó considerar a los ovocitos con 24 horas de cultivo como inmaduros y a los de 48 horas como maduros para el resto de los experimentos.

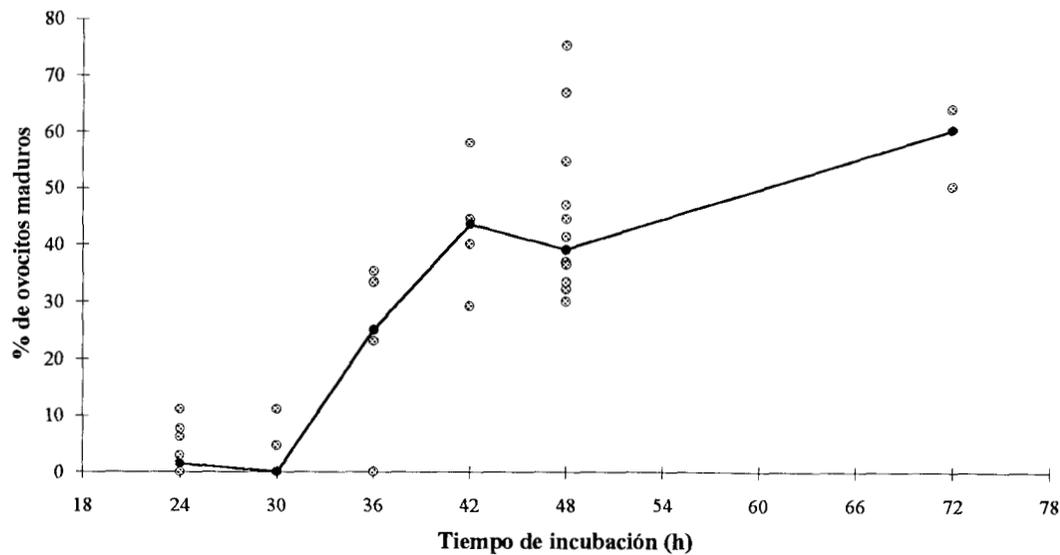


Figura 5. Porcentaje de maduración de ovocitos durante la maduración in vitro. Se consideró como inmaduros a aquellos que presentaron vesícula germinal y maduros a aquellos con cromosomas metafásicos. Los círculos oscuros representan los valores de la mediana obtenido para cada tiempo, y los círculos claros la dispersión de los datos obtenidos en todos los experimentos.

### **3. Cuantificación de la ciclina B durante la maduración in vitro.**

Para detectar la presencia de la ciclina B y cuantificarla por los métodos de inmunocitoquímica y "Dot Blot" respectivamente, en el presente trabajo se empleó un anticuerpo monoclonal comercial que reconoce un epítotope localizado entre los aminoácidos 1 a 21 de la ciclina B1 humana de 62 kDa de peso molecular, y es capaz de reconocer las ciclinas B homólogas de rata y ratón.

Previo a su uso, se hizo un ensayo en el que se determinó la capacidad de este anticuerpo para reconocer a la proteína homóloga en las células de cerdo por medio de "Dot Blot" empleando un extracto de ovocitos, recién obtenidos, y ciclina B humana recombinante como control. El resultado de este ensayo fue positivo, por lo que este anticuerpo fue empleado en el resto de los experimentos.

Para hacer una estimación de la cantidad de ciclina B presente en los ovocitos durante la maduración, se realizó un extracto crudo utilizando dos lotes de 350 ovocitos c/u, con 24 y 48 horas de cultivo respectivamente. Los extractos obtenidos se colocaron en papel de nitrocelulosa y se realizó la técnica de Dot Blot ya descrita. En ambos extractos se detectó la presencia de la ciclina B, y se puede notar un ligero aumento en el extracto de 48 horas en comparación con el de las 24 horas (Figura 6).

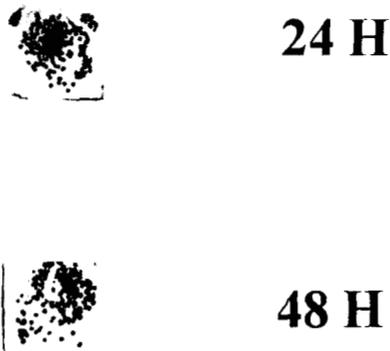


Figura 6. Dot Blot de extractos de ovocitos de cerdo a distintos tiempos de maduración. En cada tiempo se tiene el extracto correspondiente a 350 ovocitos y se observa un ligero aumento en la concentración en los ovocitos maduros (48 h) en comparación con los maduros (24 h).

#### **4. Localización intracelular de la ciclina B durante la maduración in vitro.**

Para realizar los estudios de localización intracelular de la ciclina B por el método de inmunofluorescencia se ensayaron distintos métodos de fijación, comenzando por los más comunmente empleados: formol, etanol, glutaraldehído, pero con todos ellos se pudo observar una intensa fluorescencia aún en los ovocitos control sin anticuerpo específico. Esto se debió a una marca fluorescente inespecífica producida por el proceso de fijación, por lo que posteriormente se ensayó con el fijador de Carnoy (metanol - ácido acético) y con paraformaldehído al 2%. Con el primero de éstos se obtuvo una fluorescencia inespecífica mínima, mientras que en el segundo esta señal no se observó de manera significativa, por lo que se tomó al paraformaldehído como fijador de elección.

Se intentó hacer una contratinción empleando el colorante fluorescente bisbenzimidida (Hoescht 33342), específico para DNA. Sin embargo éste fluoresce en una longitud de onda semejante a la que lo hace la fluoresceína por los filtros del microscopio de fluorescencia empleados para el análisis de las muestras, y por lo tanto no se pudo discernir entre la marca de Hoescht y fluoresceína; por esta razón no se empleó la contratinción. Sin embargo, las estructuras teñidas tanto por orceína como con anticuerpo fluorescente resultaron en todos los casos ser muy semejantes y al comparar los porcentajes de ovocitos maduros evaluados con orceína contra los porcentajes de aquellos que presentaban la marca fluorescente, ambos coincidieron en su totalidad.

Empleando el anticuerpo monoclonal específico para ciclina B1 humana se determinó la ubicación de esta proteína durante el proceso de maduración in vitro de los ovocitos de cerdo. En los ovocitos recién colectados, a las cero horas de cultivo, se observó una marca fluorescente dispersa en todo el citoplasma entre los glóbulos de lípidos de reserva de la célula, sin que notara asociación específica de esta proteína con la vesícula germinal o con alguna estructura intracelular (Figura 7A y 7B).

En los ovocitos inmaduros con 24 horas de cultivo desaparece la marca previamente localizada en el citoplasma y se observa la fluorescencia concentrada en el sitio correspondiente a la vesícula germinal (Figura 7C y 7D).

Los ovocitos con 48 horas de cultivo, ya maduros en un alto porcentaje, mostraron la marca fluorescente de la ciclina B en el sitio correspondiente al de los cromosomas metafásicos, tomando la forma y estructura de éstos

(Figura 7E y 7F). En estos ovocitos tampoco se presentó la marca fluorescente del citoplasma que se presentó en los ovocitos recién colectados.

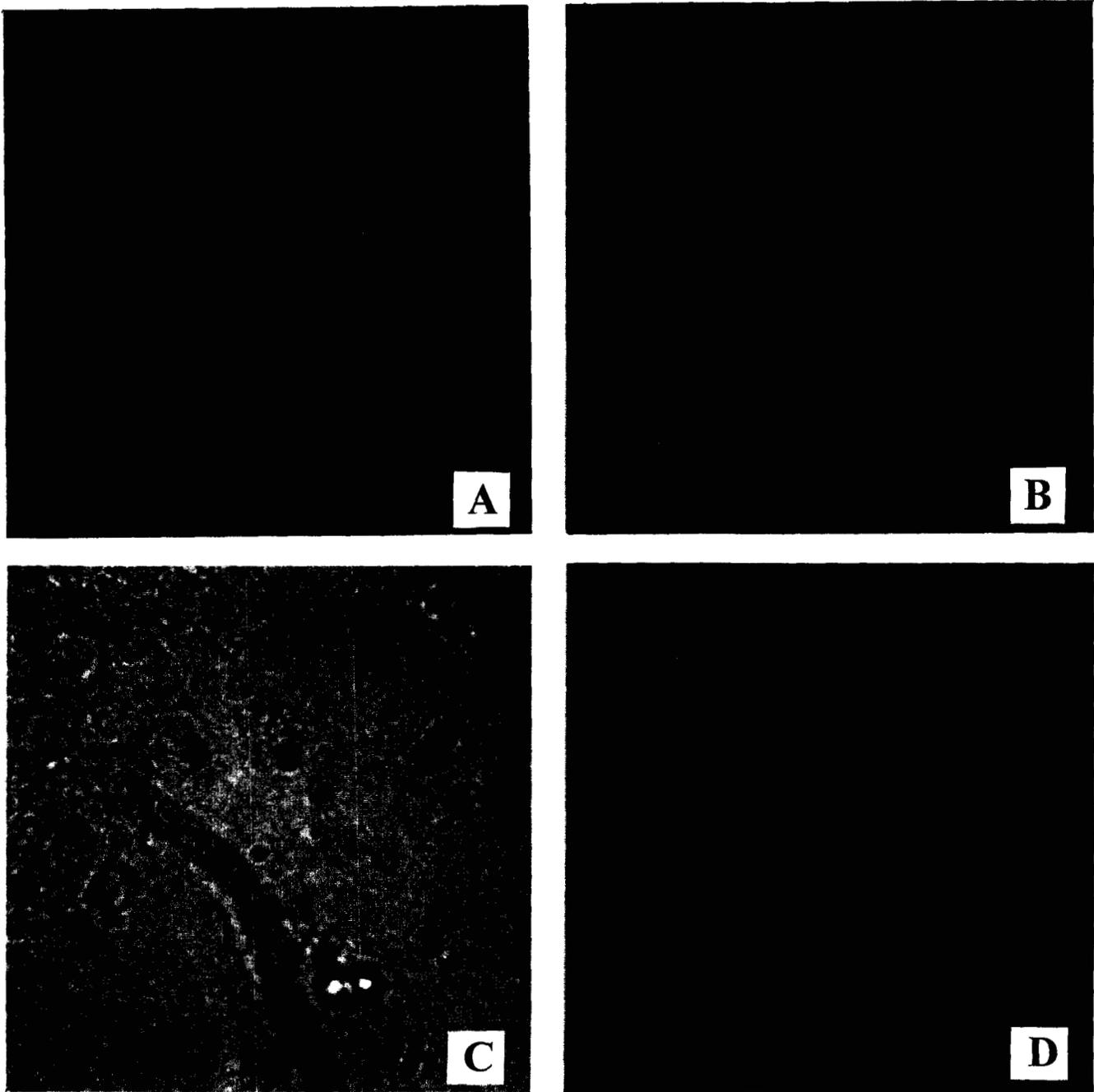


Figura 7. Localización intracelular de la ciclina B por inmunofluorescencia indirecta durante la maduración in vitro de ovocitos de cerdo.

Ovocitos inmaduros recién obtenidos: A) Campo claro, B) Inmunofluorescencia (400x). Ovocitos inmaduros después de 24 h de cultivo: C) Campo claro, D) Inmunofluorescencia (1000x).

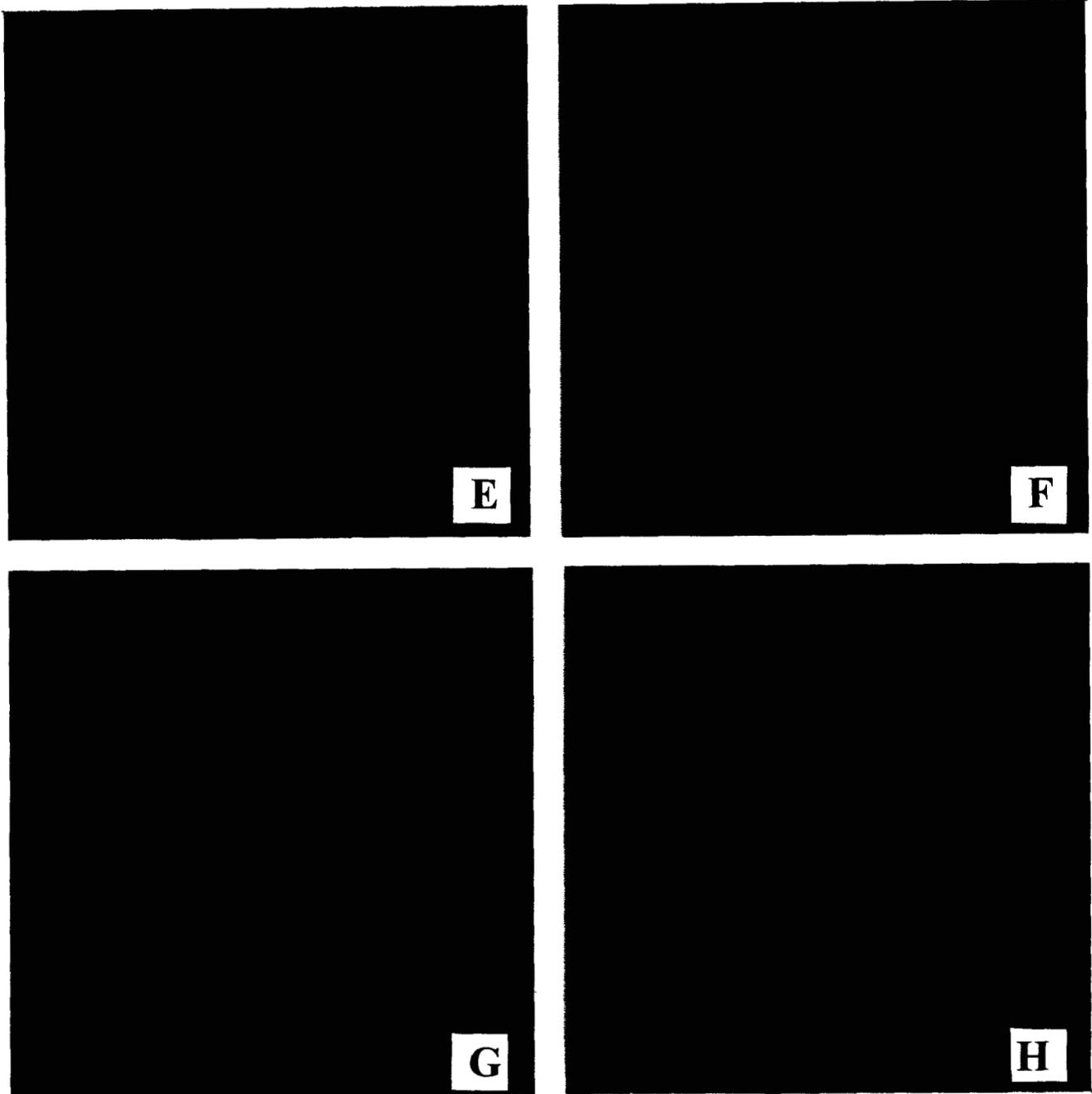


Figura 7 (cont.). Localización intracelular de la ciclina B por inmunofluorescencia indirecta durante la maduración in vitro de ovocitos de cerdo.

Ovocitos maduros después de 48 h de cultivo: E) Campo claro, F) Inmunofluorescencia (1000x).

Control, negativo sin anticuerpo primario: G) Campo claro, H) Inmunofluorescencia (250x).

## VII DISCUSION

El proceso de meiosis es un proceso de división celular con características muy especiales. Esta división ocurre sólo en las células germinales y no se producen dos células hijas idénticas, sino que se reduce el complemento cromosómico a la mitad además de sufrir previamente procesos de recombinación entre cromosomas homólogos. En el caso de las células germinales femeninas sólo se produce un gameto funcional, y el proceso es excepcional, ya que la meiosis procede de manera discontinua, y al llegar a la primera profase meiótica se produce una detención muy prolongada que en algunas especies puede durar varios años. Después de la pubertad algunos ovocitos son seleccionados para completar la meiosis y se induce la progresión de la primera a la segunda metafase meiótica sin una fase de síntesis de DNA intermedia, para concluir nuevamente en una detención en la metafase II, de la que se libera sólo después de la fertilización (Eppig, 1993; Wassarman y Albertini, 1994).

Para estudiar los mecanismos que regulan este proceso de división tan singular en mamíferos, se han empleado diversas metodologías (Yoshida et al, 1990; Funahashi y Day, 1993) que involucran la maduración de ovocitos, tanto in vivo como in vitro, bajo condiciones experimentales con distinto grado de éxito dependiendo de la especie de que se trate.

Se ha observado que las células foliculares son las principales responsables de la detención de la meiosis I en los mamíferos y que, durante el proceso de ovulación, la LH al ejercer su acción sobre dichas células permite al ovocito reanudar la meiosis (Plachot y Mandelbaum, 1990). Sin embargo por efecto de la FSH, las células foliculares también son capaces de secretar factores que estimulan el reinicio de la meiosis en el ovocito y favorecen la maduración citoplásmica en éste (Ding y Foxcroft, 1994a y b).

Para el caso particular del cerdo se han empleado distintos sistemas de cultivo para llevar a cabo la maduración in vitro, pero en todos los casos se necesita de LH y FSH como componentes básicos para una efectiva maduración. Normalmente se trabaja con pequeños volúmenes (aprox. 200-250  $\mu$ l), con un número reducido de ovocitos (10-20 ovocitos por pozo) y siempre cubriendo al medio de cultivo bajo aceite de parafina (Funahashi y Day, 1993a y b; Yoshida et al, 1990; Betancourt et al, 1993). En todos estos estudios el fin perseguido es generalmente la utilización de los ovocitos madurados in vitro para continuar posteriormente con

la fertilización, también in vitro, por lo que se trata de sistemas experimentales que involucran un pequeño número de ovocitos en cultivo. Sin embargo para el estudio de los factores moleculares que desencadenan el reinicio de la meiosis, es importante contar con un sistema que permita trabajar con un número suficiente de células para poder discernir más fácilmente la participación de dichos factores .

Empleando al cerdo como modelo experimental, en el presente estudio se empleó un sistema de cultivo que permitió llevar a cabo la maduración simultánea del doble de ovocitos acostumbrado, obteniendo porcentajes de maduración más altos del 60% a las 72 h. Antes de las 30 h de cultivo la mayor parte de los ovocitos se encontraron inmaduros, pero a las 36 h se produjo un incremento notable en la cantidad de ovocitos maduros. Estos resultados son coincidentes con los trabajos reportados por otros autores, en los que con un sistema de maduración in vitro a escala menor, se ha podido establecer los tiempo en que ocurren los eventos más importantes de la maduración de los ovocitos de cerdo (Motlik y Fulka, 1976; Inoue et al, 1995; Kalous et al, 1993; Jung et al, 1992). El intervalo entre el inicio de la maduración, generalmente considerado como el inicio del cultivo en el medio suplementado con LH, hasta el RVG toma alrededor de 20 h, y la progresión a lo largo de la metafase I toma de 6 a 8 h más. Después de esto ocurre una rápida transición anafase/telofase y al cabo de 30 h de cultivo se puede obtener una alta proporción de ovocitos maduros, generalmente más allá de la metafases I.

En diversos modelos animales que se han empleado para el estudio de la meiosis se ha identificado al FPM como el responsable de la transición de los ovocitos de la fase G2 a la fase M, a semejanza de lo que ocurre con las células somáticas al inicio de la mitosis. El FPM se encuentra presente en el citoplasma de ovocitos de anfibios (*Rana*, *Xenopus* y *Ambystoma*) y estrellas de mar y ratones, así como también en blastómeros de anfibio y células HeLa y CHO en mitosis (Sorensen et al, 1985). En los ovocitos de bovino se ha determinado la participación de este factor en la formación del pronúcleo masculino después de la fertilización (Abeydeera et al, 1993). Los trabajos de Petr et al (1994), en los que emplean la fusión celular entre ovocitos maduros e inmaduros, muestran la presencia del FPM en el citoplasma de ovocitos de cerdo completamente desarrollados.

Aunque el FPM se encuentra muy conservado evolutivamente, su activación parece estar regulada de modo distinto entre los vertebrados, y en particular entre los mamíferos. En las especies de largo tiempo de

maduración *in vitro* como la cerda, la vaca y la borrega, se requiere de una síntesis proteica para que el FPM alcance su máximo de actividad e induzca el RVG, mientras que en los de corto tiempo como el ratón esta síntesis no es indispensable (Kalous et al, 1993). En ovocitos de cerdo se observa una primera subida en la actividad del FPM entre las 26 y 29 h de cultivo, coincidente con la etapa de metafase I y declina durante la transición Anafase/Telofase I, para volver a aumentar alrededor de las 35 h y permanecer así durante el resto de la maduración (Mattioli et al, 1991, Naito y Toyoda, 1991). Estos resultados son semejantes a los reportados para los ovocitos de *Xenopus* y de estrella de mar, y se supone que existen grandes cantidades de FPM preformado desde antes del inicio de la metafase I. Esto ha sido confirmado en el ratón, en el que el FPM se encuentra presente aún antes del RVG (Sorensen et al, 1985). Otros puntos en la regulación de la actividad del FPM están dados por las modificaciones intramoleculares a las que se encuentra sujeto dicho factor, ya que se ha determinado que está compuesto por dos subunidades que requieren estar unidas para su activación, al mismo tiempo que sufre distintos eventos de fosforilación-defosforilación que determinan el momento exacto de la actividad; también es posible que la localización intracelular y cantidad de sus componentes jueguen un papel muy importante para la regulación de su funcionamiento *in vivo* (Lewin, 1990; Dekel, 1995). Por esto se hace necesario determinar la presencia y localización de los componentes del FPM durante la maduración *in vitro*, y tratar de asociar dichos cambios con los incrementos y descensos de la actividad que dicho factor muestra en el reinicio de la meiosis.

El análisis de la concentración de la ciclina en los extractos de ovocitos obtenidos a diferentes tiempos de maduración, muestran que la ciclina B se encuentra en ellos desde el inicio de la maduración, y se produce un ligero aumento de concentración de ésta durante el proceso (Fig. 6). Con estos resultados no es posible determinar si se requiere de la síntesis de la ciclina B para regular la activación del FPM y el reinicio de la meiosis. Sin embargo al tomarlos en conjunto con los de Mattioli et al (1991), Naito y Toyoda (1991), parece evidente que en el cerdo se requiere de una síntesis de ciclina B para desencadenar el reinicio de la meiosis en los ovocitos.

En otras especies animales se ha analizado la concentración de los componentes del FPM, tratando de hacer una correlación con su actividad. Los ovocitos inmaduros de pez dorado contienen p34<sup>cdc2</sup>, pero no ciclina

B. Esta última aparece antes del RVG, por síntesis de novo y se une con p34<sup>cdc2</sup> para que la cinasa sea activada por fosforilación. En contraste, los ovocitos de *Xenopus* tienen la cantidad necesaria de ciclina B unida a p34<sup>cdc2</sup> y la activación del FPM se da por defosforilación. Se supone que en mamíferos y estrellas de mar la activación del FPM es similar a la de *Xenopus*: la ciclina B y p34<sup>cdc2</sup> se encuentran presentes desde antes del inicio de la maduración formando un complejo inactivo. En la almeja *Spisula*, los ovocitos inmaduros contienen tanto p34<sup>cdc2</sup> como ciclina B, pero no se unen hasta el inicio de la maduración (Yamashita et al, 1995).

Los estudios realizados por Chapman y Wolgemuth (1992, 1993) muestran que en el ratón debe ocurrir algo semejante a lo que ocurre en *Xenopus*, ya que detectan transcritos de la ciclina B en ovocitos localizados en folículos en crecimiento y en ovocitos crecidos a término, sin embargo los transcritos se acumulan progresivamente, ya que no se les detecta en los ovocitos de folículos en reposo, antes de la estimulación por FSH. Sin embargo parece que en el ratón existe un punto crítico durante la maduración meiótica de los ovocitos, que ocurre alrededor del tiempo del RVG, en cuanto a la activación de la cinasa de histona H1 (FPM) (O'Keefe et al, 1991; Hampl y Eppig, 1995). La progresión más allá de este punto requiere de la síntesis de novo de proteínas, y parece que la ciclina es uno de los candidatos más viables, ya que alrededor de la metafase I esta proteína alcanza niveles de 2.5 veces la concentración de ella en la etapa de VG.

Trabajos recientes de Christman et al (1994) muestran que en los ovocitos de cerdo existe una cantidad importante de ciclina B que no se modifica durante el crecimiento folicular, ya que se le encuentra por igual tanto en ovocitos en crecimiento (<90 μm) como en ovocitos crecidos a término (120 μm), sin embargo en este caso no se excluye la posibilidad de que a pesar de que se encuentre presente en los ovocitos, esté secuestrada o modificada de tal modo que la haga inaccesible a la maquinaria celular normal.

Los resultados del presente trabajo muestra que existen cambios de localización de la ciclina B durante la maduración in vitro de los ovocitos de cerdo, asociados temporalmente a los eventos importantes de la maduración.

Los ovocitos inmaduros recién colectados, muestran a la ciclina B distribuida por todo el citoplasma, entre los glóbulos de lípidos de reserva, sin que se aprecie asociación con alguna estructura subcelular. Aún en los ovocitos en los que se observa claramente la vesícula germinal, no se detecta una marca fluorescente

asociada a ella, por lo que podemos considerar que a este tiempo la localización es por completo citoplásmica. Después de 24 h de maduración *in vitro*, tiempo previo a la RVG, la ciclina se localiza sólo en la vesícula germinal, ya que la marca del citoplasma desaparece por completo. Después del RVG, a las 48 h de maduración *in vitro*, la ciclina B se localiza asociada directamente a los cromosomas que se han condensado para formar la placa metafásica.

Los reportes acerca de la localización de los componentes del FPM durante la interfase han sido contradictorios. En células de mamífero se ha reportado que p34<sup>cdc2</sup> se localiza en el núcleo, en el citoplasma o en ambos; la ciclina B de anfibios se ha detectado sólo en el citoplasma, en embriones de *Drosophila* se presenta en el citoplasma y algunos puntos intranucleares, mientras que en levaduras sólo se detecta en el núcleo (revisado en Ookata et al, 1992). Además de estas controversias falta aclarar la distribución de los componentes del complejo durante la transición G2/M.

Los primeros trabajos que muestran cambios en la localización intracelular de la ciclina B asociados a las fases del ciclo celular, en especial a la transición G2/M durante la mitosis, se realizaron en fibroblastos humanos y células HeLa (Pines y Hunter, 1991) y en fibroblastos de pollo (Gallant y Nigg, 1992). En estos tipos celulares se observa que la ciclina B, que se encuentra asociada invariablemente con p34<sup>cdc2</sup>, aparece al inicio de la fase S con una localización perinuclear. Durante la fase G2 sigue acumulándose y se asocia a los microtúbulos. Al inicio de la profase mitótica se produce una súbita relocalización hacia el núcleo, antes del rompimiento de la envoltura nuclear y del desensamble de la lámina nuclear. Esta traslocación parece ser independiente de los microtúbulos, ya que los tratamientos que los desestabilizan no afectan la migración de la ciclina al núcleo. Por último, en la metafase se asocia a los cromosomas y al huso mitótico y al inicio de la anafase desaparece.

Sin embargo, las investigaciones para determinar si este fenómeno se produce de manera similar durante la meiosis son muy escasos.

En estudios realizados en ovocitos de estrella de mar (Ookata et al, 1992, 1993), se observa que la ciclina B siempre se encuentra formando un complejo inactivo con p34<sup>cdc2</sup> que se localiza en el citoplasma. Después del reinicio de la meiosis parte de este complejo migra hacia la VG, otra parte se asocia con el huso, y el resto permanece dispersa en el citoplasma.

En una revisión publicada por Moor et al (1992), se indica que en los ovocitos de cerdo se presenta un cambio de localización de la ciclina B semejante al que reportan Pines y Hunter (1991) para las células somáticas, es decir, la ciclina B que se encuentra asociada a microtúbulos durante la interfase y se trasloca al núcleo antes del rompimiento de la vesícula germinal y se asocia posteriormente a los cromosomas y al huso mitótico. Sin embargo en el presente trabajo no se observa asociación de la ciclina B con ninguna estructura celular distinta de la cromatina, ya que antes del rompimiento de la vesícula germinal se encuentra dispersa en el citoplasma y migra a la VG, para después encontrarse exclusivamente en los cromosomas metafásicos.

En conclusión, los resultados del presente trabajo muestran que:

i) los ovocitos de cerdo pueden emplearse como un modelo muy adecuado para el estudio de la regulación de la maduración meiótica, debido a su disponibilidad y facilidad de obtenerlos en cantidades relativamente grandes en comparación con los ovocitos de otras especies de mamíferos, y su facilidad de cultivo;

ii) durante el proceso de maduración in vitro, los ovocitos de cerdo exhiben cambios en la concentración y localización de la ciclina que se asocian temporalmente a los eventos de la maduración meiótica, por lo que la ciclina B tiene una participación esencial en la regulación del reinicio de la meiosis.

## BIBLIOGRAFIA.

- Abeydeera LR, Niwa K y Okuda K. 1993. Maturation-promoting factor (MPF) is responsible for the transformation of sperm nuclei to metaphase chromosomes in maturing bovine oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 98:409-414.
- Betancourt M, Fierro R y Ambriz D. 1993. In vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 40:1155-1160.
- Buchou T, Kranenburg O, van Dam H, Roelen D, Zantema A, Hall FL y van der Eb A. 1993. Increased cyclin A and decreased cyclin D levels in adenovirus 5 E1A-transformed rodent cell lines. *Oncogene* 8:1765-1773.
- Byskov AG, Andersen CY, Nordholm L, Thogersen H, Guoliang X, Wassmann O, Andersen JV, Guddal E y Roed T. 1995. Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. *Nature* 374(6522):559-562.
- Carroll J, Swann K, Whittingham D y Whitaker M. 1994. Spatiotemporal dynamics of intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. *Development* 120:3507-3517.
- Clarke PR, Hoffman I, Draetta G y Karsenti E. 1993. Dephosphorylation of cdc25-C by a type-2A protein phosphatase: specific regulation during the cell cycle in *Xenopus* egg extracts. *Mol Biol Cell* 4:397-411.
- Connell-Crowley L, Solomon MJ, Wei N y Harper JW. 1993. Phosphorylation independent activation of human cyclin-dependent kinase 2 by cyclin A in vitro. *Mol Biol Cell* 4:79-92.
- Chapman, DL y Wolgemuth DJ. 1992. Identification of a mouse B-type cyclin which exhibits developmentally regulated expression in the germ line. *Mol. Reprod. Develop.* 33:259-269.
- Chapman, DL y Wolgemuth DJ. 1993. Isolation of the murine cyclin B2 cDNA and characterization of the lineage and temporal specificity of expression of the B1 and B2 cyclins during oogenesis, spermatogenesis and early embryogenesis. *Development* 118:229-240.
- Chesnel F y Eppig JJ. 1995. Induction of precocious germinal vesicle breakdown (GVB) by GVB-incompetent mouse oocytes: possible role of mitogen-activated protein kinases rather than p34<sup>cdc2</sup> kinase. *Biol Reprod* 52:895-902.
- Chian RC, Niwa K y Nakahara H. 1992. Effect of sperm penetration in vitro on completion of first meiosis by bovine oocytes arrested at various stages in culture. *J Reprod Fert* 96:73-78.

- Christman L, Jung T y Moor RM. 1994. MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. *Mol Reprod Develop* 38:85-90.
- Dekel N. 1995. Molecular control of meiosis. *Trends Endocrinol Metab* 6(5):165-169.
- De Loos F, Kastrop P, Van Maurik P, Van Beneden TH y Kruip TAM. 1991. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Mol Reprod Develop* 28:255-259.
- De Smedt V, Crozet N y Gall L. 1994. Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. *J Exp Zool* 269:128-139.
- Ding J y Foxcroft GR. 1994a. Conditioned media produced by follicular shells of different maturity affect maturation of pig oocytes. *Biol Reprod* 50:1377-1384.
- Ding J y Foxcroft GR. 1994b. FSH-stimulated follicular secretions enhance oocyte maturation in pigs. *Theriogenology* 41:1473-1481.
- Dorée M, Labbé JC y Picard A. 1989. M phase-promoting factor: its identification as the M phase-specific H1 histone kinase and its activation by dephosphorylation. *J Cell Sci Suppl.* 12:39-51.
- Downs SM. 1993. Purine control of mouse oocyte maturation: Evidence that nonmetabolized hypoxanthine maintains meiotic arrest. *Mol Reprod Develop* 35:82-94.
- Draetta G y Beach D. 1989. The mammalian cdc2 protein kinase: mechanism of regulation during the cell cycle. *J Cell Sci Suppl.* 12:21-27.
- Eppig JJ. 1991. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays* 13(11):569-574.
- Eppig JJ. 1993. Regulation of mammalian oocyte maturation. In: *The ovary* (E.Y. Adashi y P.C.K. Leung (eds.) Raven Press, New York:185-208.
- Eppig JJ, Peters AHFM, Telfer EE y Wigglesworth K. 1993a. Production of cumulus expansion enabling factor by mouse oocytes grown in vitro: preliminary characterization of the factor. *Mol Reprod Develop* 34:450-456.
- Eppig JJ, Wigglesworth K y Chesnel F. 1993b. Secretion of cumulus expansion enabling factor by mouse oocytes: relationship to oocyte growth and competence to resume meiosis. *Develop Biol* 158(2):400-409.

- Funahashi H y Day BN. 1993a. Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 98:179-185.
- Funahashi H y Day BN. 1993b. Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Theriogenology* 39:956-973.
- Gallant P y Nigg EA. 1992. Cyclin B2 undergoes cell cycle-dependent nuclear translocation and, when expressed as a non-destructible mutant, causes mitotic arrest in HeLa cells. *J Cell Biol* 117(1):213-224.
- Gallant P y Nigg EA. 1994. Identification of a novel vertebrate cyclin: cyclin B3 shares properties with both A- and B-type cyclins. *EMBO J* 13(3):595-605.
- Goren S y Dekel N. 1994. Maintenance of meiotic arrest by a phosphorylated p34<sup>cdc2</sup> is independent of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Biol Reprod* 51:956-962.
- Guerrier, S.K. 1992. Molecular control of the cell cycle: A thematic meeting of the French Society for Cell Biology, held at the Ecole Normale Supérieure de Lyon, 6-8 July, 1992. *Biol Cell* 76:205-208.
- Haas M y Jost E. 1993. Functional analysis of phosphorylation sites in human lamin A controlling lamin disassembly, nuclear transport and assembly. *Eur J Cell Biol* 62:237-247.
- Hampel A y Eppig JJ. 1995. Translational regulation of the gradual increase in Histone H1 kinase activity in maturing mouse oocytes. *Mol Reprod Develop* 49:9-15.
- Hawkes R, Nidai E y Gordon J. 1982. A dot immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem* 119:142-147.
- Heichman KA y Roberts JM. 1994. Rules to replicate by. *Cell* 79:557-562.
- Hershko A y Ciechanover A. 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 61:761-807.
- Homa ST, Carroll J y Swann K. 1993. The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Hum Reprod* 8(8):1274-1281.
- Hunter RHF. 1991. Fertilization in the pig and horse. In: A comparative overview of mammalian fertilization (BS Dunbar y MG O'Rand, eds.) Plenum Press, New York:329-349.
- Hunter T y Pines J. 1994. Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79:573-582.

- Inagaki I, Ito M, Nakano T y Inagaki M. 1994. Spatiotemporal distribution of protein kinase and phosphatase activities. *TIBS* 19:448-452.
- Inoue M, Naito K, Aoki F, Sato E y Toyoda Y. 1995. MAP kinase activation in porcine oocytes during meiotic maturation. *Biol Reprod* 52(Suppl 1):107.
- Iritani, A. 1991. Micromanipulation of gametes for in vitro assisted fertilization. *Mol Reprod Develop* 28:199-207.
- Jung T, Lee C y Moor RM. 1992. Effects of protein kinase inhibitors on pig oocyte maturation in vitro. *Reprod Nutr Dev* 32:461-473.
- Kalous J, Kubelka M, Rimkevica Z, Guerrier P y Motlik J. 1993. Okadaic acid accelerates germinal vesicle breakdown and overcomes cycloheximide- and 6-dimethylaminopurine block in cattle and pig oocytes. *Develop Biol* 157:448-454.
- Keryer G, Luo Z, Cavadore JC, Erlichman J y Bornens M. 1993. Phosphorylation of the regulatory subunit of type IIB cAMP-dependent protein kinase by cyclin B/p34<sup>cdc2</sup> kinase impairs its binding to microtubule-associated protein 2. *PNAS* 90:5418-5422.
- King RW, Jackson PK y Kirschner MW. 1994. Mitosis in transition. *Cell* 79:563-571.
- Kirschner M. 1992. The cell cycle then and now. *Trends Biochem Sci* Agosto:281-285.
- Kung AL, Sherwood S y Schimke RT. 1993. Differences in the regulation of protein synthesis, Cyclin B accumulation and cellular growth in response to the inhibition of DNA synthesis in Chinese hamster ovary and HeLa S3 cells. *J Biol Chem* 268(31):23072-23080.
- Lewin, B. 1990. Driving the cell cycle: M phase kinase, its partners, and substrates. *Cell* 61:743-752.
- Lindner, HR, Bar-Ami S y Tsafiriri A. 1983. Control of the resumption of meiosis in mammals. In: *The Ovary* (G.B. Serra, ed.) Raven Press, New York:83-94.
- Maller JL, Gautier J, Langan TA, Lohka MJ, Shenoy S, Shalloway D y Nurse P. 1989. Maturation-promoting factor and the regulation of the cell cycle. *J Cell Sci Suppl.* 12:53-63.
- Mattioli M, Galeati G, Bacci ML y Barboni B. 1991. Changes in maturation-promoting activity in the cytoplasm of pig oocytes throughout maturation. *Molec Reprod Develop* 30:119-125.

- McGaughey RW 1978. In vitro oocyte maturation. In: Methods in mammalian reproduction (JC Daniel, ed) Academic Press, New York:1-20.
- Millar JBA y Russell P. 1992. The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. Cell 68:407-410.
- Minshull J. 1993. Cyclin synthesis: who needs it? Bioessays 15(3):149-155.
- Moor R, Hutchings A, Hawkins C y Jung T. 1992. Towards a molecular understanding of meiosis in domestic animals. In: Embryonic development and manipulation in animal production: Trends in Research and Applications (A Lauria y F Gandolfi, eds.):1-15. Portland Press Proceedings. Number 2, London UK; Portland Press.
- Moreno S. 1992. Así comienza la mitosis. Investigación y Ciencia 187:62-69.
- Moreno, S y Nurse P. 1990. Substrates for p34<sup>cdc2</sup>: in vivo veritas?. Cell 61:549-551.
- Motlik J y Fulka J. 1976. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. J Exp Zool 198:155-162.
- Murray A y Hunt T. 1993. The Cell Cycle. An introduction. Oxford Univ. Press, Inc. New York. 251 pp.
- Murray AW y MW Kirschner. 1991. Control del ciclo celular. Investigación y Ciencia. 176:26-33.
- Naito K y Toyoda Y. 1991. Fluctuation of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes. J Reprod Fert 93:467-473.
- Nigg EA. 1995. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. BioEssays 17(6):471-480.
- Norbury C y Nurse P. 1992. Animal cell cycles and their control. Annu Rev Biochem 61:441-470.
- Nurse P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. Nature 344(6266):503-508.
- O'Connor PM, Ferris DK, Pagano M, Draetta G, Pines J, Hunter T, Longo DL y Kohn KW. 1993. G2 delay induced by nitrogen mustard in human cells affects cyclinA/cdk2 and cyclin B1/cdc2-kinase complexes differently. J Biol Chem 268(11):8298-8308.
- O'Keefe SJ, Kiessling AA y Cooper GM. 1991. The c-mos gene product is required for cyclin B accumulation during meiosis of mouse eggs. PNAS 88(17):7869-7872.

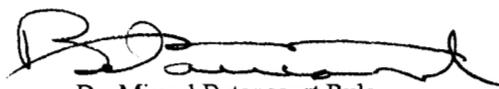
- Oda T, Yoshimura Y, Izumi Y, Yoshimura S, Hara T, Takehara Y, Nakamura Y y Ohno T. 1990. The effect of the follicular fluid adenosine 3',5'-monophosphate degradation rate on successful fertilization and cleavage of human oocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 71(1):116-121.
- Ookata K, Hisanaga S, Okano T, Tachibana K y Kishimoto T. 1992. Relocation and distinct subcellular localization of p34<sup>cdc2</sup>-cyclin B complex at meiosis reinitiation in starfish oocytes. *EMBO J* 11(5):1763-1772.
- Ookata K, Hisanaga S, Okumura E y Kishimoto T. 1993. Association of p34<sup>cdc2</sup>/cyclin B complex with microtubules in starfish oocytes. *J. Cell Sci.* 105(Pt 4):873-881.
- Palmero I, Holder A, Sinclair AJ, Dickson C y Peters G. 1993. Cyclins D1 and D2 are differentially expressed in human B-lymphoid cell lines. *Oncogene* 8:1049-1054.
- Paules RS, Buccione R, Moschel RC, Vande-Woude GF y Eppig JJ. 1989. Mouse mos protooncogene product is present and functions during oogenesis. *PNAS* 86:5395-5399.
- Petr J, Rozinek J, Fulka J y Jilek F. 1994. Influence of cytoplasmic microinjection on meiotic competence in growing pig oocytes. *Reprod Nutr Dev* 34:81-87.
- Phillips, DM y Dryden GL. 1991. Comparative morphology of mammalian gametes. In: A comparative overview of mammalian fertilization (BS Dunbar y MG O'Rand, eds.) Plenum Press, New York:37-50.
- Pines, J y Hunter T. 1991. Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol* 115(1):1-17.
- Plachot, M y Mandelbaum J. 1990. Oocyte maturation, fertilization and embryonic growth in vitro. *Brit Med Bull* 46(3):675-694.
- Rose, TA y Bavister BD. 1992. Effect of oocyte maturation medium on in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos. *Mol Reprod Develop* 31:72-77.
- Salustri A, Hascall VC, Camaioni A y Yanagishita M. 1993. Oocyte-granulosa cell interactions. In: The ovary (E.Y. Adashi y P.C.K. Leung, eds.) Raven Press, New York:209-225.
- Sebastian B, Kakizuka A y Hunter T. 1993. Cdc25M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15. *PNAS* 90:3521-3524.

222875

- Shalgi R y Dekel N. 1990. Embryonic development of fertilized rat oocytes induced to mature by an analogue of gonadotrophin-releasing hormone. *J Reprod Fert* 89:681-687.
- Sherr CJ. 1993. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73:1059-1065.
- Sherr CJ. 1994. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79:551-555.
- Sherwood SW, Kung AL, Roitelman J, Simoni RD y Schimke RT. 1993. In vivo inhibition of cyclin B degradation and induction of cell-cycle arrest in mammalian cells by the neutral cysteine protease inhibitor N-acetylleucylleucylnorleucinal. *PNAS* 90:3353-3357.
- Sirard MA y Bilodeau S. 1990. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes in vitro. *Biol Reprod* 43:777-783.
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML y First NL. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 40:1257-1263.
- Smith LD. 1989. The induction of oocyte maturation: transmembrane signaling events and regulation of the cell cycle. *Develop* 107:685-699.
- Sorensen RA, Cyert MS y Pedersen RA. 1985. Active maturation-promoting factor is present in mature mouse oocytes. *J Cell Biol* 100:1637-1640.
- Stephano JL. 1993. El factor promotor de la fase M y el control de la división celular. *Ciencia* 44(3):305-322.
- Tarkowski AK. 1966. An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics* 5:394-400.
- Törnell J y Hillensjö H. 1993. Effect of cyclic AMP on the isolated human oocyte-cumulus complex. *Hum Reprod* 8(5):737-739.
- Van de Sandt JJM, Schroeder AC y Eppig JJ. 1990. Culture media for mouse oocyte maturation affect subsequent embryonic development. *Mol Reprod Develop* 25:164-171.
- Vanderhyden BC. 1993. Species differences in the regulation of cumulus expansion by an oocyte-secreted factors. *J Reprod Fertil* 98:219-227.
- Wassarman PM y Albertini DF. 1994. The mammalian ovum. In: *The Physiology of Reproduction* 2nd. ed. (E Knobil y JD Neill, eds) Raven Press, New York:79-122.

- Watson JD, Gilman M, Witkowski J y Zoller M. 1992. Molecular analysis of the cell cycle. Chapter 19. In: Recombinant DNA 2a. ed. Sci Am Books, New York: 369-388.
- Wu L y Russell P. 1993. Nim1 kinase promotes mitosis by inactivating Wee1 tyrosine kinase. Nature 363:738-741.
- Yamashita M, Kajiura H, Tanaka T, Onoe S y Nagahama Y. 1995. Molecular mechanisms of the activation of maturation-promoting factor during goldfish oocyte maturation. Develop Biol 168:62-75.
- Yazigi RA, Chi MMY, Mastrogiannis DS, Strickler RC, Yang VC y Lowry OH. 1993. Enzyme activities and maturation in unstimulated and exogenous gonadotropin-stimulated human oocytes. Am J Physiol 264(Cell Physiol 33):C951-C955.
- Yoshida M, Ishizaki Y y Kawagishi H. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from invitro fertilization of oocytes matured in vitro. J Reprod Fert 88:1-8.

El Jurado designado por la División de CBS de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa  
aprobó la presente Tesis el día 22 de Enero de 1996.



Dr. Miguel Betancourt Rule



Dra. Raquel Trejo Albarrán



M. en C. Edmundo Bonilla González