

IV.15. GLUTATIÓN (GSH)

IV.15.1. Funciones del GSH en la célula

El GSH (L- γ -glutamyl-L-cisteínglicina) es el mayor componente sulfhidrilo no proteico presente en las células de mamíferos, presente a concentraciones de 0.5-10 mmol/L (Meister, 1983). Es un gran tiol libre intracelular que tiene importantes funciones biológicas (Chance *et al.*, 1979; Meister y Anderson, 1983):

- durante la proliferación celular
- en el transporte de aminoácidos
- en la síntesis de proteínas y ADN
- en la reducción de disulfidos y otros grupos químicos
- en la protección celular contra la oxidación
- como reserva para la cisteína

El GSH celular juega un papel clave en dichos procesos biológicos, pero, notablemente, en la protección de las células contra la oxidación, ya que el grupo sulfhidrilo (SH) es un fuerte nucleófilo, y confiere protección contra el daño causado por oxidantes, neutrófilos y radicales libres (Meister y Anderson, 1983).

IV.15.2. Estructura y biosíntesis del GSH

El GSH es un tripéptido derivado de la glicina, el glutamato y la cisteína (Figura 3).

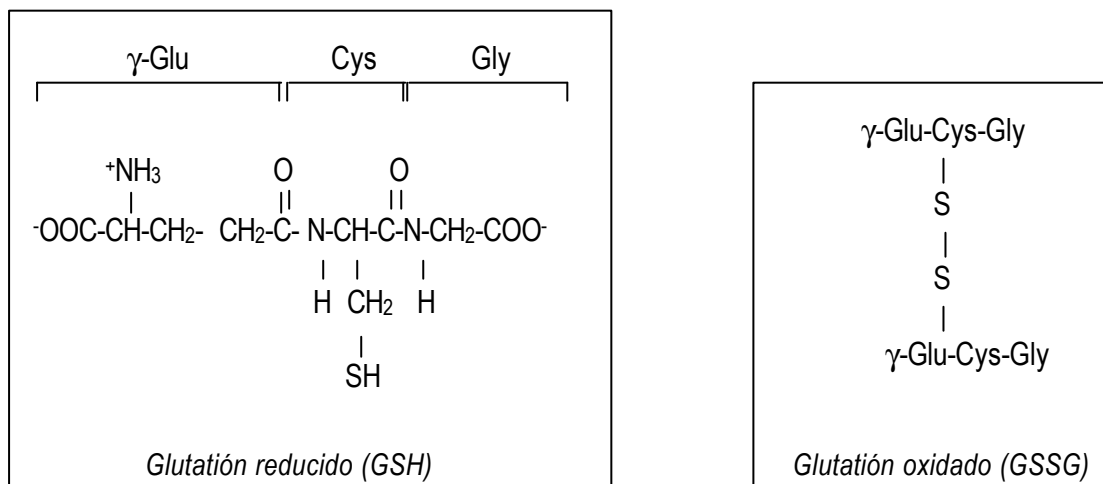


Figura 3. Estructura del glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG)

El GSH se sintetiza mediante el ciclo γ -glutamyl (Meister y Tate, 1976; Chance *et al.*, 1979; Meister, 1983), y esta síntesis es dependiente de la disponibilidad de cisteína en el medio (Figura 4). Su síntesis se realiza en dos pasos, catalizados por reacciones ATP-dependientes. El primer paso consiste en una condensación del grupo γ -carboxilo del glutamato con el grupo α -amina de la cisteína. El grupo carboxilo es activado en un principio por el ATP para dar lugar a un intermedio del tipo fosfato de acilo, que a continuación es atacado por el grupo amina de la cisteína ($\text{L-Glu}^- + \text{L-CySH} + \text{ATP} \rightleftharpoons \gamma\text{-L-GluCySH} + \text{ADP} + \text{Pi}$). El segundo paso

es parecido, siendo activado el grupo α -carboxilo de la cisteína a una forma fosfato de acilo que permite la condensación con la glicina ($\gamma\text{-GluCySH} + \text{Gly} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{GSH} + \text{ADP} + \text{P}_i$).

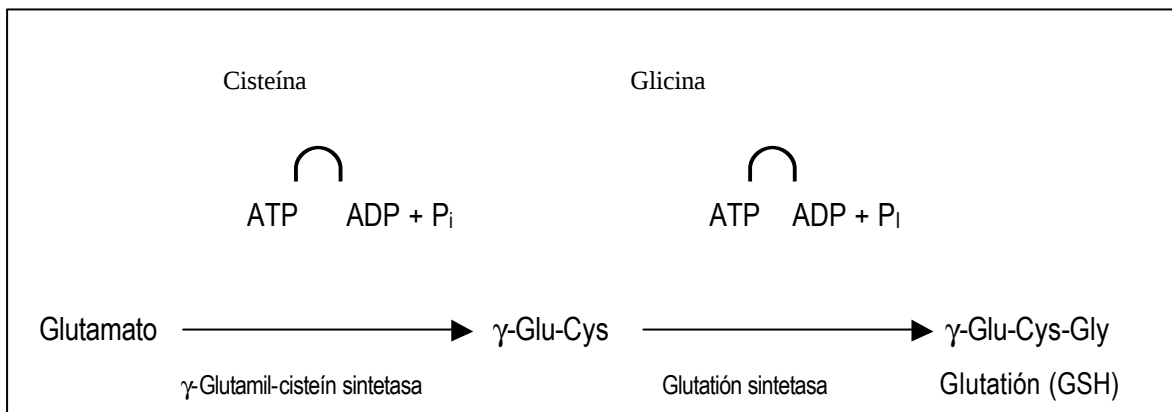


Figura 4. Biosíntesis del glutatión (GSH)

IV.15.3. Acción redox del GSH. Función antioxidante

El GSH, presente en elevadas concentraciones ($\sim 5 \text{ mM}$) en las células animales, actúa como amortiguador de sulfhidrilos. Pasa cíclicamente de una forma tiol reducida (GSH) a una forma oxidada (GSSG), en la cual los dos tripéptidos están unidos por un puente disulfuro (Figura 5). Esta reacción está catalizada por la glutatión peroxidasa, una enzima que tiene la peculiaridad de contener un átomo de selenio (Se) unido covalentemente en forma de selenocisteína, que resulta esencial para la actividad enzimática.

El GSH puede considerarse como una especie de tampón redox. Posiblemente ayuda a mantener los grupos sulfhidrilos de las proteínas en su forma reducida y el hierro del grupo hemo en forma de ión ferroso (Fe^{2+}), a la vez que actúa como un agente reductor para la glutarredoxina. Su acción redox puede utilizarse también para la eliminación de los peróxidos tóxicos que se forman durante el crecimiento y en el metabolismo en condiciones anaeróbicas.

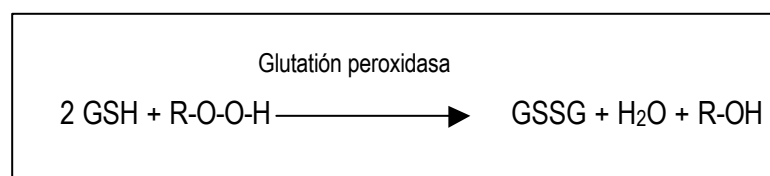


Figura 5. Oxidación del GSH

El GSSG es reducido de nuevo a GSH por una glutatión reductasa, una flavoproteína que utiliza NADPH como dador de electrones (Figura 6). La relación de GSH a GSSG es en la mayoría de las células superior a 500.

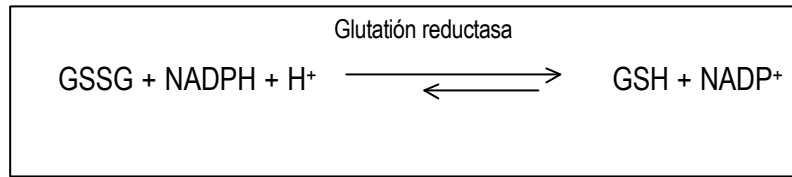


Figura 6. Reducción del GSSG

El GSH es un antioxidante intracelular crítico debido a su relativa abundancia y capacidad para ciclar rápidamente entre las formas reducida (GSH) y oxidada (glutatión disulfido: GSSG). Típicamente, la mayoría (>90%) del total del glutatión intracelular (GSH + GSSG) se encuentra como GSH. El balance entre GSH y GSSG se mantiene a través de un rápido reciclaje del GSSG a GSH vía GSSG reductasa (Meister y Anderson, 1983). Durante periodos de estrés oxidativo, el GSH elimina el exceso de radicales libres intracelulares y, por oxidación del grupo tiol de su residuo de cisteína, se oxida a GSSG mediante la acción de la GSH peroxidasa, que posteriormente se vuelve a convertir a GSH vía GSSG reductasa (Meister y Anderson, 1983; Shan *et al.*, 1990). Alternativamente, el GSSG también se puede generar mediante una oxidación química no enzimática del GSH (Shan *et al.*, 1990).

La ratio intracelular entre las formas reducida (GSH) y oxidada (GSSG) del glutatión es muy alta (Meister, 1983) y se ha sugerido que el GSSG se reduce a GSH inmediata o rápidamente en la mayoría de los sistemas celulares (Meister *et al.*, 1988) y en los ovocitos de mamíferos (Perreault *et al.*, 1984), por lo que se considera que el glutatión medido se encuentra mayoritariamente en forma reducida.

IV.15.4. Vías metabólicas del GSH en las células

El GSH y sus conjugados se degradan extracelularmente en un proceso de 2 etapas, la primera de las cuales es catalizada por la γ -glutamil transeptidasa (GGT) y transfiere el grupo γ -glutamil a un aceptor apropiado. El GSH es la mayor fuente de equivalentes reductores intracelulares no proteicos para muchos procesos biosintéticos y también es un conjugante para el metabolismo de los eicosanoides (hepoxilinas, leucotrienos y prostaglandinas) y muchos carcinógenos y toxinas (Monks y Lau, 1994: citado por Lieberman *et al.*, 1996; Meister y Larsson, 1995). El riñón y el hígado secretan grandes cantidades de GSH, el cual se divide en sus aminoácidos constituyentes mediante la acción secuencial de la GGT y una dipeptidasa, siendo entonces reabsorbidos y usados en muchas reacciones intracelulares que incluyen la resíntesis de GSH. Aunque no se conocen todas las funciones del ciclo γ -glutamil, se ha sugerido que su papel principal es el metabolismo y transporte de los aminoácidos, especialmente la cisteína (Hanigan y Ricketts, 1993; Meister y Larsson, 1995; Hanigan, 1995: citado por Lieberman *et al.*, 1996). En la secreción renal, el GSH sintetizado intracelularmente a partir de la cisteína, se transporta al interior del túbulo renal y se oxida a glutatión disulfido, rompiéndose posteriormente por la γ -glutamil transeptidasa y la dipeptidasa, liberando cistina dentro del túbulo. En ausencia de defectos o de inhibidores (L-arginina o L-lisina) del transporte de cistina, ésta se reabsorbe y se reduce intracelularmente a cisteína (Griffith, 1981).

La enzima unida a membrana, la GGT, está posiblemente implicada en la síntesis de GSH a través de su función en la captación de aminoácidos. Se cree que esta enzima transfiere el grupo γ -glutamil del GSH

extracelular a un aminoácido extracelular. Entonces, el aminoácido γ -glutamil se transporta al interior de la célula (Meister y Anderson, 1983). La actividad del enzima debe ser un factor tasa-limitante en el transporte de un número de aminoácidos, incluyendo la cisteína y en el mantenimiento de los niveles celulares de GSH. En las células de Sertoli, la actividad de este enzima es elevada y aumenta durante el desarrollo testicular post-natal, mientras que en las espermatídes, esta actividad es baja (Lu y Steinberger, 1977). Den Boer *et al.* (1989) proponen que las células germinales podrían tomar los aminoácidos γ -glutamil producidos por las células de Sertoli.

Se han observado elevadas concentraciones de GSH en testículos de rata y de ratón (Calvin y Turner, 1982; Grosshans y Calvin, 1985). En espermatídes y espermatoцитos aislados de hámster se observa una disminución gradual en el contenido de GSH durante una incubación prolongada, pero sin ser concomitante con una pérdida de viabilidad celular, ya que el contenido de ATP celular se mantiene (Den Boer *et al.*, 1989). La disminución del contenido en GSH podría reflejar una baja tasa de síntesis de GSH, relacionada con la tasa de gasto de GSH. Aunque la síntesis de GSH en las células germinales debe requerir compuestos exógenos, la adición de glicina, cisteína o glutamato, o de GSH a las incubaciones no previene la pérdida gradual de GSH intracelular. Además, el contenido de GSH no aumenta al emplear un análogo de la oxiprolina, la cual sirve como sistema de resparto de cisteína y puede causar un aumento de nivel del GSH en los linfocitos (Williamson *et al.*, 1982; Fidelus *et al.*, 1987). Den Boer *et al.* (1989) no explican la pérdida gradual de GSH de las células germinales por una ausencia completa de la síntesis en esas células, ya que se desconoce qué procesos bioquímicos determinan la pérdida de GSH de las células espermatoгogénicas: el GSH puede usarse como fuente intracelular de cisteína para su incorporación en de las proteínas, se puede implicar la salida de las células de compuestos relacionados con el GSH, incluyendo el glutatión oxidado (GSSG), disulfidos mixtos de GSH y conjugados de GSH (Meister y Anderson, 1983). Además, la glutatión-S-transferasa (GST) cataliza la conjugación entre el GSH y compuestos electroфílicos (revisado por Den Boer *et al.*, 1989). Por ejemplo, puede unirse al cadmio y, mientras que dosis reducidas son insuficientes para atrapar todo el GSH sintetizado, resultando en un aumento de GSH intracelular moderado, altas concentraciones, al atrapar más moléculas, llevan al descenso del GSH intracelular observado.

Arrigo (1998) señala que el nivel de GSH aumenta 3 veces cuando las células se vuelven quiescentes y diferenciadas. El GSH previene la apoptosis y mantiene la viabilidad celular en células sin el oncogen bcl-2 (una proteína capaz de bloquear el inicio de la apoptosis bajo algunos estímulos; Kane *et al.*, 1993) y su concentración disminuye bajo inducción de las células a apoptosis (Slater *et al.*, 1995). Las células privadas de GSH son más propensas a sufrir estrés oxidativo, porque su equilibrio redox está alterado y se ve perjudicada su capacidad para eliminar o detoxificar los diversos agentes oxidantes (ROS) intermediarios que se forman en el metabolismo celular normal (Ghibelli *et al.*, 1998). Una extrusión activa del GSH podría favorecer el inicio de la apoptosis al permitir pasivamente que tenga lugar el estrés oxidativo. También se ha observado que las células U937 y HepG2 inducidas a apoptosis extruyen GSH en forma reducida, pero pueden recuperar la viabilidad forzándose la permanencia del GSH dentro de las células mediante inhibidores de la extrusión de GSH mediada por transportadores (metionina y cistationina), capaces de disminuir el flujo de GSH a través de la membrana plasmática intacta (Ghibelli *et al.*, 1998).

Algunas células, mayoritariamente los hepatocitos, pueden extrusionar GSH reducido a través de transportadores específicos, manteniendo un nivel constante de GSH en la corriente sanguínea (Aw *et al.*, 1984). Las diferencias fisiológicas en el transporte de GSH en los 2 polos de los hepatocitos sugirieron la existencia de 2 sistemas distintos de transporte, posiblemente codificados por genes diferentes. Usando el sistema de expresión del ovocito de *Xenopus*, Fernández-Checa *et al.* (1993) identificaron una fracción de ARNm del hígado de rata que expresaba un sistema de transporte para el GSH (BSP-GSH). Posteriormente, Yi *et al.* (1994) detectaron una nueva familia de polipéptidos transportadores de GSH (RcGshT), que carecían de homología con la secuencia de transportadores conocidos, y su amplia distribución orgánica sugería que juegan un papel en el flujo de GSH en diversos tipos celulares.

IV.15.5. Modulación del GSH intracelular en el epitelio oviductal

El ambiente hormonal regula la fisiología del tejido uterino. Se ha observado que los estrógenos aumentan el peso uterino *in vivo* y los niveles de GSH en el tejido expuesto (Suojanen *et al.*, 1980). Además, se ha mostrado que el estatus de GSH en los hepatocitos de rata está regulado por varias hormonas (Lu *et al.*, 1990) y que las hormonas esteroideas gonadales (específicamente estradiol y testosterona), regulan el metabolismo hepato-renal del GSH (Hiramyana *et al.*, 1987) y de enzimas importantes en el mantenimiento del estatus y función del GSH, como la GSH-S-transferasa, γ -glutamyltranspeptidasa y GSH peroxidasa (Das *et al.*, 1982; Igarashi *et al.*, 1984). Toda esta información aporta evidencias de que la regulación del GSH en las células epiteliales del oviducto depende, posiblemente, del ambiente hormonal, y que la capacidad del epitelio oviductal para regularlo no solo debe ser esencial para la propia función celular, sino también para la modulación del ambiente oviductal (McNutt-Scott y Harris, 1998).

McNutt-Scott y Harris (1998) observaron en células del epitelio oviductal bovinas cultivadas *in vitro*, que el estado hormonal (folicular o luteal) y la región oviductal (ampulla o istmo) son importantes en la regulación del estatus tiólico en este tejido. Así, se observó una mayor depleción de los niveles de GSH en las células del epitelio oviductal en estadio luteal que en estadio folicular, y en la región ístmica que en la ampulla, sugiriendo que el turnover es mayor en células cultivadas a partir de dichos tejido y región. Los estadios tempranos de desarrollo embrionario preimplantacional ocurren en la región ístmica del oviducto (Fredericks, 1986).

Asimismo, en el estudio de McNutt-Scott y Harris (1998) se observó que la región ístmica mantenía niveles elevados de cisteína mientras que la ampulla manifestaba una disminución en cisteína intracelular. Esto sugiere que la cisteína se debe regular de forma diferente dependiendo de la región del oviducto y de la demanda de los procesos reproductivos. El estadio reproductivo no pareció influenciar el contenido en cisteína, hecho importante porque la cisteína, aunque es esencial para la síntesis de GSH, también se requiere para el propio desarrollo del embrión preimplantacional.

La capacidad disminuía de reestablecer los niveles de GSH en el oviducto sugeriría que este tejido debe ser sensible a los componentes químicos o las condiciones ambientales que llevan a un estrés oxidativo. Esto resultaría en una disminución de la función oviductal, y, en consecuencia, a una disminución de la fertilidad o desarrollo del embrión preimplantacional (McNutt-Scott y Harris, 1998).

IV.15.6. Síntesis del GSH durante la maduración ovocitaria: papel en la PIV

El poder reductor intracelular normalmente es mantenido por el glutatión reducido (GSH; Jocelyn, 1972). La síntesis de GSH intracelular durante la MIV ha sido descrita en varias especies: ratón (Calvin *et al.*, 1986), hámster (Perreault *et al.*, 1988), cerdo (Yoshida *et al.*, 1993a,b) y bovino (Miyamura *et al.*, 1995; De Matos *et al.*, 1996). Cabe destacar que los ovocitos de hamster madurados *in vitro* tienen una menor concentración de GSH comparado con los ovocitos madurados *in vivo* (Perreault *et al.*, 1988).

El contenido en GSH aumenta durante el desarrollo y la maduración del ovocitos en el ovario mientras el ovocito se aproxima al momento de la ovulación (Perreault *et al.*, 1988). En rata, se ha demostrado que el contenido de GSH en los ovocitos de rata disminuye entre la descondensación espermática y la formación nuclear, debido, probablemente, a una actividad incrementada de la GGT (Funahashi *et al.*, 1999). Así, el contenido en GSH reducido fue más alto en los ovocitos no fecundados (8.5 pmol/ovocito) y en ovocitos penetrados con un núcleo espermático descondensado (7.72 pmol/ovocito) que en los ovocitos en estadio pronuclear (5.93 pmol/ovocito), mientras que el contenido en GSSG oxidado no difirió entre los 3 tipos de ovocito.

Los espermatoцитos y las espermátides de hamster contienen grandes cantidades de GSH (~ 40 y 30 nmol GSH/mg proteína, respectivamente; Den Boer *et al.*, 1989). En este caso también se ha determinado que la concentración de GSH en el testículo de rata aumenta aproximadamente 3 veces entre los días 8 y 26 del desarrollo postnatal, coincidiendo con el inicio de la espermatogénesis, y se mantienen a un elevado nivel durante el posterior desarrollo testicular (Calvin y Turner, 1982).

En porcino, Yoshida *et al.* (1993) observaron que los ovocitos madurados e inseminados mostraban concentraciones más bajas de GSH que los madurados pero no inseminados, la cual cosa podría ser resultado del bloqueo de la síntesis de GSH inducida por la penetración espermática o, simplemente, reflejaría el uso de parte del GSH para descondensar los espermatozoides penetrados.

Los niveles de GSH en ovocitos bovinos también se modulan durante la maduración según Miyamura *et al.* (1995), siendo éstos superiores en ovocitos cultivados durante 18 h y 21 h respecto a los no cultivados, y tras la fecundación, siendo menores a las 6, 12 y 18 h que antes de la inseminación.

Fundamentalmente, la síntesis del GSH tiene 3 funciones a lo largo de la PIV:

- a) Participación en la descondensación de la cabeza del espermatozoide y en su posterior transformación a pronúcleo masculino
- b) Protección celular contra el daño oxidativo
- c) Papel en el desarrollo embrionario *in vitro*

IV.15.7. Mecanismos de descondensación de la cabeza del espermatozoide

Durante la espermiogénesis en mamíferos, las histonas somáticas del núcleo de las espermátides son sustituidas por una serie de proteínas básicas y, finalmente, por protaminas. Estas protaminas son proteínas nucleares altamente básicas que sirven para estabilizar el núcleo y mantener el ADN en una condición transcripcionalmente inerte de los espermatozoides de mamífero. En mamíferos euterianos, las protaminas no sólo son ricas en arginina, sino también en cisteína, y, además, contienen numerosos

grupos sulfhidrilos (revisado por Poccia, 1986). Durante la maduración del espermatozoide en el epidídimo, los sulfhidrilos de las protaminas inician la oxidación a disulfidos, resultando en una mayor estabilización del núcleo del espermatozoide (Calvin y Bedford, 1971; revisado por Bellvé y O'Brien, 1983). Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que las uniones disulfido de las protaminas deben ser reducidas durante la fecundación para proceder a la reactivación del núcleo del espermatozoide (revisado por Wolgemuth, 1983; Zirkin *et al.*, 1985). Datos histoquímicos han indicado que esa reducción de las uniones disulfido empieza brevemente después de que el núcleo del espermatozoide contacte con el ooplasma (Miller y Masui, 1982; Krzanowska, 1982). La reducción de las uniones disulfido de las protaminas es un prerequisite para la dispersión de la cromatina del espermatozoide o descondensación, y para la formación del pronúcleo masculino (Perreault *et al.*, 1984), para lo cual es necesario la reducción de los disulfidos a grupos -SH y la sustitución de protaminas por histonas maternas (Perreault *et al.*, 1987, 1988; Yoshida, 1993; Yoshida *et al.*, 1993a, Funahashi *et al.*, 1994a).

Durante la fecundación, el núcleo del espermatozoide se descondensa y se transforma en pronúcleo masculino. La formación del pronúcleo masculino depende de la activación del ovocito (Iwamatsu y Chang, 1975; Usui y Yanagimachi, 1976; Perreault *et al.*, 1984). Muchos estudios han demostrado que se necesita un agente reductor de disulfidos para descondensar el núcleo del espermatozoide *in vitro*, sugiriendo que la reducción de las uniones nucleares disulfido podría ser también un paso crítico en la promoción de la descondensación del núcleo del espermatozoide durante la fecundación (Calvin y Bedford, 1971; Mahi y Yanagimachi, 1975; Zirkin *et al.*, 1982; revisado por Longo, 1981). De hecho, se ha observado que durante la fecundación se producen cambios en la capacidad de tinción del núcleo del espermatozoide, sugestivo de reducción de las uniones disulfido (Miller y Masui, 1982; Krzanowska, 1982).

Perreault *et al.* (1984) estudiaron el papel de la reducción de las uniones disulfuro durante la descondensación del núcleo del espermatozoide mediante experimentos de microinyección espermática en ovocitos de hámster, y sugirieron que la descondensación de la cabeza del espermatozoide requería la reducción de las uniones disulfido, que los ovocitos en estadio de vesícula germinativa y en estadio pronuclear no tenían suficiente poder reductor para efectuar la descondensación y que la reducción de las uniones disulfido era requerida, pero no suficiente para la formación del pronúcleo. También se ha observado que el *timing* de descondensación del núcleo espermático y la formación del pronúcleo dependen en parte del contenido en uniones S-S del núcleo del espermatozoide, de modo que los núcleos ricos en uniones S-S requieren mayor tiempo para descondensarse y que, al contrario, los núcleos con pocas uniones S-S tienen mayor probabilidad de transformarse en pronúcleos masculinos en sincronía con la formación del pronúcleo femenino (Perreault *et al.*, 1987).

IV.15.8. Papel en la descondensación de la cabeza del espermatozoide

Mahi y Yanagimachi (1975) propusieron que el GSH podría jugar un papel en la descondensación del núcleo del espermatozoide bien por reducción de los enlaces disulfido de las protaminas o bien por activación de un enzima sulfhidril que segmentara los enlaces disulfido. Posteriormente, Weisel y Schultz (1981) demostraron la actividad de la glutatión reductasa en los ovocitos de ratón. La síntesis de GSH durante la maduración ovocitaria ha sido descrita, más tarde, como un prerequisite para la descondensación

de la cromatina espermática y el inicio de la formación del pronúcleo masculino tras la penetración del espermatozoide en ovocitos de ratón (Calvin *et al.*, 1986), hámster (Perreault *et al.*, 1984, 1988; Perreault, 1990) cerdo (Yoshida *et al.* 1992, 1993; Yoshida, 1993; Grupen *et al.*, 1994, 1995) y vaca (Miyamura, 1995; de Matos, 1995, 1996, 1997).

El tratamiento de ovocitos maduros de hámster *in vitro* con un oxidante específico del GSH, la diamida, inhibe reversiblemente la descondensación de núcleos de hámster microinyectados (Perreault *et al.*, 1984), y la depleción sistémica de GSH ovárico con L-butionín-S,R-sulfoximina (BSO), un inhibidor específico de la síntesis de GSH (Griffith y Meister, 1979), bloquea la descondensación de la cabeza del espermatozoide de ratón durante la posterior fecundación *in vitro* (Calvin *et al.*, 1986).

La capacidad para formar el pronúcleo masculino en ovocitos de cerdo está correlacionado positivamente con las concentraciones intracelulares de GSH (Yoshida, 1993; Funahashi *et al.*, 1994), porque el GSH induce la reducción de las uniones disulfido del núcleo del espermatozoide (Perreault *et al.*, 1984). La descondensación espermática debe tener lugar de forma más lenta o incompleta en ovocitos que contienen menos niveles de GSH de lo normal (insuficiente poder reductor), y esto debe resultar en el desarrollo asincrónico de los núcleos del ovocitos y del espermatozoide (Yoshida, 1993). Yoshida *et al.* (1993) concluyeron que suficiente GSH en el ovocito es importante para reducir y/o completar la descondensación del núcleo del espermatozoide en sincronización con la activación del ovocito, asegurando así la transformación de la cabeza fertilizante del espermatozoide en pronúcleo masculino.

La capacidad para descondesar la cabeza del espermatozoide en la mayoría de ovocitos de mamíferos depende directamente del estadio de maduración del ovocito. En experimentos de fecundación *in vivo* e *in vitro* y de microinyección espermática, se ha observado que la máxima actividad descondensante de la cabeza del espermatozoide se da en los ovocitos maduros, en metafase II, y que es mínima o ausente en ovocitos inmaduros, en estadio de vesícula germinal (Iwamatsu y Chang, 1972; Barros y unos, 1973; Niwa y Chang, 1975; Usui y Yanagimachi, 1976; Berrios y Bedford, 1979; Thadani, 1979; Balakier y Tarkowski, 1980). Además, la actividad descondensante disminuye tras la fecundación y está de nuevo ausente o disminuida en ovocitos en estadio de pronúcleos (Usui y Yanagimachi, 1976; Komar, 1982). La actividad descondensante de los ovocitos inmaduros y fecundados es aparentemente limitada por un fallo del ovocito para reducir suficientes uniones disulfido de las protaminas. En hámster, ninguno de los dos tipos de ovocitos soportó la descondensación de los núcleos de espermatozoides de la cauda epididimal (ricos en disulfidos), pero ambos tipos indujeron la descondensación de los núcleos de espermatozoides pobres en disulfidos o núcleos de espermatozoides de la cauda epididimal al ser tratados con tioles (Perreault *et al.*, 1984; Zirkin *et al.*, 1985). Los ovocitos de hámster ovulados, en metafase II, capaces de descondensar los núcleos de los espermatozoides de hámster, contienen más GSH, y además tienen más poder reductor que los ovocitos en vesícula germinal o en estadio pronuclear. Así, la síntesis de GSH durante los estadios iniciales de la maduración ovocitaria es responsable de los niveles más altos de GSH en los ovocitos maduros y es esencial para la adquisición de la capacidad de descondensación del núcleo del espermatozoide. Asimismo, la ausencia de efecto de BSO sobre los niveles de GSH o la actividad descondensante del espermatozoide en ovocitos en metafase II sugiere que el movimiento de GSH (síntesis

y degradación o exportación) es bajo en esos ovocitos, y que ellos ya contienen niveles de GSH suficientes para soportar la descondensación de la cabeza del espermatozoide (Perreault *et al.*, 1988).

Es importante señalar que la cantidad de GSH absoluta en el ovocito no es probablemente el único factor determinante en la capacidad descondensante, aunque sea aparentemente un factor limitante. Además, existen estudios en los que indican que la descondensación de la cabeza del espermatozoide en el ovocito es tiempo y temperatura dependiente, sugestivo de un requerimiento enzimático (Perreault *et al.*, 1987; Perreault y Zirkin, 1983). La actividad de la GSH reductasa fluctúa con el estado de maduración del ovocito (Weisel y Schultz, 1981), y probablemente sea importante para el mantenimiento del poder reductor de disulfidos del ovocito.

Por otro lado, el contenido en GSH intracelular no sólo afecta al desarrollo del pronúcleo masculino, sino también a la actividad de la histona H1 quinasa (H1K; Funahashi *et al.*, 1996), de la cual se ha descrito que afecta a la formación del pronúcleo masculino y el posterior desarrollo embrionario tras la penetración espermática (Naito *et al.*, 1992).

Las diferencias en los niveles de GSH en los ovocitos entre especies deben de estar correlacionadas con diferencias en la estabilidad de la cromatina espermática, en función del tipo de protamina presente. Se ha demostrado que, por ejemplo, las especies que contienen protaminas 1 y 2 (p.ej., ratón y hamster) descondensan más rápido tras la microinyección dentro del ovocito que los que solamente contienen protamina 1 (por ejemplo, el toro; Perreault, 1988). El semen de cerdo se parece al de toro en que sólo contiene protamina 1, y probablemente es más estable, por lo que requiere más GSH para la descondensación (Yoshida *et al.*, 1993).

IV.15.9. Papel en la protección celular contra el daño oxidativo

Algunos investigadores han sugerido una relación entre el bloqueo del desarrollo embrionario y un incremento en la formación de radicales libres en los embriones cultivados *in vitro* (Nasr-Esfahani *et al.*, 1990, 1991; Noda *et al.*, 1991; Umaoka *et al.*, 1992; Goto *et al.*, 1993), pero los mecanismos antioxidantes en los embriones aún son tema de discusión. Los intermediarios activos derivados del oxígeno (radicales superóxido $O_2^{\cdot -}$; radicales hidroxilo $\cdot OH$ y peróxido de hidrógeno H_2O_2) reaccionan con proteínas, lípidos y ADN, resultando en inactivación de enzimas, peroxidación de la membrana lipídica y alteraciones en el ADN. Las células han desarrollado su propio sistema de protección contra los productos de la oxidación del oxígeno: las células eucariotas contienen Cu/Zn SOD (superóxido dismutasa) en el compartimiento citosólico y GSH a elevadas concentraciones celulares en gran variedad de tejidos (Yu, 1994).

La modificación oxidativa de los componentes celulares mediante ROS (agentes oxidantes), produciendo estrés oxidativo, es uno de los procesos potencialmente más dañinos para la propia función celular. En la mayoría de las células, sistemas antioxidantes efectivos, como la superóxido dismutasa, la catalasa o componentes tiol que actúan como tampones metabólicos, pueden atenuar el estrés oxidativo mediante la eliminación de agentes oxidantes. Sin embargo, la capacidad antioxidante no es ilimitada, y el *pool* de tioles reducidos se agota rápidamente, mientras que se acumulan los productos de la oxidación de los disulfidos (Del Corso *et al.*, 1994). Se ha demostrado que el GSH protege a los gametos y embriones contra el daño

oxiradical por ROS (Nasr-Esfahani y Johnson, 1992; Griveau y Le Lannou, 1994; Luvoni *et al.*, 1996). El GSH juega un papel muy importante como antioxidante celular interaccionando con radicales superóxido e hidroxilos. Como sustrato en la reducción de H₂O₂ catalizada por la glutatión peroxidasa, el GSH detoxifica los peróxidos intracelulares. Se sintetiza intracelularmente y se transporta a través de las membranas (Meister, 1983). También se ha descrito un papel extracelular del GSH en la prevención de la peroxidación lipídica de membranas celulares por agentes oxidantes extracelulares (Thomas *et al.*, 1988; Avissar *et al.*, 1989). El GSH juega un papel importante en la defensa celular contra varios agentes peligrosos de origen exógeno u endógeno (Meister y Anderson, 1983; Lafleur, 1994) y contra los daños oxidativos causados por una gran variedad de medicamentos y productos químicos, pudiendo actuar como cofactor de las glutatión-S-transferasas o como agente reductor de las peroxidasas (revisado por Gaubin *et al.*, 2000).

IV.15.10. Papel en el desarrollo embrionario

El incremento en el contenido de GSH proporciona a los ovocitos madurados *in vitro* grandes cantidades de GSH adecuadas para la protección de los embriones hasta el estadio de blastocisto, mejorando la eficiencia de la producción *in vitro* de blastocistos a partir de ovocitos inmaduros (Telford, 1990; Gardiner, 1995a,b; de Matos, 1995, 1996).

El GSH se acumula en el ovocito durante su desarrollo en el ovario, protegiendo al ovocito en estadios posteriores de la fecundación (Telford, 1990; Gardiner, 1995a,b) y aumenta su capacidad para eliminar peróxido de hidrógeno citotóxico en el momento de la activación genómica en embriones de ratón (Nasr-Esfahani *et al.*, 1990), lo cual parece necesario para superar el bloqueo de desarrollo *in vitro* en el estadio de 2 células en ratón y rata (Shan *et al.*, 1990; Nasr-Esfahani *et al.*, 1992). Asimismo, se ha mostrado una disminución en el contenido de GSH tras la exposición de embriones de ratón a peróxido de hidrógeno exógeno (Nasr-Esfahani y Jonson, 1992). El GSH también juega un papel importante en la termotolerancia de los embriones murinos preimplantacionales (Arechiga *et al.*, 1995). Estos investigadores advirtieron que la síntesis de GSH era importante para el desarrollo embrionario, pero que la inhibición de la síntesis de GSH no hacía a los embriones más susceptibles al shock por calor. También se ha observado que el GSH en el fluido del tracto reproductivo femenino puede ayudar a proteger a los embriones preimplantacionales de ratón de los efectos adversos de la reducción de GSH embrionario endógena o inducida por tóxicos, ya que pueden utilizar *in vivo* el GSH de las secreciones del tracto reproductivo para recuperarse (Gardiner *et al.*, 1998). En el ratón, el GSH debe estar involucrado en varios eventos embrionarios, incluyendo la proliferación celular y la diferenciación en estadios preimplantacionales más tardíos, y debe participar en metabolismo generador de energía como constituyente de co-enzimas. También ha sido probado en ratas que la síntesis de GSH es esencial para el crecimiento normal, y que la depleción de GSH por BSO tiene un efecto embriotóxico (Slott y Hales, 1987).

Gardiner y Reed (1994) observaron que ovocitos de ratón fecundados *in vivo* y cultivados *in vitro* experimentan un bloqueo a las 2 células y muestran un contenido en GSH disminuido en comparación con los ovocitos desarrollados *in vivo*, sugiriendo que la disminución de los niveles de GSH es una respuesta de los embriones al estrés oxidativo. Estos mismos autores demostraron que los niveles de GSH en embriones de ratón disminuyen aproximadamente 10 veces durante el desarrollo preimplantacional desde el ovocito no

fecundado hasta el estadio de blastocisto, de 7 mM a 0.7 mM. Pese a ello, desconocían si este efecto era debido a una depleción del GSH almacenado en el ovocito combinado con la incapacidad del embrión para sintetizar GSH. En cambio, los embriones en estadio temprano acumulan grandes cantidades de GSH, originado en los ovocitos.

En bovino, Takahashi *et al.* (1993) sugirieron que los embriones con bajas concentraciones de GSH podrían haber estado sujetos a daños oxidativos, resultando en una baja tasa de desarrollo. Según Lim *et al.* (1996), el GSH, además de su papel como antioxidante, debe jugar un importante papel a nivel intracelular en estadios específicos del desarrollo embrionario bovino. Dichos autores demostraron que la concentración intracitoplasmática de GSH cambia durante el desarrollo preimplantacional en los embriones bovinos derivados de MIV-FIV. La síntesis de novo de GSH empieza a incrementar en el momento de la activación genómica en el estadio de 9 a 16 células (Telford *et al.*, 1990). Los embriones en este estadio parecen ser más resistentes al estrés oxidativo que los presuntos cigotos o blastocistos (Van Langendonck, 1998). La fluctuación de la concentración de GSH en los embriones bovinos es parcialmente consistente con la de los embriones de ratón, ya que en los embriones bovinos se halló una concentración mayor de GSH en estadio de 1 célula que en estadio de 2 a 8 células (Lim *et al.*, 1996). Sin embargo, los resultados del estudio de Lim *et al.* (1996) demuestran que la biosíntesis de GSH en el embrión bovino es diferente al del embrión de ratón, quizás porque los embriones bovinos utilizan ARNm originado de ambos genomas (embrionario y materno) para dicha síntesis. Estos hallazgos son respaldados por el estudio de Harvey *et al.* (1995) en el que se describe que los embriones preimplantacionales de vaca derivados de MIV-FIV expresan ARNm para la glutatión peroxidasa (GPX) y la glutamylcisteína sintetasa (GCS). Harvey *et al.* (1995) sugieren que las diferencias en la expresión génica entre los embriones preimplantacionales de ratón y de vaca pueden contribuir a la variación en la capacidad de estos embriones para desarrollarse *in vitro* en relación a los niveles de oxígeno y la dependencia del cocultivo.

Estudios realizados con ovocitos bovinos madurados *in vitro*, evaluando el efecto de la síntesis de GSH sobre el desarrollo embrionario y su congelabilidad, demostraron que un incremento de GSH durante la MIV mejoraba el desarrollo embrionario y su calidad, produciendo más embriones que alcanzaban el estadio de blastocisto el día 6, siendo este estadio el más adecuado para su congelación (De Matos *et al.*, 1996). También en porcino se ha indicado que el desarrollo embrionario mejora con el aumento de los niveles de GSH intracelular en los ovocitos, y se ha sugerido que la concentración de GSH intracelular puede ser un marcador valioso para valorar la competencia de desarrollo de los ovocitos tras la FIV (Abeydeera *et al.*, 1998). Sin embargo, Boquest *et al.* (1998) no vieron afectadas las concentraciones de GSH intracelular por la presencia de GSH, y la mayor producción de blastocistos no pareció ser resultado de un aumento de GSH intracelular dentro del ovocito. Extracelularmente, el GSH previene la peroxidación lipídica de la membranas celulares por ROS extracelulares (Thomas *et al.*, 1988; Avissar *et al.*, 1989). Actuando como antioxidante, el GSH pudo haber reducido la exposición de los ovocitos y los espermatozoides al estrés oxidativo antes de la fecundación, eliminando los ROS excesivos presentes en el medio, lo que habría llevado a mayores tasas de desarrollo.

IV.15.11. Butionín sulfomixina (BSO) y GSH

La L-butionín-S,R-sulfoximina (BSO) bloquea la síntesis de GSH mediante inhibición específica del primer enzima de su síntesis, la γ -glutamilcisteína sintetasa (Griffith y Meister, 1979), por lo que se ha usado ampliamente para disminuir el GSH en gran variedad de tejidos, tanto *in vivo* como *in vitro* (macrófagos: Rouzer *et al.*, 1981; eritrocitos: Griffith, 1981; ovocitos y ovarios: Calvin *et al.*, 1986; Slott y Hales, 1987; Perreault *et al.*, 1988; células de Sertoli y esperáticas: Den Boer *et al.*, 1989).

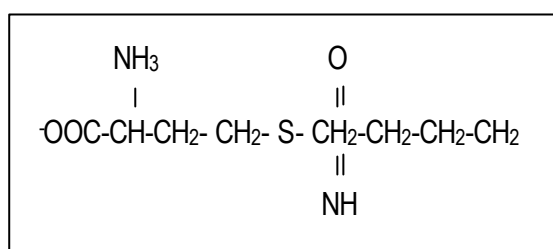


Figura 7. Estructura de la BSO

Se ha demostrado que el tratamiento con BSO bloquea la síntesis de GSH y previene la descondensación de los núcleos espermáticos inyectados en los ovocitos de hámster (Perreault *et al.*, 1988). Asimismo, la BSO neutraliza el efecto promotor de los compuestos tioles sobre el desarrollo y la síntesis de GSH de los ovocitos y embriones bovinos (Takahashi *et al.*, 1993; de Matos *et al.*, 1996).

Yoshida (1993) demostró que la síntesis de GSH ocurría a través de la maduración *in vitro* de los ovocitos porcinos, y que el GSH es un importante factor citoplasmático que regula la descondensación del núcleo espermático y la formación del pronúcleo masculino tras la penetración del espermatozoide. La adición de BSO a las 0, 12 y 24 h de la MIV disminuyó la concentración de GSH en los ovocitos comparado con el control, mientras que la expansión del cumulus, la maduración nuclear y la penetración no difirieron. Además, la disminución de GSH fue mayor al añadir BSO a las 0 y 12 h que a las 24 h, estando aún activa la síntesis de GSH en las fase tardías de la maduración (24 h). Estos datos ponen en evidencia que el GSH se sintetiza durante la maduración ovocitaria y que es un prerrequisito para los niveles más elevados de GSH en los ovocitos de cerdo maduros. Sin embargo, al analizar la adición de BSO a las 15, 18, 21 y 24 h, hubo menos cabezas condensadas y más pronúcleos en los dos últimos tratamientos que en los dos primeros. Esto sugiere que la síntesis de GSH durante las fases inicial y media de la maduración está relacionada con la adquisición de la capacidad de descondensación del núcleo espermático por parte de los ovocitos de cerdo. En bovino, Miyamura *et al.* (1995) también observaron que cuando los ovocitos se cultivaban en presencia de BSO, las tasas de maduración nuclear y penetración espermática tras la FIV no diferían, pero las tasas de ovocitos con cabezas espermáticas condensadas eran superiores, y las tasas de formación del pronúcleo masculino eran menores que en el control.

Sutovsky y Shatten (1997) mostraron que la depleción del GSH endógeno por 10 mM de BSO durante la maduración ovocitaria en bovino bloqueaba la formación del pronúcleo masculino en más del 85% de los ovocitos tratados (versus un 6.8% en el control) y prevenía un 35% del ensamblaje de los microtúbulos del aster espermático. En consecuencia, la migración y la aposición pronuclear no ocurrían. Las observaciones

ultraestructurales sugirieron que el efecto de la BSO sobre la aposición pronuclear podría deberse a una desconexión incompleta de la pieza que conecta la cola del espermatozoide, que normalmente lleva a la liberación del centriolo espermático y a la reconstitución del centrosoma cigótico durante la fecundación. La descondensación del núcleo espermático y el bloqueo de la migración se revertieron mediante el tratamiento de los ovocitos con GSH reducido con 1-10 mM de ditioneitol (DDT, un agente reductor de puentes disulfido) a las 8 h postinseminación: el 82% de estos ovocitos exhibieron un pronúcleo masculino normal y aposición nuclear tras 20 h de la inseminación. El *pool* de GSH parece generarse durante la maduración ovocitaria, ya que > 80% de los ovocitos que se maduraron en ausencia de BSO presentaron un pronúcleo masculino normal y aposición al pronúcleo femenino cuando se inseminaron y cultivaron en presencia de 10 mM de BSO. Estos datos sugieren que la reducción de las uniones disulfido en el espermatozoide tras la incorporación es importante para la formación del pronúcleo masculino, así como para la desconexión de la pieza que conecta la cola del espermatozoide y la aposición de los pronúcleos.

La falta de poder reductor de disulfidos en los ovocitos con GSH reducido puede ser revertido por tratamiento con agentes reductores de uniones disulfido. Sutovsky y Schatten (1997) hipotetizan que, posiblemente, las estructuras de la pieza que conectan la cola del espermatozoide son más sensibles a la reducción de las uniones disulfido que el núcleo espermático. Esta idea se soporta por el hecho de que el corto tratamiento de los ovocitos fecundados con una baja concentración de DDT (5 mM de DDT durante 5 min. 8 h. postinseminación) aumentó la tasa de aposición pronuclear sin mejorar la tasa de desarrollo del pronúcleo masculino. La reversión del bloqueo de la descondensación espermática con DDT sugiere una nueva alternativa para el tratamiento de la infertilidad idiopática en humanos (Sutovsky y Schatten, 1997), ya que previos estudios han mostrado que una cierta parte de los fallos de fecundación en humano se deben al bloqueo de la descondensación espermática y/o a la formación del áster espermático tras la penetración exitosa de un ovocito (Asch *et al.*, 1995; Simerly *et al.*, 1995).

La oxidación con diamida y yodoacetamida también ha sido empleada para inhibir la descondensación del núcleo espermático y la formación del pronúcleo masculino en ovocitos de hámster (Perreault *et al.*, 1984) y de ratón (Maleszewski, 1995). Además, en este último trabajo, la diamida también ejerció un efecto inhibitorio sobre el segundo huso meiótico y sobre la formación del pronúcleo femenino.

IV.15.12. Glutamina y GSH

La glutamina es un precursor de la síntesis de las hexosaminas. La adición de glutamina al medio de maduración podría interferir con la síntesis de GSH en vista de las evidencias obtenidas en otros tipos celulares (Bannai y Ishii, 1982). La cisteína y la glutamina comparten el sistema de transporte ASC (Bannai *et al.*, 1984; Bannai y Ishii, 1988), que es ubicuo en las células de mamífero, y especialmente reactivo con aminoácidos como la cisteína, serina y alanina (Christensen, 1984). La glutamina se transporta al interior de las células mediante el sistema de transporte alanina-serina-cisteína (ASC), y puede actuar como inhibidor competitivo de la captación de cisteína (Christensen, 1990). El elevado contenido en glutamina del medio de cultivo celular actúa competitivamente para limitar el flujo neto de cisteína vía sistema ASC y un exceso externo de glutamina podría también estimular la pérdida de cisteína celular mediante este sistema de transporte (Christensen, 1990). Esta acción probablemente explicaría la inhibición del crecimiento

fibroblástico en cultivo por 2.5 mM de glutamina (Bannai y Ishii, 1982). Un exceso de glutamina externo podría también estimular la pérdida de la cisteína celular vía sistema ASC (Bannai y Ishii, 1988). Es posible que estas hipótesis expliquen el bajo nivel de GSH intracelular en los ovocitos y células del cumulus cuando la glutamina está presente en el medio a altas concentraciones.

La inhibición de la síntesis de GSH mediante la adición de BSO resultó en una disminución de la expansión del cumulus. Furnus *et al.* (1998) opinan que la expansión del cumulus depende de sustratos presentes en el medio de MIV, como la glutamina, pero que el GSH se requiere para una expansión óptima, pudiendo explicarse por un efecto del GSH sobre el transporte de glutamina a través de la membrana plasmática, en vista del conocido efecto de este compuesto sobre el transporte de los aminoácidos (Meister, 1981). Los resultados del trabajo de Furnus *et al.* (1998) sugieren que el sistema de transporte ASC está también activo en las células del cumulus. En un estudio anterior, De Matos *et al.* (1997) sugirieron que este sistema de transporte estaba activo en los ovocitos bovinos, ya que la adición de cisteína ejercía un efecto estimulador del GSH en ovocitos desnudos.

IV.15.13. GSH y microtúbulos

Varios estudios han ligado al GSH con la polimerización y la función del huso mitótico (Oliver *et al.*, 1976; Onfelt, 1983; Luduena y Roach, 1991). La diamida se ha empleado como modelo con el que estudiar el papel del GSH en la moderación y/o protección contra el estrés oxidativo en ovocitos de hámster maduros durante el intervalo periferundación. Así, se ha demostrado que la oxidación del GSH inducida por diamida está asociada a alteración de los microtúbulos ovocitarios. Aunque los ovocitos de hámster demostraron capacidad para recuperar la homeostasis del GSH, un breve estrés oxidativo inmediatamente antes de la fecundación indujo anormalidades en los cigotos, consistentes en aneuploidías y un bajo desarrollo embrionario (Zuelke *et al.*, 1997). Ya que los microtúbulos también poseen grupos -SH, existe la posibilidad de que la diamida actúe oxidando directamente los husos de los microtúbulos además de, o en lugar de, actuar a través de la oxidación del GSH (Kosower *et al.*, 1969; Harris *et al.*, 1971; Kosower *et al.*, 1972).

En neutrófilos humanos, los microtúbulos no se pueden unir o mantener con niveles disminuidos de GSH. De este modo, la reducción de los niveles de GSH en un 30-70% en las suspensiones celulares inhibe la unión de los microtúbulos, y la vuelta a los niveles control de GSH se acompaña de la aparición de microtúbulos citoplasmáticos (Oliver *et al.*, 1976).

IV.15.14. GSH-células del cumulus

Se ha demostrado que las células del cumulus sintetizan elevadas concentraciones de GSH cuando los COCs de hámster (Zuelke y Perreault, 1994) y porcino (Funahashi y Day, 1995) se cultivan en presencia de gonadotropinas o cisteína. Existe una elevada correlación entre la concentración de GSH de los ovocitos y de las células del cumulus en el estadio temprano de los ovocitos porcinos (Funahashi y Day, 1994), por lo que se hipotetiza que el GSH se transfiere directamente desde las células del cumulus al ovocito mediante la unión cumulus-ovocito (Day y Funahashi, 1996). Además, ya que se ha demostrado que el grado de acoplamiento intercelular entre el ovocito y las células del cumulus alcanza un nivel mínimo antes de que se

complete la maduración ovocitaria (Mattioli *et al.*, 1988), los bajos niveles de concentración de GSH en el ovocito durante el último estadio de maduración pueden indicar que el GSH sintetizado en las células del cumulus se transfiera al ovocito (Sawai *et al.*, 1996).

En un estudio realizado con ovocitos bovinos por De Matos *et al.* (1997), se sugirió que solamente los COCs intactos podían utilizar los sustratos presentes en el medio TCM-199 para la síntesis de GSH durante la MIV. En ovocitos de vaca madurados *in vitro*, las comunicaciones cumulus-ovocito se interrumpen entre las 3 y las 12 h del inicio del cultivo (Hytzel *et al.*, 1986), perdiéndose la mayoría de ellas entre las 6-9 h (Sutovsky *et al.*, 1993). Por tanto, la incorporación disminuida de los aminoácidos en las proteínas sintetizadas de nuevo sigue a la desconexión de las uniones entre las proyecciones de las células del cumulus y el oolema (Wu *et al.*, 1996). Dado que la disminución de la síntesis proteica es más rápida en los ovocitos de ternera (Gandolfi *et al.*, 1998), podría hipotetizarse que tales comunicaciones se interrumpen más pronto en los ovocitos de ternera.

IV.15.15. Efecto de la adición de GSH en la PIV

IV.15.15.1. Antecedentes y modo de acción

Se ha demostrado que las células de los túbulos proximales del riñón, los enterocitos del intestino delgado y las células tipo II alveolares son capaces de tomar GSH intacto (Smith *et al.*, 1996). En concreto, en las membranas basolaterales renales e intestinales se ha identificado un transporte activo dependiente de Na⁺ (Lash y Jones, 1983). También Vincenzini *et al.* (1988) han detectado un transporte de GSH independiente de Na⁺ en las vesículas de las vellosidades de membrana en el intestino delgado de conejo. El transporte del tripéptido intacto se ha estudiado tras inactivación de la GGT. Ninguno de los 3 aminoácidos componentes ni gly-gly o gly-gly-gly compiten con el GSH para este transporte. Sólo el éster etil carboxi-terminal del tripéptido se ha identificado también como competidor con el GSH. Su grupo etilo se separa del éster sólo tras su entrada en el riñón o el hígado (Anderson *et al.*, 1985). Tales ésteres han sido descritos como vehículos para aumentar los niveles de GSH celular. El GSH está presente a 5-7 mM en el hígado, donde juega un gran papel en varios procesos de detoxificación y reguladores. Su éxodo del hígado representa la mayor parte del turnover hepático. El proceso de éxodo es saturable y está sujeto a una trans-estimulación y a una inhibición reversible, competitiva por bilirrubina no conjugada, por bromosulfaleína, y por varios compuestos aniónicos (Ookhtens *et al.*, 1988). La membrana plasmática canicular, junto al resto de la membrana plasmática, juega un papel en el transporte en el hepatocito de Glu- y Gly-. Aunque el significado funcional de este proceso no está definido, debe significar la recuperación de estos aminoácidos a partir de la división del GSH excretado a la bilis (Ballatori *et al.*, 1986; Moseley *et al.*, 1988).

IV.15.15.2. GSH en la PIV

Los ovocitos y la mayoría de células somáticas de mamíferos no pueden captar GSH intacto, ya que no poseen un sistema de transporte para importar GSH directamente al interior del citoplasma (De Felici *et al.*, 1987; Meister, 1991; Anderson y Meister, 1995). Sin embargo, el metabolismo extracelular o de membrana

del GSH puede formar productos como la γ -glutamilcisteína, cisteinilglicina o cisteína, que pueden ser transportados dentro de las células y utilizados para la biosíntesis de GSH (Anderson y Meister, 1995).

Según Kacser y Burns (1977) existe la posibilidad de que la síntesis de GSH no esté limitada solamente por un único precursor, como el nivel de cisteína, sino también a la adición de glicina. Para la síntesis de GSH, el flujo transmembrana limitante de los aminoácidos precursores de fuera de las células parece implicar en gran parte a la cisteína y apenas al glutamato o glicina. Christensen (1990) enfatiza que incluso la capacidad de una célula para sintetizar un metabolito, como la cisteína, no garantiza la adecuación de su suministro o concentración independiente del transporte de membrana.

Diversos estudios han analizado el efecto de la adición de GSH en el medio de maduración, capacitación espermática, fecundación o cultivo embrionario *in vitro*, tal y como se describe en los siguientes apartados.

IV.15.15.2.1. GSH en el medio de MIV

Luvoni *et al.* (1996) hallaron que la adición de GSH exógeno al medio de MIV no aumentaba la proporción de ovocitos que se dividían y desarrollaban posteriormente *in vitro*, pudiendo explicarse por el hallazgo de Zuelke y Perreault (1994) en hámster, quienes demostraron que las células del cumulus que rodean a los ovocitos son ricos en GSH. Esto debería ser suficiente para proteger a los ovocitos del daño de los radicales libres, como se había descrito anteriormente en ratón (Legge, 1989). Asimismo, en dicho estudio, se detectó producción de peróxido de hidrógeno en ovocitos y cigotos, con niveles aumentados en estos últimos, pero no en el cumulus oophorus. El medio comercial empleado, TCM 199, contiene una pequeña cantidad de GSH (0.05 mg/l) y de su precursor, la cisteína (0.11 mg/l), por lo que Luvoni *et al.* (1996) manifiestan que la presencia de GSH podría ser suficiente para proteger a los ovocitos del estrés oxidativo y la cisteína podría mantener un buen nivel de síntesis de GSH durante la MIV.

IV.15.14.2.2. GSH en el medio de FIV

La presencia de altas concentraciones de ácidos grasos insaturados en la membrana plasmática, combinada con un limitado espacio citoplasmático, hace que los espermatozoides sean particularmente más susceptibles al estrés oxidativo mediante peroxidación lipídica (Aitken, 1994). Los efectos de peroxidación incluyen pérdidas de motilidad irreversibles, inhibición de la respiración, dispersión de los enzimas intracelulares y daño en la cromatina (Al-Somai *et al.*, 1994). El plasma seminal contiene sustancias antioxidantes que protegen contra el daño oxidativo producido por ROS, pero éste es eliminado durante los procedimientos de preparación de espermatozoides en la reproducción asistida. La función antioxidante del GSH también protege a los espermatozoides de la peroxidación lipídica (Alvarez y Story, 1984), por lo que es valiosa su adición en sistemas de FIV.

Los ROS pueden afectar al semen beneficiosa o perjudicialmente dependiendo del balance entre la tasa de su generación y eliminación y pueden ser responsables de la motilidad espermática reducida (De Lamirande y Gagnon, 1992; Iwasaki *et al.*, 1992), peroxidación lipídica (Alvarez *et al.*, 1987; Aitken *et al.*, 1993), disminución de la capacidad de fusión espermatozoide-ovocito (Aitken y Clarkson, 1987; Aitken *et al.*, 1989) y retraso en el desarrollo embrionario (Pabon *et al.*, 1989; Noda *et al.*, 1991). Los mecanismos de daño a

los espermatozoides inducidos por ROS incluyen un ataque oxidativo sobre los lípidos de la membrana plasmática de los espermatozoides, que lleva al inicio de una cascada de peroxidación lipídica, como consecuencia de la cual estos espermatozoides pierden su capacidad para el movimiento, la reacción acrosómica y la fusión espermatozoide-ovocito (Jones *et al.*, 1979; Aitken y Clarkson, 1988; Aitken *et al.*, 1993a). Los eventos de fusión de membranas involucrados en la fusión con el oolema y la reacción acrosómica parecen ser más vulnerables al daño inducido por ROS que su motilidad total (Aitken *et al.*, 1989). Además, los ROS también afectan al axonema espermático, inhiben la función mitocondrial y afectan a la síntesis de ADN, ARN y proteínas (de Lamirande y Gagnon, 1992a).

Estudios realizados por Aitken y Clarkson (1987) y por Alvarez *et al.* (1987) demostraron que los espermatozoides humanos pueden generar ROS. Los ROS responsables del estrés oxidativo parecen derivar de la excesiva actividad del sistema generador de superóxidos localizado en la membrana plasmática del espermatozoide (Alvarez *et al.*, 1987; Aitken *et al.*, 1992b; Iwasaki y Gagnon, 1992). El peróxido de hidrógeno es el mayor ROS responsable del daño de los espermatozoides (Aitken *et al.*, 1993). Además, los leucocitos seminales, particularmente los neutrófilos, que contaminan la mayor parte de las suspensiones de espermatozoides humanos, pueden contribuir significativamente a los ROS (Aitken *et al.*, 1992a; Kessopoulou *et al.*, 1992). La generación de ROS por las suspensiones de espermatozoides humanos está correlacionada con el potencial fecundante de los espermatozoides humanos *in vitro* (Aitken y Clarkson, 1987a,b) y, en estudios prospectivos a largo plazo, *in vivo* (Aitken *et al.*, 1991). En estudios con pacientes infértiles, la producción incrementada de ROS se correlacionó negativamente con el éxito en la FIV humana (Sukcharoen *et al.*, 1995) y con el logro de la gestación en estudios complementarios prospectivos (Aitken *et al.*, 1991).

El GSH también juega un papel importante en las defensas antioxidantes del epitelio espermátogénico, el epidídimo, y quizás en el espermatozoide eyaculado, por lo que el uso de antioxidantes *in vitro* parece ser valioso en la preservación de la capacidad fecundante, y el GSH administrado *in vivo* a pacientes con infertilidad secundaria por un excesivo estrés oxidativo parece actuar en el epidídimo y durante la espermátogénesis, para mejorar la función de los espermatozoides eyaculados (Irvine, 1996).

Sutovsky y Schatten (1997) sugirieron que el GSH es importante para el desmontaje del axonema espermático, la posterior formación del aster espermático y la aposición pronuclear. Debido a que la presencia de BSO, un inhibidor de la síntesis de GSH, durante la FIV no afectaba el desarrollo del aster espermático ni a la aposición pronuclear, se sugirió que el *pool* de GSH generado durante la MIV debía ser muy importante para el proceso de fecundación.

Estudios en bovino (Earl *et al.*, 1997; Van Soom *et al.*, 1998; Taneja *et al.*, 2000) y porcino (Boquest *et al.*, 1998) han demostrado que la adición de GSH al medio de preparación de los espermatozoides o al medio de FIV aumenta la producción *in vitro* de blastocistos. Earl *et al.* (1997) observaron que la adición de GSH durante la separación de los espermatozoides móviles con Percoll mejoraba la producción de blastocistos y opinaron que este hallazgo se debía posiblemente a la protección del semen del daño producido por radicales libres. Sin embargo, Van Soom *et al.* (1998) hallaron que el GSH ejercía una influencia positiva sobre la formación de blastocistos y la eclosión cuando se añadía durante la fecundación, pero no se halló ningún efecto cuando se añadió durante la preparación espermática. Estos autores concluyeron que los

espermatozoides dañados o anormales podrían ser una fuente de ROS, y que era lógico asumir que los espermatozoides tienen más oportunidad para generar ROS durante las 24 horas de fecundación que durante los 30 minutos de separación por Percoll. Así, la eliminación de ROS mediante GSH podría, por tanto, ser más efectiva durante un período prolongado de co-incubación ovocito-espermatozoides. Aunque la calidad embrionaria (evaluada por ausencia de fragmentación y número de células de la masa celular interna) no mejoró por adición de GSH durante la FIV, el número total de células mejoró por adición de GSH durante la separación con Percoll. En porcino, Boquest *et al.* (1998) no hallaron un aumento en la tasa de blastocistos o en el número de células al añadir GSH (0.25 mM) durante el lavado espermático, atribuyendo las discrepancias entre estudios a diferencias en los espermatozoides o a los procedimientos laborales empleados.

La inclusión de GSH en el medio FIV presenta un efecto toro-dependiente, de modo que el porcentaje de blastocistos depende de la fuente de semen utilizada, mostrando un efecto positivo, negativo o ausencia de efecto en función del toro donante (Kim *et al.*, 1999). Este efecto toro-dependiente está relacionado con las diferencias en la producción de cantidades ROS por espermatozoides de diferentes toros. El efecto positivo del GSH fue también concentración-dependiente, sugiriendo que una excesiva eliminación de ROS tiene un efecto negativo sobre el resultado de la PIV, pudiendo estar esto relacionado con el hecho de que los ROS son necesarios para la adquisición de la capacidad fertilizante por los espermatozoides (De Lamirande y Gagnon, 1995). Además, se ha observado que el peróxido de hidrógeno es requerido para la inducción de la capacitación en hámsters (Bize *et al.*, 1991) y humanos (Griveau *et al.*, 1994), que la capacidad antioxidante de la vitamina E tiene un efecto negativo sobre la FIV en bovino (Dalvit *et al.*, 1998), que una adición excesiva de antioxidantes disminuye la capacitación espermática, presumiblemente por reducción de la acción desestabilizante de membrana de los ROS (Aitken, 1994) y que la eliminación de peróxido de hidrógeno del medio FIV reduce la penetración de los ovocitos bovinos (Blondin *et al.*, 1997). Por tanto, un delicado balance entre la cantidad de ROS generada y eliminada determina si el resultado final es beneficioso o perjudicial. Se ha observado un incremento relativamente limitado de GSH intracelular, debido probablemente a la ruptura de GSH en el medio seguida por la captación de los productos y la resíntesis de GSH, asumiendo que el GSH no es tomado intacto por las células (Meister, 1988). El hecho de que la adición de precursores de GSH al medio (Takahashi *et al.*, 1993; De Matos *et al.*, 1996) resulte en mayores concentraciones intracelulares de GSH que las medidas en este estudio indican que la adición de GSH al medio no es eficiente en términos de incrementar la concentración de GSH en los ovocitos.

La adición de GSH durante la FIV de ovocitos bovinos cultivados individualmente en una gota, pero no en un sistema de FIV de ovocitos en grupo, incrementó la proporción de fecundación normal (2 pronúcleos y cola) y disminuyó la fecundación poliespérmica comparado con la adición de hipotaurina y con el control (Fukui *et al.*, 2000).

Aunque los ovocitos madurados de hámster demostraron la capacidad para recuperar la homeostasis de GSH, una breve exposición de ovocitos de hámster a diamida, un oxidante de GSH relativamente específico, inmediatamente antes de la penetración de ovocitos de hámster, indujo anomalías cigóticas consistentes en aneuploidías y un desarrollo embrionario desfavorecido (Zuelke *et al.*, 1997). Posiblemente, ya que los espermatozoides son particularmente susceptibles al estrés (Aitken, 1994), lo cual conlleva un

daño en la cromatina (Al-Somai *et al.*, 1994), es posible que el GSH hubiera actuado protegiendo a la cromatina espermática antes de la penetración.

En porcino, Boquest *et al.* (1998) observaron una mayor tasa de producción de blastocistos tras MIV-FIV de ovocitos porcinos al añadir GSH en las gotas de inseminación a concentraciones de 0.125 y 0.25 mM comparado con el control, pero las tasas de penetración, poliespermia, formación del pronúcleo masculino o división embrionaria no se vieron afectadas, por lo que las mayores tasas de blastocistos no se pueden atribuir a mejoras en la dinámica de la fecundación durante la FIV. El número de células de la masa celular interna y del trofoectodermo de los posteriores blastocistos no mejoró como resultado del tratamiento con GSH. Estos resultados son comparables con los obtenidos en vaca, en que se observó que la presencia de GSH en el medio de fecundación doblaba las tasas de producción de blastocistos pero no mejoraba el número de células de los blastocistos (Van Soom *et al.*, 1998). No obstante, en un estudio anterior en vaca, Luvoni *et al.* (1996) no tuvieron efectos beneficiosos al añadir 1 mM de GSH durante la FIV. Boquest *et al.* (1998) tampoco mejoraron la proporción de formación de blastocistos al añadir 0.5 mM de GSH al medio de FIV, lo que indicaría que los efectos beneficiosos del GSH durante la inseminación posiblemente se eliminen al añadir GSH a elevadas concentraciones (Boquest *et al.*, 1998). Es posible que una alta concentración de GSH pueda interrumpir el proceso de capacitación espermática, llevando a bajas tasas de penetración (Boquest *et al.*, 1998).

IV.15.15.2.3. GSH en el medio de CIV

Aunque se ha demostrado ampliamente que la baja concentración de oxígeno tiene un efecto beneficioso sobre el desarrollo embrionario *in vitro* (Pabon *et al.*, 1989; Thompson *et al.*, 1990; Batt *et al.*, 1991; Tervit *et al.*, 1972), los ovocitos y los embriones están expuestos inevitablemente a más oxígeno y otros daños *in vitro* que *in vivo*, debido a las manipulaciones necesarias con la exposición transitoria a oxígeno atmosférico y luz visible. Se sabe que la iluminación aumenta la generación de radicales del oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 1989) y que la luz visible tiene efectos en la producción de radicales de oxígeno en el cultivo de embriones de hámster y ratón (Goto *et al.*, 1993; Nakayama *et al.*, 1994). La protección de los embriones del estrés oxidativo debe ser un prerequisite para el desarrollo *in vitro*, porque son extremadamente sensibles a los aniones superóxido.

El GSH sirve como forma de almacén y transporte de la cisteína, protege a las células de los ROS como tampón redox y funciona en la reproducción y desarrollo temprano (Gardiner y Reed, 1994). El embrión preimplantacional de ratón no tiene la capacidad para sintetizar GSH de novo hasta el estadio de blastocisto, así que los embriones preimplantacionales que se desarrollan *in vitro* podrían ser sensibles a los agentes que disminuyen el GSH, como los ROS, incluso a bajo nivel. Estudiando el efecto del GSH extracelular sobre el desarrollo embrionario *in vitro*, algunos autores han mostrado una mejora en el desarrollo de los cigotos de ratón tras el bloqueo a las 2 células hasta el estadio de blastocisto (Nasr-Esfahani y Johnson, 1992).

La eficacia del GSH exógeno para aumentar el desarrollo enfatiza un posible papel extracelular, ya que la mayoría de células no pueden captar GSH intacto (Meister, 1983) y la adición de GSH no aumenta el nivel intracelular en los embriones de ratón tras una reducción (Gardiner *et al.*, 1998). El GSH extracelular puede

eliminar de forma no enzimática ROS del medio o sobre la superficie extracelular de los embriones, previniéndolos del daño causante, como la peroxidación lipídica sobre la superficie embrionaria (Thimas y Reed, 1990). Otros estudios han demostrado que el GSH extracelular protege las proteínas de superficie de la célula del daño oxidativo (Smith *et al.*, 1996).

Luvoni *et al.* (1996) demostraron un efecto positivo sobre el desarrollo blastocitario cuando el GSH se añadía durante el cultivo embrionario *in vitro*, mientras que la adición de GSH durante la MIV o la FIV no tenía efecto. Estos autores hallaron el mayor efecto al añadir el GSH el día 6 postinseminación. Uno de los efectos del GSH es la reducción del H₂O₂ actuando como sustrato de la GSH peroxidasa. El día 6 postinseminación se corresponde con el momento en que los embriones progresan del estadio de 8-16 células hasta el estadio de mórula, siendo la fase en que podrían ser más sensibles al estrés oxidativo. En contraste, la inclusión de GSH en el medio definido de CIV 5 días después del inicio del cultivo no mostró efecto beneficioso sobre el desarrollo de embriones bovinos (Brackett *et al.*, 1995).

Legge y Sellens (1991) apuntaron que la adición de GSH a un medio sin suero para el cultivo de embriones de ratón promovía el desarrollo hasta el estadio de mórula o blastocisto. Dichos autores sugieren que el bloqueo de las 2 células en embriones de ratón cultivados *in vitro* es consecuencia, al menos en parte, del daño de los radicales libres que sucede en los embriones durante la recogida y el cultivo, y que la suplementación del medio con el GSH, que elimina radicales, puede mejorar el desarrollo *in vitro*. Así, la adición de 1 mM de GSH promovió el desarrollo hasta mórula o blastocisto en el 50% de los cigotos cultivados en un medio sin suero y con una tensión normal de oxígeno (20%).

Lee *et al.* (2000) estudiaron el efecto de la adición de GSH en el medio de cultivo embrionario sobre el desarrollo de embriones tempranos de cabras adultas superovuladas y hallaron que la ausencia de GSH no permitía el desarrollo de los embriones más allá del bloqueo de las 8-16 células, mientras que la adición de GSH mejoraba el desarrollo *in vitro* de los embriones tempranos hasta el estadio de blastocisto. La acción del GSH dependió de la presencia y fuentes proteicas añadidas al medio de cultivo, de modo que con la adición de un 10% de FCS se consiguió un 91% de blastocistos a partir de los embriones tempranos con una media celular de 185 ± 12 células. Por lo tanto, se demostró que el GSH podía mejorar el desarrollo *in vitro* de los embriones de cabra tempranos actuando específicamente sobre el estadio de bloqueo de 8-16 células, sugiriendo que el GSH debe ser uno de los reguladores más importantes sobre el desarrollo *in vivo* de los embriones de cabra. Lee *et al.* (2000) apuntan la posibilidad de que el GSH extracelular pueda actuar indirectamente sobre los embriones mediante la albúmina sérica y/u otras proteínas. Además, se ha sugerido una actividad enzimática no oxidante (p.ej. actividad tiol peroxidasa unida a GSH) de la albúmina (Cha y Kim, 1996), por lo que la albúmina sérica y/o sus proteínas séricas relacionadas podrían eliminar el GSH.

IV.15.16. Efecto de la adición de tioles en la PIV

La disponibilidad de aminoácidos precursores es un factor regulador en la síntesis de GSH, y es muy probable que en las células de mamíferos los aminoácidos suministrados desde fuera de la célula sean un punto de control (Bannai, 1986).

Entre otras funciones, los componentes tioles se consideran como reservas naturales de poder reductor, los cuales pueden ser rápidamente utilizados por la célula como defensa contra el estrés oxidativo. Sin embargo, esta capacidad antioxidante no es ilimitada, y el *pool* de tioles reducidos se agota rápidamente mientras que los disulfidos productos de la oxidación se acumulan (Del Corso *et al.*, 1994).

Takahashi *et al.* (1993) comprobaron que la BSO, inhibidor específico de la síntesis de GSH, neutralizaba el efecto promotor de los compuestos tioles sobre el desarrollo y la síntesis de GSH en embriones bovinos.

IV.15.16.1. Cisteína

IV.15.16.1.1. *Propiedades*

El GSH se sintetiza en el ciclo γ -glutamil (Meister, 1983; Meister y Tate, 1976; Chance *et al.*, 1979), y su síntesis depende de la disponibilidad de cisteína en el medio. En estudios realizados en linfocitos, se ha demostrado que la cisteína presente en el medio se oxida fácilmente, bajo condiciones normales de cultivo, para formar rápidamente cistina (Toohey, 1975; Mohindru *et al.*, 1985), y que, tras esto, la síntesis de GSH intracelular está inhibida porque los linfocitos no pueden utilizar cistina para ello (Ishii *et al.*, 1991).

La concentración de cisteína en el medio TCM199 utilizado por rutina en la MIV de ovocitos bovinos es muy baja (0.6 μM) comparada con la de cistina (83.2 μM). Fuera de la célula, la cisteína es inestable y, en consecuencia, no hay cisteína libre en el medio debido a la autooxidación a cistina (Sagara *et al.*, 1993; Bannai, 1984). Es posible que esta cistina se convierta a cisteína por las células del cumulus y se incorpore a la síntesis de GSH durante la MIV (Yoshida, 1993; Takahashi *et al.*, 1995). Bajo condiciones fisiológicas, solamente un 10-20% de la cistina libre total está presente en forma reducida (Meier y Issels, 1995).

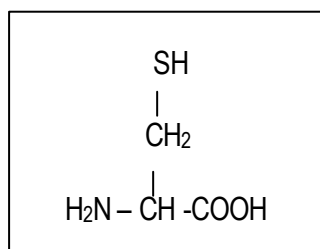


Figura 8. Estructura de la cisteína

IV.15.16.1.2. *Antecedentes y modo de acción*

Como hemos comentado anteriormente, la biosíntesis de GSH se limita a la disponibilidad de cisteína. Bajo condiciones en las que el suministro de cisteína celular es insuficiente, se supone que la promoción de la captación de cisteína por otros compuestos químicos incrementaría los niveles de GSH.

Se han propuesto diversos derivados de la cisteína como sistemas de distribución para la cisteína. La administración de tiazolidinas, formas circulares derivadas de la cisteína, puede promover la biosíntesis de GSH (Williamson *et al.*, 1982). Tras entrar en las células, las tiazolidinas se dividen intracelularmente y se libera cisteína. Algunos ésteres de cisteína pueden actuar como sistemas de distribución de cisteína y elevar la cisteína y el GSH intracelulares (Butterworth *et al.*, 1993). Además, la administración extracelular

de ésteres monoetil o dietil de GSH puede aumentar los niveles de GSH intracelular más que el GSH por sí mismo (Levy *et al.*, 1993).

Para la promoción de la captación de cisteína, los sistemas de transporte celular son de importancia crítica. En soluciones acuosas ocurre una rápida autooxidación de la mayor parte del tiol libre cisteína a cistina. Por tanto, bajo condiciones fisiológicas, sólo un 10-20% de la cisteína libre total está presente en forma reducida (Bannai, 1984). Tras la entrada a la célula, se supone una rápida reducción de la cistina a cisteína.

La cistina y la cisteína se captan por diferentes sistemas de transporte, sin que se hayan demostrado interacciones entre los sistemas. En general, los sistemas de transporte varían de forma considerable entre tejidos. La captación de cistina puede estar mediada por el sistema de transporte Xc- en intercambio con el glutamato (Makowski y Christensen, 1982). El sistema de captación es Na⁺-independiente y está compartido por el homocisteato y el α -aminoadipato. Algunas células expresan una alta actividad para este transporte de intercambio aniónico (ej.: los fibroblastos), en otras células es fuertemente inducible (ej.: macrófagos), mientras que otros tipos celulares carecen de este transporte (ej.: linfocitos) (Watanabe y Bannai, 1987; Gmunder *et al.*, 1991; Ishii *et al.*, 1992).

La cisteína se transporta al interior de las células por un sistema de transporte totalmente diferente del Xc-. El sistema ASC (alanina, serina, cisteína) transporta aminoácidos neutros y es Na⁺-dependiente (Christensen *et al.*, 1967). La alanina, serina y la cisteína comparten este sistema de transporte, que se distribuye de manera ubicuitaria entre los tipos celulares. La cisteína extracelular puede reaccionar espontáneamente con otros compuestos tioles para formar disulfidos mixtos bajo ciertas condiciones. Los disulfidos pueden captarse por el sistema de transporte L, que se ha demostrado que es Na⁺-independiente para el disulfido de cisteamina y cisteína (Pisoni *et al.*, 1985). En algunas células, la cisteína se transporta por el sistema Na⁺-dependiente ASC, un sistema especialmente reactivo con aminoácidos dipolares de longitud molecular corta o media. Aunque ocurre un considerable intercambio transmembrana con la transestimulación vía sistema ASC, tienden a generarse gradientes fuertes. Los flujos de cisteína y los gradientes están influenciados necesariamente por los niveles de otros sustratos del ASC que compiten y se intercambian por el mismo sistema.

Los eritrocitos humanos captan cisteína principalmente por un sistema Na⁺-dependiente de tipo ASC (Christensen *et al.*, 1967; Young *et al.*, 1980). La cistina extracelular, el disulfido, apenas tienen acceso al eritrocito humano. En otras especies, como caballo y ovejas (Fincham *et al.*, 1985), un sistema comparable de transporte de cisteína (denominado ASC) es Na⁺-independiente y parece ser equivalente al sistema del mismo nombre en los eritrocitos nucleados de paloma (Vadgama *et al.*, 1985). El suministro de GSH necesario para la viabilidad y función parece ser la principal justificación biológica para la retención por parte de los eritrocitos maduros de mamíferos de parte de su capacidad en estados eritroides para captar aminoácidos selectivamente.

Las células de ovario de hámster chino (células CHO) se han utilizado como sistema modelo para el estudio de la promoción de cistina/cisteína *in vitro* en las células de mamífero. Las células tienen una capacidad limitada para utilizar la cistina extracelular (Issels *et al.*, 1988). La adición de los tioles cisteamina y N-acetilcisteína (Issels *et al.*, 1988) al medio promueve la captación de [35cistina] comparado con las células control no tratadas. Otros tioles como el ácido dihidrolipoico, Mesna (Meier y Issels, 1995) y el WR-1065

(Issels y Nagele, 1989) promueven la captación de cistina. La estructura molecular común compartida por tales compuestos que promueven la captación de cistina en las células CHO es el grupo libre SH. La modificación del grupo tiol libre por reacción química para formar una unión disulfido o la adición de un fosfato al grupo tiol abole el potencial del compuesto para promover la captación de cistina en las células CHO. De este modo, el ácido α -lipoico, la N,N-diacetilcisteína (Meier y Issels, 1995) y el WR-2721 (Issels y Nagele, 1989) no muestran ningún efecto en la captación de cistina.

Se ha demostrado que la adición de tioles extracelulares al medio influyen los niveles de GSH intracelular de las células CHO (Issels *et al.*, 1985). Así, el contenido en GSH intracelular aumenta durante la exposición a los tioles cisteamina y N-acetilcisteína. El GSH celular total de las células CHO aumenta 2 veces tras la exposición a los tioles. La adición al medio de BSO, un inhibidor irreversible de la biosíntesis de GSH, inmediatamente antes de la adición de cisteamina y N-acetilcisteína, puede bloquear completamente el aumento de GSH. Esto demuestra que el aumento de GSH mediado por cisteamina y N-acetilcisteína es dependiente de la biosíntesis de GSH. Además, la utilización de cistina marcada radioactivamente del medio para la biosíntesis de GSH demuestra que más del 90% de la radioactividad de la 35S en la fracción soluble de las células lisadas podría recogerse en el pico de GSH, demostrándose que el GSH sintetizado de nuevo deriva del *pool* extracelular de cistina (Issels *et al.*, 1988).

La captación de cistina en presencia de cisteamina o N-acetilcisteína es dependiente de los sistemas de transporte de aminoácidos de las células CHO. La adición de L-alanina, L-serina y L-leucina redujo la tasa de captación de la cistina, mientras que el L-glutamato o el DL-homocisteato no mostraron efectos. Por tanto, para la captación promovida por cisteamina o N-acetilcisteína ocurre en mayor parte probablemente en forma de cisteína, que se transporta principalmente mediante el sistema ASC en la mayoría de tipos celulares. Además del sistema ASC, también es probable la captación de disulfidos mixtos (ej.: cisteína-cisteamina, cisteína-N-acetilcisteína) mediante el sistema L. En conclusión, la promoción de la captación inducida por tioles extracelulares en las células CHO necesita 2 pasos diferentes: primero, la formación de cisteína y disulfidos de cisteína mixtos por reacción de los tioles añadidos con la cistina extracelular y, segundo, la captación de cisteína y/o los disulfidos mixtos mediante los sistemas de transporte celulares.

La efectividad de la adición de cisteína respecto a la adición de GSH estaría de acuerdo con De Felici *et al.* (1987), quienes indicaron que la permeabilidad de las membranas plasmáticas al GSH es baja, y con los hallazgos de Meister (1983), quien indicó que las concentraciones de GSH intracelular dependían de la disponibilidad de cisteína.

En la mayoría de los tipos celulares eucarióticos la cisteína se toma del medio extracelular, pero algunas células (ej.: hepatocitos) son capaces de sintetizar cisteína a partir de la metionina mediante la vía cistationina. Aunque existen varias vías que contribuyen al catabolismo de la L-cisteína, uno de los productos formados es la taurina, y uno de los intermediarios claves, el L-cisteinsulfinato, se descarboxila para producir también taurina (Weinstein *et al.*, 1988). Uno de los mayores usos metabólicos de la cisteína es la síntesis de GSH. El incremento en la concentración de GSH observado en hígados de ratas sépticas podría proteger contra el daño oxidativo inducido por sepsis (Ogilvie *et al.*, 1991). El nivel de cisteína se regula por la disponibilidad de cisteína (Tateishi *et al.*, 1974; Thor *et al.*, 1979; Reed y Orrenius, 1991;

Stipanuk *et al.*, 1992). Por tanto, el menor catabolismo de la cisteína observado durante la sepsis (Breuillé *et al.*, 1996) podría ser debido a la utilización de este aminoácido para la síntesis de GSH y la formación de taurina para actuar como protectores en el daño oxidativo. En el metabolismo *in vivo* de la cisteína se forman taurina, sulfatos y GSH (Malmeza *et al.*, 1998). Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el hígado elimina cisteína del plasma (García y Stipanuk, 1992) y libera taurina y sulfatos formados durante el catabolismo de la cisteína (Coloso *et al.*, 1990). En contraste, el catabolismo de la cisteína en células renales y en enterocitos proporciona sulfatos sin taurina (Coloso y Stipanuk, 1989; Stipanuk *et al.*, 1990).

En el retículo endoplasmático (RE), el plegamiento de las proteínas a menudo implica la formación de uniones disulfido. Las condiciones oxidantes requeridas en este orgánulo son mantenidas mediante la liberación de pequeños tioles, principalmente cisteína y GSH (Carelli *et al.*, 1997). Este mecanismo es, probablemente, uno de los elementos clave que controlan la homeostasis redox en la vía exocítica. Además, sus homólogos oxidados (cistina y GSSG) se detectaron extracelularmente, así como disulfidos mixtos entre los dos compuestos (Cys-SG). Esto sugirió que existen 2 transportadores de disulfidos, uno constitutivo y diferencial para la cistina y otro específico para GSSG. Además, las moléculas de glutatión presentes como disulfidos mixtos en la matriz proteica del RE podrían ser movilizadas como respuesta a los cambios redox.

Se ha demostrado en estudios con linfocitos que la cisteína, cuando está presente en el medio, se oxida fácilmente bajo las condiciones usuales de cultivo para formar rápidamente cistina (Toohey, 1975; Mohindru *et al.*, 1985). Una vez la cisteína se oxida a cistina en el medio, la síntesis de GSH intracelular es altamente inhibida porque los linfocitos no pueden utilizar cistina para la síntesis de GSH (Ishii *et al.*, 1981). Por otro lado, los componentes tioles de bajo peso molecular como el β -mercaptoetanol (BME) y cisteamina reducen cistina a cisteína y promueven la captación de cisteína que aumenta la síntesis de GSH (Ishii *et al.*, 1981; Ishii *et al.*, 1981; Bannai, 1984; Issels *et al.*, 1988). En el caso del BME, se ha observado que transporta cisteína, formando un conjugado BME-cisteína, y facilita la entrada de cisteína a las células (Ishii *et al.*, 1991). La cisteamina podría tener el mismo efecto que el BME.

IV.15.16.1.3. Cisteína en el medio de MIV

De Matos *et al.* (1996) observaron que la adición de cisteína al medio de maduración de ovocitos bovinos estimulaba la síntesis de GSH y argumentaron que esta síntesis fue estimulada por la cantidad de cisteína libre presente en el medio de maduración en su estudio (0.6 mM), superior a la cisteína presente en el TCM-199 (0.6 μ M). Postularon, igualmente, que podía deberse a que la cistina se convirtiera en cisteína mediante las células del cumulus y entonces se incorporara a la síntesis de GSH. Posteriormente, De Matos *et al.* (1997) observaron un efecto estimulante de la cisteína sobre la síntesis de GSH en ovocitos bovinos desnudos. La elevada tasa de oxidación de la cisteína sugirió que este efecto ocurría las primeras horas de la MIV, tanto en ovocitos desnudos como en COCs. La cisteína y la glutamina comparten el mismo sistema de transporte alanina-serina-cisteína (ASC) (Bannai y Ishii, 1982), el cual es ubicuo en células mamíferas y es especialmente activo para aminoácidos como alanina y serina (Christensen, 1990). La acción estimulante de la cisteína en los ovocitos desnudos sugirió a De Matos *et al.* (1997) que este sistema de transporte estaba presente y activo en los ovocitos. El estudio de De Matos *et al.* (1997)

demostró que el incremento en el nivel de GSH intracelular al madurar en medio suplementado con cisteína, comparado con el medio de maduración solo, se observaba tanto en COCs como en ovocitos desnudos. Sin embargo, este efecto de la cisteína mejoraba cuando los ovocitos estaban rodeados por células del cumulus.

Furnus *et al.* (1998) estudiaron el efecto de la inclusión de glutamina en el medio de maduración de ovocitos bovinos. Dichos investigadores postularon que podría interferir en la síntesis de GSH, en vistas de la evidencia obtenida en otros tipos celulares (Bannai y Ishii, 1982). Además, teniendo en cuenta que la glutamina es transportada al interior de las células vía sistema ASC, podría actuar como inhibidor competitivo para la captación de cisteína, y un exceso en el exterior también podría estimular la pérdida de cisteína intracelular mediante este sistema de transporte (Christensen, 1990). Según los resultados obtenidos, Furnus *et al.* (1998) sugirieron que el sistema de transporte ASC también debía estar presente en las células del cumulus, ya que observaron un bajo nivel de GSH tanto en los ovocitos como en las células del cumulus al añadir glutamina a elevadas concentraciones al medio. La reposición del contenido de GSH intracelular en embriones de 6-8 células, provenientes de ovocitos madurados en presencia de elevadas concentraciones de glutamina, sugiere que los ovocitos con bajo nivel de GSH deben de recuperar los niveles normales de GSH tras la maduración. Asimismo, la moderada atenuación de la expansión del cumulus observada cuando los ovocitos bovinos maduran en presencia de BSO, inhibidor de la síntesis de GSH, sugiere que el GSH podría estar implicado en la expansión del cumulus. Este estudio proporcionó la evidencia de que la expansión del cumulus *in vitro* óptima dependía parcialmente de la producción de hexosamina y del contenido intracelular de GSH.

Se ha observado que la cisteína es beneficiosa para el desarrollo del embrión preimplantacional en algunas especies. En el conejo, la cisteína es uno de los aminoácidos requeridos para la segunda división embrionaria (Thibault, 1972). Sin embargo, se ha demostrado en hámster que 0.5 mM de cisteína son inhibitorios para el desarrollo embrionario de una célula hasta el estadio de blastocisto, y una concentración menor, 0.05 mM, mantiene el desarrollo normal (Bavister y McKiernan, 1993).

La adición de 0.57 mM de cisteína al medio de maduración de ovocitos de cerdo está asociada con un incremento en la síntesis de GSH, resultando en niveles de GSH comparables a los hallados en los ovocitos madurados *in vivo* (Yoshida *et al.*, 1993). Además, el hallazgo de que las concentraciones de GSH se reducen cuando la cisteína no está presente en el medio de cultivo, sugiere que la cisteína es un sustrato externo que se requiere para la síntesis de GSH en los ovocitos de cerdo que están madurando (Yoshida *et al.*, 1993). La incapacidad de los ovocitos porcinos para sintetizar suficiente GSH durante la MIV reduce su capacidad para formar el pronúcleo masculino tras la fecundación (Yoshida, 1993). Estos autores describieron que los ovocitos porcinos madurados en 0.04 mM de cisteína contenían más GSH, y, por tanto, más poder reductor de disulfidos y exhibieron una mayor formación del pronúcleo masculino. El TCM199 contiene una cantidad muy pequeña de GSH (0.05 mg/l) y su precursor, la cisteína (0.11 mg/ml). La presencia de GSH, incluso en el grupo control, podría ser suficiente para proteger a los ovocitos del estrés oxidativo, y la cisteína podría aportar un buen nivel de síntesis de GSH durante la MIV.

En porcino, Funahashi y Day (1995) indicaron que para aumentar el contenido de GSH de los ovocitos se necesita la presencia de células del cumulus rodeándolos, sugiriendo que, durante la maduración, las

células del cumulus transportan a los ovocitos GSH o la capacidad para sintetizarlo. En este estudio se observó que los COCs mostraban mayor contenido en GSH cuando se cultivaban en presencia de cisteína que en su ausencia. Asimismo, el contenido en GSH fue menor en los ovocitos desnudos respecto a los COCs, y la cisteína no afectó su nivel.

Sawai *et al.* (1997) corroboran que el GSH se sintetiza durante la maduración de los ovocitos porcinos en medio con cisteína (0.57 mM), e indican que la presencia de cisteína en el medio de maduración es sólo crítica entre las 42-48 h de cultivo, cuando los ovocitos están en la fase tardía de MI o en MII, y que a su vez, la cisteína se emplea para la síntesis de GSH, utilizado posteriormente en la formación del pronúcleo masculino tras la penetración espermática *in vitro*. Parece ser que la síntesis continuada de GSH durante el periodo de cultivo es innecesario para proporcionar el suficiente GSH que promueve una elevada incidencia de formación del pronúcleo masculino (Sawai *et al.*, 1997). Es importante la síntesis de GSH durante la última fase de maduración para inducir la formación del pronúcleo masculino, ya que cuando la cisteína estuvo presente durante las primeras 36 h de cultivo, la incidencia de formación del pronúcleo masculino y la concentración de GSH en el ovocito fueron menores que cuando lo estuvo durante 48 h (Sawai *et al.*, 1997). Sawai *et al.* (1997) aclaran que el medio que emplean para madurar en su estudio (TCM199) contiene 0.0008 mM de cisteína. Este dato, añadido a previos hallazgos que dicen que la cisteína se metaboliza rápidamente (Meister, 1983) y que concentraciones tan bajas de cisteína no estimulan la síntesis de GSH (Yoshida *et al.*, 1993) ni la formación del pronúcleo masculino (Yoshida *et al.*, 1992), les hace ignorar el contenido original de cisteína al discutir los resultados.

Tal y como indicaron Perreult *et al.* (1984), la cantidad total de GSH en ovocitos porcinos probablemente no es el único determinante en la formación del pronúcleo masculino. Por ejemplo, en el trabajo de Sawai *et al.* (1997), cuando la cisteína estuvo presente en el medio durante sólo 3 h de la última fase de maduración (42-45 h o 45-48 h de cultivo), la incidencia de formación de pronúcleo masculino (65-70%) fue mayor que cuando estuvo ausente durante las 48 h de cultivo (28%), mientras que no hubo diferencias en el contenido de GSH entre los 3 tratamientos. Estos autores no supieron explicar cómo la presencia de cisteína en el medio durante sólo 3 h de la última fase de maduración promovió la formación del pronúcleo masculino sin estimular la síntesis de GSH.

En presencia de un compuesto tiol (BME), la adición del medio de MIV porcino con cisteína aumenta el nivel de GSH intracelular (13-15 vs. 5.6 pmol/ovocito) y mejora la competencia para el desarrollo tras la fecundación (32-39% vs. 19% de blastocistos; Abeydeera *et al.*, 1999). Sin embargo, no se observan efectos sobre la maduración nuclear, las tasas de penetración, poliespermia, formación del pronúcleo masculino y media del número de espermatozoides por ovocito. Por otro lado, el aumento de los niveles de cisteína de 0.1 a 0.4 mg/ml en ovocitos de cerdo no manifestó ningún efecto sobre los niveles de GSH o el desarrollo embrionario.

En hámster, la formación del pronúcleo masculino mejoró con la adición de 10 μ mol/l de cisteína, pero esta mejora no igualó los resultados obtenidos con ovocitos madurados *in vivo* (Kito y Bavister, 1997). Estos investigadores opinan que esta baja formación podría ser debida a la carencia de gonadotropinas o componentes del FF empleados en otros estudios (Yoshida *et al.*, 1992), o bien a que la cisteína podría

haberse oxidado a cistina, que no se transporta de manera eficiente al interior del citoplasma (Bannai, 1984; Issel *et al.*, 1988).

IV.15.16.2. Cistina

IV.15.16.2.1. *Propiedades*

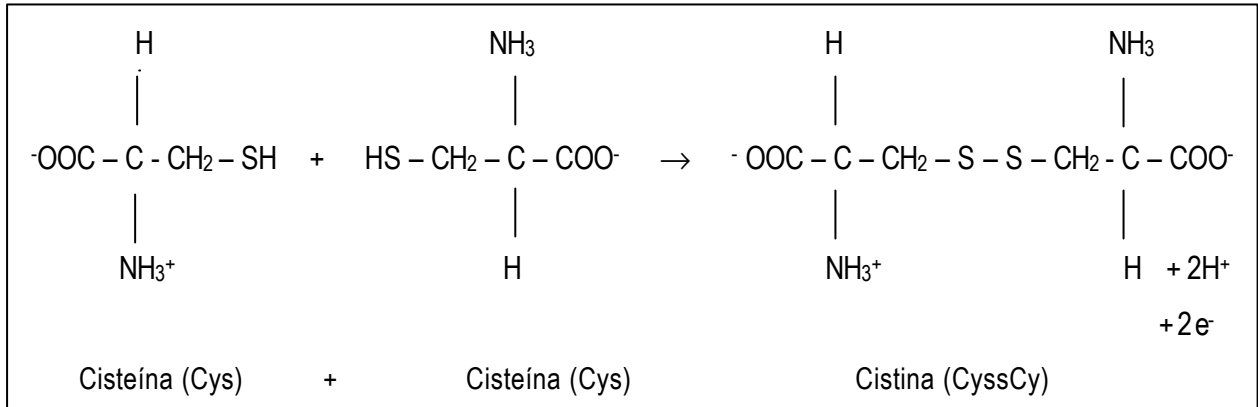


Figura 9. Oxidación de la cisteína a cistina.

IV.15.16.2.2. *Antecedentes y modo de acción*

La estimulación del transporte de cistina vía sistema ASC de forma dosis-dependiente dentro de los linfocitos de bazo de ratón, cultivados en presencia de 2-BME, tras la adición de 25-400 μ M de cisteína, aumenta por la presencia de un mitógeno policlonal (Ishii *et al.*, 1987). La estimulación mediante mitógeno del sistema ASC de linfocitos de cerdo había sido descrita anteriormente (Borghetti *et al.*, 1979, 1981). El sistema xc- no se expresa en los linfocitos de ratón activados. Bannai (1986) mostraron una influencia de la inducción del transporte de cistina por el sistema xc- por agentes electrofílicos sobre los niveles de GSH. Cuando los fibroblastos humanos cultivados se expusieron a dietilmaleato, la reducción esperada de GSH, observada inicialmente, se siguió por el doblamiento del nivel de GSH celular. La poderosa inducción asociada del sistema xc- se interpretó como una acción protectora de las células contra un ataque electrofílico (Bannai y Tateshi, 1986).

La bromosulfaleína es otro agente electrofílico que causa la inducción del sistema de transporte de la cistina, de nuevo vía xc-, en el hepatocito de rata (Bannai *et al.*, 1986). Cuando los macrófagos que habían sido obtenidos durante 4 días mediante la inyección intraperitoneal de caldo de tioglicolato en el peritoneo de ratón se cultivaron durante 16 h, su tasa de captación de cistina aumentó 40 veces, mientras que la captación de aminoácidos dipolares (neutros) no cambió (Watanabe y Bannai, 1987). Las propiedades de esta captación correspondieron a las del sistema xc-. Como consecuencia, los niveles de GSH se doblaron, y un tercer compuesto, supuestamente la cisteína, se liberó y se acumuló en el medio de cultivo durante el estudio. El cultivo bajo condiciones de hipoxia disminuyó la inducción de la actividad del transporte; por tanto, el aumento del oxígeno fue probablemente el mayor factor que contribuyó a la inducción del sistema xc-. En resumen, el transporte de membrana parece jugar un papel dominante en el mantenimiento,

regulación y función actual del metabolismo del GSH en la defensa de las células contra el estrés oxidativo. El sistema de transporte xc- parece estar influenciado por estos procesos reguladores.

En los fibroblastos humanos, el consumo de cistina esta mediado por un sistema de intercambio cistina/glutamato (Bannai, 1986), referido como Sistema Xè (Bannai *et al*, 1984; Bannai, 1986). La cistina tomada por las células es rápidamente reducida a cisteína. Una parte de esta cisteína es utilizada para la síntesis de GSH y el resto se libera al medio, donde es oxidada a cistina. De esta manera, el ciclo redox de cistina y cisteína se completa a través de la membrana plasmática. Algunas células, como los fibroblastos, expresan su actividad mediante este transporte de intercambio de aniones. En otros, como los macrófagos, es fuertemente inducible, mientras que en otros tipos celulares, como los linfocitos, este sistema está ausente (Meier y Issels, 1995). El sistema de transporte para la cistina y el glutamato en la membrana plasmática de los fibroblastos humanos es mayoritariamente un único sistema, y es un tipo de intercambio aniónico, ya que se sabe que la cistina se comporta como una forma aniónica en este transporte (Bannai, 1986). La cistina y el glutamato a un lado de la membrana estimulan el paso de otros aminoácidos presentes al otro lado de la membrana. Cuando la concentración de glutamato intracelular se reduce casi a cero, la cistina apenas entra en la célula y, asimismo, la liberación de glutamato de la célula cesa cuando la cistina está ausente en el medio. Debido a que el *pool* intracelular de cistina es muy pequeño mientras que el de glutamato es muy grande, el flujo fisiológico mediante este sistema es de entrada de cistina y de salida de glutamato, ocurriendo a una ratio cercana a 1:1. El homocisteato y el α -aminoadipato comparten este sistema de transporte y, cuando son añadidos, participan de modo similar en el proceso de transporte.

En contraste con los eritrocitos, otras células tienen, más allá del sistema ASC que transporta cisteína, un sistema de transporte para cistina (Makowske y Christensen, 1982), un aminoácido que está a niveles mucho mayores que la cisteína en el fluido extracelular circulante. Tras la entrada en la célula, se espera una rápida reducción de cistina a cisteína. Este sistema de transporte xc- selecciona, no la forma tetrapolar, isoiónica, que es más abundante entre pH 5 y 7, si no la forma tripolar de la cistina, ya que posee un anión con sólo uno de los dos grupos amino protonados. La cistina también comparte este sistema de transporte con el ión glutamato cargado de forma similar. Probablemente, el sistema xc- no encontraría aminoácidos con los que reaccionar aparte de la cistina y el glutamato. Estos son intercambiados por el sistema a través de la membrana de los fibroblastos humanos y, al menos en los fibroblastos fetales, ambos parecen estar involucrados en el intercambio con el otro (Bannai, 1986). Ya que el suministro interno de uno determina el influjo del otro, se concibe que la célula podría estar necesitada de glutamato para ganar el aminoácido sulfuro para incrementar los niveles de cistina. Bannai e Ishii (1988) señalan que ya que el *pool* intracelular de cistina es insignificamente pequeño y el *pool* de glutamato es grande, los flujos fisiológicos a través de este sistema son la captación de cistina unida a la salida de glutamato, con la mayor concentración de éste proveyendo al menos parte de la fuerza conductora. Estas características deberían hacer del sistema xc- un sistema de eliminación efectivo para la cistina circulante. La cistina es captada casi exclusivamente por este sistema por los fibroblastos humanos; por tanto, la actividad adaptable del sistema xc- influye en gran parte los niveles celulares de cisteína y GSH.

Bannai e Ishii (1988) describen un ciclo: la cisteína es inevitablemente liberada al medio externo por los fibroblastos cultivados y quizás por otras células no identificadas aún en el organismo. Esta rápida oxidación

externa a cistina necesita una redirección hacia dentro del flujo del aminoácido sulfuro por el sistema xc-. El glutamato también es tomado por varias células mediante otros sistemas, como el sistema Na⁺-dependiente XAG- (Makowske y Christensen, 1982), activado independientemente del movimiento de cistina a cisteína; por tanto, el gradiente de glutamato probablemente no se disipa por el ciclo reversible de oxidación-reducción transmembrana.

La cistina, tras su captación al interior de las células se reduce rápidamente a cisteína, aunque probablemente no directamente mediante NADH o NADPH. En su lugar, la reacción parece proceder de un intercambio sulfhidril-disulfido con el GSH para formar el disulfido mixto CySSG, seguido por la regeneración del GSH por la NADPH-glutatión disulfido (GSSG) reductasa.

Bannai *et al.* (1989) proponen que la razón por la que la actividad del sistema xc- del hepatocito es baja, tal y como se observa en un cultivo comparado con el de las células de hepatoma y los hepatocitos fetales (Macowske y Christensen, 1982) es que no ha ocurrido un incremento por inducción o regulación adaptativa. Por otro lado, Bannai *et al.* (1989) plantean la cuestión de cómo algunos tejidos en el organismo intacto poseen el intercambio cistina por Glu- y cómo algunos tejidos, que carecen del proceso de intercambio activo, necesitan ser alimentados con cisteína por otras células que poseen el intercambio xc- o con metionina como precursor.

Watanabe y Bannai (1987) señalan que los linfocitos (y las líneas celulares de linfoma) no pueden sobrevivir por ellas mismas en el medio de cultivo *in vitro*, presumiblemente porque carecen de sistema xc-y, como consecuencia, son incapaces de tomar cistina; sin embargo, estas células sobreviven cuando se cocultivan con macrófagos, ya que éstos proveen cisteína a las células linfoides.

La captación de glutamina ocurre en la mayoría de las células vía sistema ASC, sin incluir el yeyuno de rata en el polo basolateral, de acuerdo con Wilde y Kilberg (1988). La glutamina comparte esta ruta con la cisteína y con otros aminoácidos (Kilberg *et al.*, 1981). También debería tenerse en cuenta un flujo significativo de glutamina por el sistema L (Vadgama y Christensen, 1983). El Glu- externo es un inhibidor competitivo del sistema xc- de captación de cistina. El elevado contenido del medio de cultivo celular e incluso la abundancia de glutamina en el plasma indudablemente actúa competitivamente para limitar el influjo neto de cisteína mediante el sistema ASC. Esta acción probablemente justifica la inhibición del crecimiento de los fibroblastos en cultivo con 2.5 mM de glutamina, asociado a disminuciones de los niveles intra y extracelulares de cisteína (Bannai e Ishii, 1982). El exceso de glutamina externa podría estimular también una pérdida de cisteína celular mediante el sistema ASC.

La Célula I en la figura 10 podría representar el hepatocito no estimulado *in vivo*, mientras que la Célula II representa una fuente de cisteína, como el fibroblasto, y la Célula III representa un linfocito.

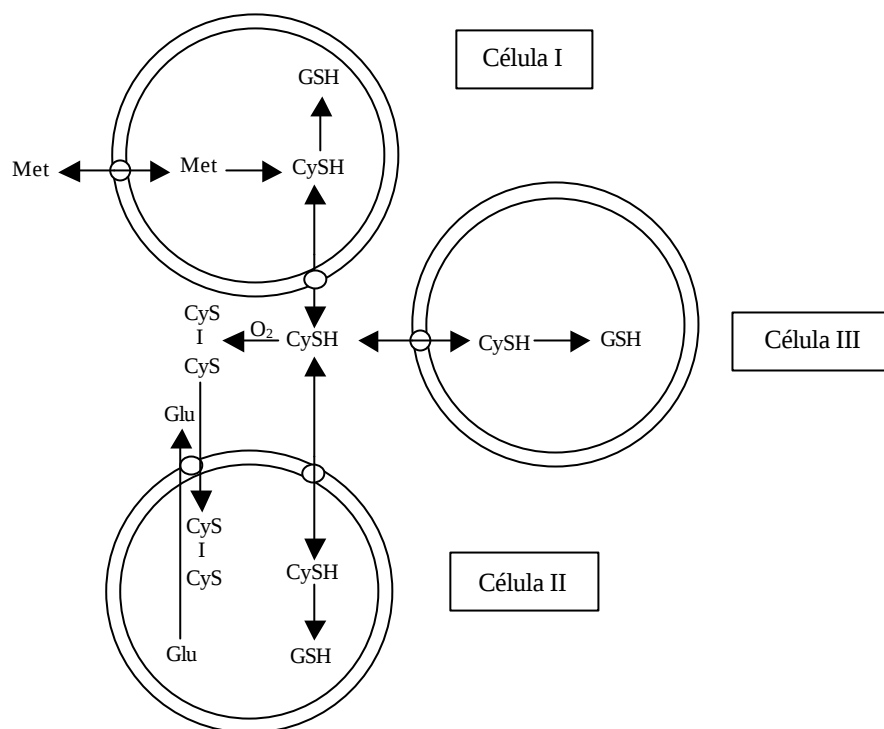


Figura 10. Flujos de aminoácidos sulfurados entre células I, II y III. Célula I: una célula deficiente en captación de cistina por intercambio por glutamato y, por tanto, nutrida en su mayor parte por metionina. Célula II: una célula como el fibroblasto, recibiendo cistina por intercambio por glutamato mediante el sistema x_c^- . Célula III: un linfocito que también carece de x_c^- pero más dependiente en su mayor parte de la captación de cisteína mediante el sistema ASC para el suministro de cisteína como se provee a los fibroblastos (De Bannai *et al.*, 1989).

IV.15.16.2.3. Cistina en el medio de MIV

La suplementación del medio de maduración en ovocitos bovinos con cistina solamente incrementa el contenido intracelular de GSH en presencia de células del cumulus, tanto en COCs como en ovocitos desnudos cocultivos con monocapas de células del cumulus, aunque los niveles de GSH en COCs incubados en medio solo fueron mayores que en co-cultivo con monocapa de células (De Matos *et al.*, 1997). Por tanto, se sugirió que la cistina solamente podía estimular la síntesis de GSH en presencia de células del cumulus. Sobre la base de estos datos, se postuló que, probablemente, el transporte de aniones a través de membrana debe estar ausente o inactivo en los ovocitos. En fibroblastos humanos, la captación de cistina está mediada por el sistema de intercambio cistina/glutamato, referido como sistema X_c (Bannai, 1984; Issels *et al.*, 1988). Según algunos investigadores, este sistema de transporte debe estar ausente o inactivo en los ovocitos, y el efecto estimulador ejercido por la cistina sobre la síntesis de GSH está mediado, probablemente, por las células del cumulus (de Matos *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 1995).

Tal y como hemos mencionado previamente, la concentración de cisteína en el TCM199 usado para la MIV rutinaria de ovocitos bovinos es muy baja comparado con la de cistina, y, debido a la autooxidación, esencialmente no hay cisteína presente. En consecuencia, la síntesis de GSH debe estar perjudicada por la falta de sustrato, y los ovocitos bovinos madurarían en condiciones subóptimas. Es posible que la cistina

generada por autooxidación sea convertida a cisteína por las células del cumulus y entonces se incorpore a la síntesis de GSH (De Matos *et al.*, 1997).

Por otro lado, De Matos *et al.* (1997) observaron niveles similares de GSH entre los valores obtenidos antes de la MIV y ovocitos desnudos madurados en medio MIV suplementado con o sin cistina. Estos autores sugieren que la síntesis de GSH debía estar deteriorada debido al desacoplamiento de las células del cumulus, y que esta discapacidad para sintetizar GSH podría ser la causa de un pobre desarrollo embrionario posterior.

IV.15.16.2.4. Cistina en el medio de CIV

Como hemos comentado anteriormente, aunque la síntesis de GSH está altamente influenciada por la cisteína, ésta se oxida fácilmente a cistina, la cual no puede ser utilizada por algunos tipos celulares. Takahashi *et al.* (1993) sugirieron que el aumento de GSH intracelular por los compuestos tiol provee al embrión de las condiciones intracelulares favorables, al prevenir el daño oxidativo, y promueve el desarrollo embrionario tardío, siendo un factor importante para el desarrollo de los embriones. Por ello, cuando los embriones se cultivaron en ausencia de compuestos tiólicos, la síntesis de GSH se inhibió y las tasas de desarrollo embrionario resultantes hasta el estadio de blastocisto fueron reducidas (Takahashi *et al.*, 1993). Los embriones bovinos de 6-8 células, al igual que los linfocitos, apenas pueden utilizar cistina para la síntesis de GSH. Sin embargo, en presencia de un cocultivo con células de soporte de cumulus-granulosa, pueden utilizar compuestos derivados del metabolismo de la cistina secretados al medio de cultivo por la monocapa de células (Takahashi *et al.*, 1995).

IV.15.16.3. β- mercaptoetanol (BME)

IV.15.16.3.1. *Propiedades*

El BME es un tiol de bajo peso molecular, cuya estructura está representada en la Figura 11.

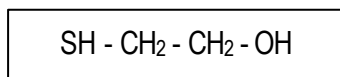


Figura 11. Estructura del β-mercaptoetanol (BME)

IV.15.16.3.2. *Antecedentes y modo de acción*

Compuestos tiol de bajo peso molecular como cisteamina y BME promueven la viabilidad celular y aumentan varias reacciones celulares en linfocitos (Fanger *et al.*, 1970), células de carcinoma embrionario (Rizzino y Sato, 1978; Oshima, 1978) y células L1210 del linfoma de ratón (Ishii *et al.*, 1981a,b). Asimismo, el BME aumenta el nivel de GSH intracelular en los linfocitos (Zmuda y Friedenson, 1983) y en las células del linfoma (Ishii *et al.*, 1981; Zmuda y Friedenson, 1983) en ratón.

Se ha demostrado que el BME reduce cistina a cisteína (Ishii *et al.*, 1981a,b; Bannai, 1984). Asimismo, se ha sugerido que dicho tiol promueve la captación de cisteína y cistina dentro de las células y el aumento de la síntesis de GSH (Ishii *et al.*, 1981a,b; Ohmori y Yamamoto, 1983). Ambos grupos mencionan la formación

de compuestos disulfidos mixtos cistina-BME, hallando que este disulfido mixto tenía el mismo efecto que la cistina más BME y sugiriendo que la acción ejercida por el BME estaba mediada por el disulfido mixto. Además, estos autores propusieron que el sistema de transporte usado para captar el disulfido mixto es diferente del sistema empleado para transportar cistina o cisteína y, por tanto, que el disulfido se reduce a cisteína y BME dentro de la célula. El BME puede escapar de la célula, volver al medio de cultivo y reaccionar después con la cistina. Caamaño *et al.* (1996) postulan que podría ocurrir un mecanismo similar en los embriones bovinos cultivados en un medio que contenga cistina y BME.

IV.15.16.3.3. BME en el medio de MIV

En porcino, Abeydeera *et al.* (1998,1999) observaron que el BME en el medio de MIV tenía efectos beneficiosos sobre el desarrollo embrionario a ciertas concentraciones, de forma correlacionada con el nivel de GSH intracelular en ovocitos porcinos. Comparado con la no adición (26%), la presencia de 12.5 y 25 μM de BME aumentó la proporción de blastocistos de forma dosis-dependiente (34 y 41%, respectivamente), mientras que un aumento de 25 a 50 μM redujo la tasa de blastocistos. El nivel de GSH fue superior en los ovocitos madurados con 25 μM comparado con 50 μM y la ausencia de dicho tiol. No obstante, según estos autores, la presencia de BME en el medio de MIV no afecta a las tasas de penetración, poliespermia, formación del pronúcleo masculino ni al número medio de espermatozoides por ovocito porcino.

El BME, añadido al medio de maduración, es capaz de aumentar la síntesis de GSH en ovocitos bovinos (De Matos *et al.*, 1996,1997; De Matos y Furnus, 2000) y de mejorar el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto (De Matos y Furnus, 2000). En este último trabajo, los niveles intracelulares de GSH más altos promovidos durante la MIV se mantuvieron tras la FIV, por lo que estuvieron presentes al inicio del CIV embrionario, desapareciendo más tarde, en el estadio de 6-8 células. Por tanto, el efecto beneficioso ejercido por el GSH sintetizado durante la MIV mejora el proceso de fecundación y el desarrollo temprano de los embriones.

También en ovino, De Matos *et al.* (1999) observaron que el BME estimulaba la síntesis de GSH tras la MIV, pero que este incremento en el nivel de GSH no mejoraba el posterior desarrollo embrionario.

IV.15.16.3.4. BME en el medio de CIV

Diversos estudios han descrito un mayor porcentaje de blastocistos bovinos con la inclusión de BME en el medio de cultivo embrionario. Así, Lee *et al.* (1999) observaron un mayor porcentaje de blastocistos bovinos en medio de cultivo embrionario suplementado con BME respecto al control y al medio suplementado con N-acetilcisteína, y una mayor proporción de blastocistos eclosionados respecto al control.

La síntesis de GSH de novo aumenta en el momento de la activación genómica de los embriones bovinos, en el estadio de 9-16 células (Telford *et al.*, 1990). La concentración de GSH intracitoplasmático de embriones bovinos derivados de CIV aumenta durante el desarrollo preimplantacional, empezando este incremento en el estadio de 9-16 células, y alcanzando su máximo nivel en el estadio de blastocisto eclosionado (Lim *et al.*, 1996). Estos mismos autores comprobaron que el BME ejercía su papel

embriotrópico sobre el desarrollo antes de la cuarta división, produciendo una mejora en la formación de blastocistos, mientras que en embriones de 16 células no promovía la compactación de mórulas ni la formación de blastocistos. El hecho de que el tratamiento de ovocitos inseminados con 2-mercaptoetanol (2-ME) aumente significativamente el desarrollo antes de las 16 células y no después, implica que los embriones pueden sintetizar cantidades adecuadas de GSH tras la activación del genoma embrionario (Lim *et al.*, 1996).

Estos resultados indican que la reducida concentración de GSH intracitoplasmático debe ser una de las razones del bloqueo del desarrollo a las 8 células, que ocurre en embriones bovinos cultivados *in vitro*. Esta hipótesis es respaldada por el hecho de que el desarrollo de los embriones de cerdo de 1 a 8 células aumenta significativamente por la adición de cisteamina, que también promueve la producción de GSH (Grupe *et al.*, 1995), y que los niveles de GSH son más bajos en los embriones cultivados *in vitro* que en aquellos desarrollados *in vivo* (Gardiner y Reed, 1994). A la inversa, el hallazgo de que no hay diferencia en la capacidad de desarrollo de los ovocitos cultivados con capas de células del cumulus o en medio que contenga 2-ME hasta el estadio de 9-16 células, sugiere que el GSH y otros componentes del medio definido son capaces de un soporte total del desarrollo hasta este estadio. Por otro lado, Lim *et al.* (1996) asumieron que uno de los efectos beneficiosos del co-cultivo con capas de células del cumulus es la producción de antioxidantes como el GSH. Esta sugerencia está respaldada por el hallazgo de que el cocultivo con células de tejidos reproductivos contienen varios tipos de ARNm para la síntesis de antioxidantes (Harvey *et al.*, 1995). Sin embargo, el efecto del 2-ME sobre el desarrollo embrionario es independiente de la acción de la secreción de GSH por las células del cumulus, ya que no hubo interacción entre los dos. El incremento en la síntesis de GSH debe causar la pérdida de actividad embriotrópica del 2-ME añadido a los estadios preimplantacionales tardíos (Lim *et al.*, 1996).

Takahashi *et al.* (1993) hallaron que el incremento en la concentración de GSH intracelular causado por la adición de BME en el medio de cultivo, en ausencia de células de soporte, es beneficioso para el desarrollo de embriones bovinos en estadio de 6-8 células obtenidos por MIV-FIV hasta el estadio de blastocisto.

Se ha estudiado el efecto de la adición de 100 μ M de BME al medio de cultivo de embriones bovinos: Caamaño *et al.* (1996) observaron que el BME promovía el desarrollo hasta el estadio de blastocisto de los embriones tras MIV-FIV, siendo este efecto mayor cuando, al inicio del tratamiento, los embriones tenían 8-16 células respecto a cuando tenían menos de 8 células. En este estudio, la determinación mediante HPLC indicó que el medio TCM199 suplementado con BME no contenía ni cisteína ni cistina, sugiriendo que esos componentes se convertían en un disulfido mixto entre la cisteína y el BME. Por otro lado, Caamaño *et al.* (1996) hacen referencia a un efecto aditivo del FCS y el BME, que podría ser debido a que el GSH y/o la cistina presentes en el FCS podrían estar más disponibles para los embriones tratados con BME. Por otro lado, Caamaño *et al.* (1996) observaron que la reducción de la tensión de oxígeno (20% vs. 5%) y la presencia de BME (20 μ M) en el medio de cultivo de embriones bovinos aumentaba la formación de blastocistos, pero solamente la reducción del nivel de oxígeno incrementaba el número de células de éstos. El medio de cultivo normalmente contiene componentes sulfhidrilo en estado oxidado (forma disulfido) al inicio del periodo de cultivo (antes del contacto con las células). Con la adición de BME (agente reductor de sulfhidrilos), existe la posibilidad de que haya constituyentes del medio reducidos, parcialmente reducidos o

disulfidos mixtos. El primer efecto del BME se ejerció sobre la cisteína, convirtiéndola en un compuesto distinto a la cisteína, presumiblemente un disulfido mixto con el BME. Si la acción del BME es hacer a la cisteína más disponible para la síntesis de GSH, los resultados de Caamaño *et al.* (1996) sugieren que los embriones de 8-16 células son más capaces de utilizar esta fuente de cisteína para sintetizar GSH que los embriones menos desarrollados. De hecho, se han detectado los patrones de expresión del ARNm para la glutamylcystein synthetase, el enzima limitante de la síntesis de GSH, en todos los estadios del desarrollo embrionario bovino excepto en el blastocisto (Harvey *et al.*, 1995), aunque la intensidad de señales para esta enzima varió de un estadio al siguiente. Caamaño *et al.* (1996) postulan que sería posible que esta variación en la expresión del ARNm resultara de una depleción gradual del ARNm de origen materno y la posterior emergencia del ARNm de origen embrionario, coincidiendo con la activación del genoma embrionario en el estadio de 8 células. Este razonamiento ayudaría a explicar el hecho de que los embriones de 8-16 células respondan mejor a la adición de BME que los embriones menos desarrollados y los hallazgos de que los embriones bovinos de 2 células respondan escasamente a la adición de BME comparado con los embriones de 8-16 células (Hamano *et al.*, 1994).

Los embriones bovinos de 4-8 células cultivados en presencia de 10 μM de BME muestran una mayor frecuencia de desarrollo hasta blastocistos (Geshi *et al.*, 1999). También se ha estudiado el efecto del BME sobre la supervivencia de embriones de buena calidad congelados tras cultivo *in vitro* durante 24 h. Los resultados demuestran que la inclusión de BME en el medio de cultivo de pre-congelación tiene un efecto beneficioso sobre la supervivencia de blastocistos congelados-descongelados *in vitro*. Así, el porcentaje de blastocistos reexpandidos y eclosionados tras la descongelación, fue superior cuando se incluyó BME en el medio de pre-congelación (Otoi *et al.*, 2000). Asimismo, los embriones bovinos mostraron una mayor supervivencia en un medio de transporte suplementado con 50-100 μM de BME que en ausencia de dicho compuesto. Además, la calidad de los embriones tras el transporte en pajuelas fue superior en presencia de medio suplementado con BME (Takahashi *et al.*, 1996).

IV.15.16.4. Cisteamina

IV.15.16.4.1. *Propiedades*

La cisteamina es un tiol de bajo peso molecular (Figura 12).

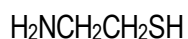


Figura 12. Estructura de la cisteamina

IV.15.16.4.2. *Antecedentes y modo de acción*

La cisteamina incrementa el GSH intracelular en las células de linfoma de ratón (Ishii *et al.*, 1981; Zmuda y Friedenson, 1983) y en las células CHO (Issels *et al.*, 1988). Además, se ha observado que la adición de cisteamina al medio de cultivo provoca un incremento pronunciado en el consumo de $[35\text{S}]$ cistina en las células CHO (Meier y Issels, 1995). En las células LAK, el consumo de cistina promovido por cisteamina

ocurre probablemente en forma de cisteína, la cual es principalmente transportada por el sistema ASC. También es probable el consumo de disulfidos mixtos cisteína-cisteamina mediante el sistema L (Christensen, 1990; Meier y Issels, 1995). Previamente, Ishii *et al.* (1981) describieron que el tratamiento de las células L-1210 de ratón con cisteamina aumentaba el movimiento del sulfuro a través de la membrana plasmática, y ocurría en forma de disulfido mixto hidroxi-terminal mediante el sistema L. La cisteamina reacciona con la cistina por intercambio sulfhidril-disulfido para producir el disulfido mixto de cisteína y cisteamina, por lo que el aumento de transporte de membrana ocurre por un sistema diferente del empleado normalmente por la cistina. En este caso, el componente sulfhidrilo funciona como un sistema de distribución transmembrana para la cistina mediante el intercambio sulfhidril-disulfido estimulado por él. Un ejemplo es el tratamiento de la cistinosis con cisteamina, que elimina los acúmulos de cistina destructivos de los lisosomas, con el movimiento del sulfido mixto a través de la membrana por un sistema designado c, que es específico para aminoácidos catiónicos (Pisoni *et al.*, 1985, 1987).

IV.15.16.4.3. Cisteamina en el medio de MIV

La cisteamina y el BME transportan grupos tioles libres al citoplasma (Issel *et al.*, 1988; Meister, 1991) y pueden mejorar la fecundación y la competencia para el desarrollo de los ovocitos de cerdo y vaca madurados *in vitro*, mediante el incremento de la concentración de GSH en el ooplasma (Takahashi *et al.*, 1993; De Matos *et al.*, 1995; Grupen *et al.*, 1995).

La adición de un exceso de cisteamina al medio puede prevenir la completa oxidación de cisteína a cistina. La cisteamina reaccionaría con la cisteína, y posiblemente reaccionaría con la cistina por intercambio sulfhidril-disulfido para formar un disulfido mixto (Ishii *et al.*, 1981). Se ha mostrado que las células de mamífero toman disulfidos mixtos similares vía transportador de leucinas y se separan dentro de la célula para disponer de una fuente de cisteína (Ishii *et al.*, 1981). Por otro lado, la cisteamina puede estar implicada directamente en la reducción de las uniones disulfido de las protaminas en la cromatina del núcleo del espermatozoide, un requisito para la formación del pronúcleo masculino (Mattioli *et al.*, 1988).

De Matos *et al.* (1995, 1996) demostraron que la adición de cisteamina al medio de maduración producía un incremento del contenido de GSH en ovocitos bovinos y una mejora en la tasa de desarrollo celular hasta blastocisto. Estos resultados eran consistentes con las hipótesis de Issels *et al.* (1988) y Bannai (1984), según las cuales, compuestos tioles de bajos peso molecular como la cisteamina, debían reducir la cistina a cisteína cuando estaban presente en el medio de maduración, aumentando la síntesis de GSH. Sin embargo, en el estudio de De Matos *et al.* (1996) no se halló ningún efecto aditivo al añadir al medio de maduración cisteína y cisteamina conjuntamente. De Matos *et al.* (1996) concluyeron que el incremento en la síntesis de GSH provocado por la cisteamina proveía a los ovocitos madurados *in vitro* de grandes reservas de GSH disponibles para la protección del embrión hasta el estadio de blastocisto, incrementando la eficiencia de la producción de blastocistos a partir de ovocitos inmaduros. Posteriormente, De Matos *et al.* (1997) demostraron que la adición de cisteamina al medio de maduración producía un incremento en el nivel de GSH intracelular tanto en COCs como en ovocitos desnudos. Sin embargo, este efecto de la cisteamina mejoraba cuando los ovocitos estaban rodeados por células del cumulus y que, por tanto, éstas contribuían al efecto estimulante ejercido por la cisteamina sobre la síntesis de GSH, ya que en los COCs

se dio un mayor contenido de GSH que en los ovocitos desnudos.. Asimismo, la adición de cisteamina al medio de MIV incrementó el contenido de GSH en ovocitos desnudos, probablemente por conversión de cistina a cisteína y por promoción de la captación de cisteína, aumentando la síntesis de GSH (De Matos *et al.*, 1997). La suplementación con cisteamina del medio de MIV aumenta el contenido intracelular de GSH de ovocitos bovinos y mejoran el desarrollo embrionario y su calidad, produciendo más embriones que alcanzan el estadio de blastocisto el día 6 que los embriones madurados en un medio no suplementado (de Matos *et al.*, 1995, 1996). Como dato de interés, De Matos *et al.* (1995) ya consideraron la posibilidad de que la cisteamina pudiese ser beneficiosa si se añadía en pasos posteriores a la maduración. Más tarde, Guyader *et al.* (1998) no mejoraron las tasas de división y desarrollo embrionario *in vitro* con la adición de 50, 100 o 250 μ M de cisteamina en el medio de MIV de ovocitos bovinos, incluso la inclusión de 250 μ M de cisteamina pareció ser tóxica para el embrión. Por otro lado, la adición de 0.5-1 mM de hipotaurina al medio de cultivo embrionario mejoró la producción y la calidad de los blastocistos.

De Matos y Furnus (2000) dedujeron que el aumento de las tasas de división y desarrollo embrionario hasta los estadios de mórula y blastocisto podrían explicarse por la mejorada protección contra el estrés oxidativo durante la FIV y los estadios tempranos de desarrollo embrionario, debido a los elevados niveles de GSH intracelular hallados en los presuntos cigotos. Este punto es similar a los resultados obtenidos en estudios previos (Takahashi *et al.*, 1993; Hamano *et al.*, 1994; Lim *et al.*, 1996; Luvoni *et al.*, 1996; Caamaño *et al.*, 1996), que mostraron que el incremento en la síntesis de GSH debido a los compuestos tioles añadidos durante el cultivo *in vitro* de embriones en estadio temprano mejoraba la tasa de desarrollo blastocitario. De Matos y Furnus (2000) observaron que en los ovocitos tratados con BME, cisteína y cistina los niveles de GSH y las tasas de división y formación de mórulas y blastocistos fueron más elevados en los ovocitos tras la MIV y en los presuntos cigotos tras la FIV que en el control. Por otro lado, el contenido de GSH en los embriones de 6-8 células fue similar entre tratamientos. En dicho estudio, se concluye que los elevados niveles de GSH intracelular tras la inducción de la síntesis de GSH por los componentes tioles en ovocitos bovinos permanecen durante la FIV y aún están presentes al inicio del CIV, mejorando las tasas de desarrollo. Además, los resultados indican que esta vía metabólica es un componente importante del proceso de maduración citoplasmática que afecta los posteriores pasos de la producción *in vitro*. Anteriormente, Funahashi y Day (1994) sugirieron que el contenido de GSH intracelular de los ovocitos porcinos al final de la MIV parecería reflejar el grado de maduración citoplasmática.

En ovocitos de búfalo, Gasparrini *et al.* (2000) hallaron que la adición de 50 μ mol de cisteamina al medio de MIV mejoraba el porcentaje de embriones que se desarrollaban hasta mórula compacta y blastocisto, así como la proporción de embriones transferibles (Grados 1 y 2), pero no mejoraba las tasas de maduración nuclear y división.

En ovinos, la cisteamina y el BME en el medio de MIV estimularon la síntesis de GSH, pero solamente la cisteamina mejoró el desarrollo embrionario ovino (de Matos *et al.*, 1999).

En la especie porcina, Grupen *et al.* (1995) observaron que la adición de 50 μ M o 500 μ M de cisteamina al medio de maduración aumentaba la incidencia de desarrollo pronuclear sincrónico en ovocitos monospermicos (43% y 45%, respectivamente vs. 10% del control) y poliespermicos (68% y 75%, respectivamente vs. 43% en el control). Grupen *et al.* (1995) demostraron que la adición de 500 μ M al

medio de maduración también tenía un efecto beneficioso sobre el desarrollo embrionario *in vitro* (12% de blastocistos vs. 1% en el control). La mejora total en el desarrollo puede ser atribuido en parte a una incidencia aumentada de la formación pronuclear sincrónica tras la fecundación. Además, los niveles aumentados de componentes tiol en el citoplasma, acumulados durante la maduración cisteamina, pueden persistir en los embriones en división y ayudar a la división celular mitótica (Chance *et al.*, 1979). Esta interpretación explicaría por qué ambas concentraciones de cisteamina aumentaron la formación pronuclear sincrónica mientras que solamente la concentración más alta estimuló de manera significativa el desarrollo embrionario, ya que la mayor concentración de cisteamina permite una mayor acumulación de tioles citoplasmáticos.

Sin embargo, posteriormente, Yamauchi y Nagai (1999) describieron que la cisteamina no debía tener efecto en el aumento de la maduración meiótica en ovocitos porcinos desnudados. En el estudio de Grupen *et al.* (1995), la adición de cisteamina al medio de cultivo a una concentración de 500 μ M aumentó la formación sincrónica de los pronúcleos en COCs madurados y fecundados *in vitro*. Sin embargo, Yamauchi y Nagai (1999) empleando esa misma concentración de cisteamina en ovocitos porcinos desnudados, observaron degeneración de los ovocitos, y ninguno de ellos maduró a metafase II. Además, según citan, Takahashi (comunicación personal) encontró que esa misma elevada concentración de cisteamina en el medio de cultivo era dañina para el cultivo de los embriones bovinos madurados, fecundados y cultivados *in vitro*. Por tanto, según Yamauchi y Nagai (1999) estos resultados indican que las células del cumulus podrían neutralizar el efecto dañino de una elevada concentración de cisteamina en el cultivo de ovocitos.

El estudio de Grupen *et al.* (1995) demuestra claramente el efecto de la cisteamina sobre el aumento del contenido de GSH en COCs porcinos. El contenido de GSH de los ovocitos porcinos antes de la maduración solamente se mantuvo en los ovocitos desnudados tras cultivo con cisteamina. Sin embargo, los ovocitos desnudados debieron de sintetizar GSH durante el cultivo, ya que el contenido de GSH en ovocitos desnudados cultivados con cisteamina fue significativamente mayor que en aquellos desnudados en los que la síntesis de GSH se inhibió con BSO. Además, considerando que el contenido de GSH de los ovocitos desnudados cultivados sin cisteamina fue significativamente menor que en los ovocitos cultivados con BSO en medio suplementado con cisteamina, la adición de cisteamina al medio de cultivo es probablemente importante no sólo para la síntesis de GSH sino que también para la inhibición de la reducción espontánea de GSH durante la maduración *in vitro* de los ovocitos desnudados. El efecto inhibitorio del BSO sobre el contenido de GSH en los COCs fue mayor que en los desnudados tras el cultivo. Mori *et al.* (1998) apuntan que las uniones gap entre ovocitos y células del cumulus están relacionadas con el contenido en GSH de los COCs porcinos cultivados *in vitro* mediante la síntesis de GSH en las células del cumulus o en los ovocitos. Podría existir un mecanismo complejo para incrementar el contenido de GSH de los COCs porcinos en los cuales existen las uniones.

Por otro lado, Yamauchi y Nagai (1999) demostraron que la adición de cisteamina a medio de cultivo aumentaba la formación del pronúcleo masculino particularmente cuando fueron madurados sin células del cumulus. Por ello, sugirieron que las células del cumulus durante la maduración no son siempre necesarias para la formación del pronúcleo masculino en ovocitos porcinos tras la fecundación *in vitro*, y esto podría ser controlado por las condiciones de cultivo *in vitro*. Concluyeron que la adición de cisteamina al medio de

cultivo incrementa la formación del pronúcleo masculino tras la fecundación *in vitro* de ovocitos porcinos desnudos, concomitantemente con un nivel de contenido de GSH aumentado. Sin embargo, la cisteamina no mejoró las tasas de maduración o la actividad quinasa de los ovocitos desnudos al mismo nivel que en los COCs. Los resultados indicaron que la adición de cisteamina al medio de cultivo aumentó escasamente la actividad de la MAPK de los ovocitos madurados solamente cuando las células del cumulus estuvieron presentes durante la maduración.

En otro estudio realizado en ovocitos porcinos por Nagai *et al.* (2000) comparando varias concentraciones de cisteamina en el medio MIV (0, 5, 150, 250, 375 y 500 μ M), se señaló que elevadas concentraciones de cisteamina (superiores a 250 μ M) inhibían la maduración de los ovocitos desnudos. Sin embargo, tras exponerlos a una concentración óptima de cisteamina durante la MIV, se promovía la formación del pronúcleo masculino. Por otro lado, los ovocitos con células del cumulus cultivados con o sin cisteamina mostraron un mayor porcentaje de maduración que los ovocitos desnudos. No obstante, no se hallaron diferencias en el porcentaje de ovocitos penetrados con formación del pronúcleo masculino entre COCs y ovocitos desnudos al emplear cisteamina en su cultivo.

Los ovocitos de hámster madurados en condiciones químicamente definidas sin proteínas ni agentes transportadores de tioles no adquieren la competencia total para la fecundación, ya que la formación del pronúcleo masculino es deficiente en esos ovocitos. En la mayoría de los casos, el núcleo del espermatozoide está bloqueado durante el proceso de descondensación y, ocasionalmente, una parte descondensada de estos núcleos forma estructuras similares a pronúcleos (Kito y Bavister, 1997). Aparentemente, una incapacidad de los ovocitos de hámster para descondensar completamente el núcleo de los espermatozoides en el ooplama impide la formación del pronúcleo masculino. Kito y Bavister (1997) observaron que la cisteamina aumentaba la formación del pronúcleo masculino solo en ovocitos madurados en presencia de 11 aminoácidos y gonadotropinas, y que los aminoácidos solos o la glutamina y las gonadotropinas solas no proporcionaban la adquisición de la competencia para la formación del pronúcleo masculino. La adición de cisteína, gonadotropinas o aminoácidos (glutamina sola o 11 aminoácidos formulados para HECM-6) al medio de MIV mejoró la formación del pronúcleo masculino (47% vs. 17%), pero no hasta los valores de los ovocitos madurados *in vivo* (88%). Sin embargo, la adición de cisteamina al medio con los 11 aminoácidos y gonadotropinas sí que mejoró la descondensación del espermatozoide y la formación del pronúcleo masculino (82%) hasta esos niveles (92%). Las gonadotropinas alteran el metabolismo y el transporte de los aminoácidos en los COCs (Zuelke y Brackett, 1992, 1993). Kito y Bavister (1997) proponen que las gonadotropinas deben estimular el transporte de los aminoácidos o cambiar su actividad metabólica para la producción de factores necesarios para la descondensación del núcleo del espermatozoide. Los 11 aminoácidos incluían glicina, cisteína y glutamina, aminoácidos precursores de la síntesis de GSH (Meister, 1991), hecho que explicaría la mayor frecuencia de formación del pronúcleo masculino respecto a la adición de glutamina sola.

La cisteamina, añadida al de maduración de ovocitos de hámster, junto con 11 aminoácidos y gonadotropinas, mejoró la formación del pronúcleo masculino de forma dosis-dependiente (0, 25, 50, 100 y 200 μ M/l, alcanzando con esta última concentración valores similares a los de los ovocitos madurados *in vivo* (Kito y Bavister, 1997).

IV.15.16.4.4. Cisteamina en el medio de CIV

El efecto de la cisteamina en el medio de cultivo embrionario sobre la competencia para el desarrollo también ha sido evaluado. Takahashi *et al.* (1993) observaron que el incremento en la concentración de GSH intracelular (53.0 vs. 14.6 pmol) causado por la adición de cisteamina al medio de cultivo era beneficioso para el desarrollo de embriones bovinos en estadio de 6-8 células hasta el estadio de blastocisto. Dichos investigadores lograron un mayor desarrollo hasta blastocisto en embriones cultivados en presencia de 10 y 50 μM de cisteamina respecto a su no inclusión, pero no obtuvieron ningún blastocisto al añadir 500 μM de cisteamina. Además, se demostró que este compuesto tiol podía soportar el desarrollo embrionario de embriones bovinos en ausencia de células de soporte. La influencia del GSH intracelular se apoyó en el hallazgo de que el BSO, un inhibidor de la síntesis de GSH (Griffith y Meister, 1979) neutralizó el efecto promotor de los compuestos tiol sobre el desarrollo y la síntesis de GSH de los embriones bovinos, y sugirió que el efecto de dichos compuestos está mediado a través del mantenimiento de los niveles de GSH intracelular.

Reed *et al.* (1992) y Dumoulin *et al.* (1992) reportaron el efecto positivo de la hipotaurina y la taurina (hipotaurina oxidada) sobre el desarrollo embrionario. La cisteamina es un precursor de la hipotaurina y se transforma a hipotaurina por oxidación *in vitro* (Huxtable, 1992). Estos datos hicieron postular a Takahashi *et al.* (1993) que podría haber alguna contribución de la cisteamina con relación al efecto de la hipotaurina sobre el desarrollo de los embriones en sus experimentos. Por otro lado, la taurina ejerce un papel en la capacitación espermática y en la FIV de diferentes especies: los espermatozoides de hámster requieren taurina o hipotaurina en el medio de cultivo para mantener su motilidad y viabilidad durante la capacitación *in vitro* (Mrsny *et al.*, 1979), mientras que estos compuestos aumentan la capacidad fecundante de los espermatozoides *in vitro* (Leibfried y Bavister, 1981, 1982). En vaca, la presencia de hipotaurina en el medio estimula la FIV (Ball *et al.*, 1983). Sin embargo, Dumoulin *et al.* (1992) describen que la taurina no aumenta la capacidad fecundante de los espermatozoides de ratón.

IV.15.16.5. N-acetilcisteína (NAC-CYS)IV.15.16.5.1. *Propiedades*

Se ha demostrado que la NAC-CYS es captada y deacetilada por una amplia variedad de células (Cotgreave *et al.*, 1991). Este agente tiene la ventaja de ser mas soluble en solución acuosa que la cisteína y ser menos oxidable (Bonanomi y Gazzaniga, 1980).

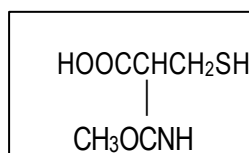


Figura 13. Estructura de la NAC-CYS

IV.15.16.5.2. Antecedentes y modo de acción

La NAC-CYS atrapa radicales libres y es un precursor de la síntesis de GSH (Aruoma *et al.*, 1989; Brennan y Schiestl, 1996). A modo de ejemplo, Gaubin *et al.* (2000) demostraron que el tratamiento de células de pulmón humano de la línea A549 con 20 ó 40 mM de NAC-CYS aumentaba un 30% el nivel de GSH.

La adición de NAC-CYS al medio de cultivo provoca un incremento pronunciado de consumo de [³⁵S]cistina en las células CHO (Meier y Issels, 1995). Yim *et al.* (1994) demostraron que la NAC-CYS estimulaba la síntesis de GSH en las células LAK. El consumo de cistina en las células LAK promovido por NA-CYS ocurre probablemente en forma de cisteína, la cual es principalmente transportada por el sistema ASC. También es probable el consumo de disulfidos mixtos cisteína-NAC-CYS) vía sistema L (Meier y Issels, 1995; Christensen, 1990). Issels *et al.* (1988) apuntaron que en el tratamiento de células CHO con NAC-CYS, la vía de entrada probablemente es el sistema L. El aminoácido análogo producido por deacetilación y un intercambio sulfidril-disulfido, en este caso "tialisina", se transporta dentro de la célula Erlich por el sistema L (Christensen, 1972). Predeciblemente, esta distribución del sulfuro cistina al interior de las células CHO debería favorecer la síntesis de GSH.

Lieberman *et al.* (1996) demuestran que el catabolismo del GSH por la γ -glutamyl transeptidasa (y una dipeptidasa) es una importante fuente de cisteína circulante y que los efectos de la deficiencia de GGT en ratones se pueden revertir en gran parte mediante suplementación con NAC-CYS.

IV.15.16.5.3. NAC-CYS en el medio de MIV

De Matos *et al.* (1997) observaron que la NAC-CYS solamente provocaba un incremento del nivel de GSH intracelular en ovocitos bovinos denudados, pero no en los COCs.

IV.15.16.5.4. NAC-CYS en el medio de CIV

Según Lee *et al.* (1999), empleando NA-CYS en el medio de cultivo embrionario se obtiene un mayor porcentaje de blastocistos eclosionados, a pesar de no haber diferencias en cuanto al porcentaje de divididos y de blastocistos totales.