

Evaluación del YM976 como alternativo a las hormonas gonadotrópicas en la maduración *in vitro* de oocitos bovinos y su competencia para el desarrollo embrionario

YM976 assessment as an alternative to gonadotropic hormones in the *in vitro* maturation of bovine oocytes and its competence for embryonic development

Diego Fernando Carrillo-Gonzalez^{1,3}, Darwin Yovanny Hernández Herrera^{1,4},
Neil Aldrin Vásquez Araque²

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del YM976 como inhibidor específico de la fosfodiesterasa tipo 4 (PDE-4) sobre la maduración *in vitro* de oocitos bovinos y su capacidad de desarrollo embrionario. Para ello, complejos cúmulo-oocito se obtuvieron por aspiración folicular de ovarios obtenidos en planta de sacrificio. Se maduraron *in vitro* por 24 horas en medio TCM-199 suplementado con cuatro concentraciones de YM976 (1, 10, 100 y 1000 nM) o con gonadotropinas (LH y FSH). Se evaluó la expansión del cúmulo por observación visual y la reanudación de la metafase II por tinción con colorante Hoechst. Los oocitos fueron fertilizados y cultivados en medio KSOM Evolve por ocho días. El porcentaje de expansión grado 3 de las células de cúmulo en oocitos cultivados con gonadotropinas fue diferente ($p=0.00016$) respecto de los cultivados en presencia del YM976. La reanudación de la metafase II fue similar entre oocitos madurados a 10 nM de YM976 y los madurados con gonadotropinas. Los oocitos madurados en

¹ Grupo de Investigación en Reproducción y Mejoramiento Genético Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Zootecnia, Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia

² Grupo Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Medellín, Colombia

³ E-mail: diego.carrillo@unisucra.edu.co

⁴ E-Mail: darwin.hernandez@unisucra.edu.co

Recibido: 6 de mayo de 2021

Aceptado para publicación: 5 de noviembre de 2021

Publicado: 22 de diciembre de 2021

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

concentraciones de 1 y 10 nM de YM976 presentaron un desarrollo embrionario temprano similar al encontrado en los madurados con gonadotropinas. Por el contrario, altas concentraciones de YM976 tuvieron efectos deletéreos. En conclusión, concentraciones 1 y 10 nM del inhibidor de PDE-4 YM976 durante la maduración *in vitro* de oocitos retrasa la expansión de las células de la granulosa, pero permite una maduración nuclear y competencia para el desarrollo embrionario, similar a los oocitos madurados con gonadotropinas, sugiriendo que, el uso de YM976 puede ser aplicado en procesos de maduración *in vitro* de oocitos bovinos.

Palabras clave: clivaje, embriones, expansión, fosfodiesterasas tipo 4, maduración *in vitro*, oocitos bovinos

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of YM976 as a specific inhibitor of phosphodiesterase type 4 (PDE-4) on the *in vitro* maturation of bovine oocytes and their capacity for embryonic development. For this, cumulus-oocyte complexes were obtained by follicular aspiration of ovaries obtained in a slaughterhouse. They were matured *in vitro* for 24 hours in TCM-199 medium supplemented with four concentrations of YM976 (1, 10, 100 and 1000 nM) or with gonadotropins (LH and FSH). The expansion of the cumulus was evaluated by visual observation and the resumption of metaphase II by staining with Hoechst dye. The oocytes were fertilized and cultured in KSOM Evolve medium for eight days. The percentage of grade 3 expansion of the cumulus cells in oocytes cultured with gonadotropins was different ($p=0.00016$) compared to those cultured in the presence of YM976. The resumption of metaphase II was similar between oocytes matured at 10 nM YM976 and those matured with gonadotropins. The oocytes matured in concentrations of 1 and 10 nM of YM976 presented an early embryonic development similar to that found in those matured with gonadotropins. In contrast, high concentrations of YM976 had deleterious effects. In conclusion, concentrations of 1 and 10 nM of the PDE-4 inhibitor YM976 during *in vitro* maturation of oocytes delay the expansion of granulosa cells, but allow nuclear maturation and competition for embryonic development, similar to oocytes matured with gonadotropins, suggesting that the use of YM976 can be applied in *in vitro* maturation processes of bovine oocytes.

Key words: bovine oocytes, cleavage, embryos, expansion, *in vitro* maturation, phosphodiesterases type-4

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de producción *in vitro* de embriones (PIVE) son atractivas debido a las posibilidades de disminuir los costos de producción de embriones para la transferencia, el diagnóstico molecular pre-implantación, la clonación de células somáticas o de embriones y para la producción de bovinos trans-

génicos (Otero *et al.*, 2020). Adicionalmente, las PIVE han permitido la investigación básica en los mecanismos de la maduración de oocitos, fertilización y desarrollo embrionario, generando grandes aportes sobre las condiciones de cultivo y factores que mejoren la producción de embriones de buena calidad (Viana *et al.*, 2012; Lonergan y Fair, 2016). Aun así, se reconoce que la baja eficacia de

la PIVE se debe en parte a la reanudación precoz de la meiosis después de la eliminación artificial de los complejos cúmulo-oocito (CCOs) de los folículos antrales (Ramos *et al.*, 2018; Ferré *et al.*, 2020). Cuando el oocito se extrae mecánicamente del folículo antral para la PIVE, el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) que está dentro del oocito disminuye y comienza la reanudación meiótica precoz. Este proceso, ampliamente conocido como maduración nuclear espontánea, se atribuye al agotamiento de los factores inhibidores del folículo (Ramos *et al.*, 2018).

In vivo, en el modelo bovino, la reanudación meiótica, es adquirida por el oocito, posterior al pico de la hormona luteinizante (LH), la cual modula un aumento del AMPc en las células de la granulosa que rodean al oocito e induce el desacoplamiento de las uniones gap con el oocito, induciendo una reducción en las concentraciones de AMPc intra-oocitarias que permite la activación de factores de transcripción que inducen la reactivación meiótica ((Tsafiriri *et al.*, 1996; Conti *et al.*, 2002). Sin embargo, en los procesos de maduración *in vitro*, el oocito es aspirado de un folículo que no ha alcanzado su máximo tamaño y es cultivado por 24 horas en presencia de las gonadotropinas FSH y LH (Bernal-Ulloa *et al.*, 2016), afectándose la calidad de los embriones producidos bajo estas condiciones de maduración (Lopera-Vasquez *et al.*, 2017).

El AMPc es importante en la transducción de señales dentro de la célula y funciona como mensajero celular. Las concentraciones de AMPc se controlan mediante la modulación de su síntesis, por la enzima adenilato ciclasa que convierte el adenosín trifosfato (ATP) en AMPc y pirofosfato (Ramos Leal *et al.*, 2018). Por otro lado, la degradación de AMPc se produce como resultado de la activación de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (PDE) dentro de los complejos cúmulo-oocito (Tsafiriri *et al.*, 1996; Ramos Leal *et al.*, 2018). Así, concentraciones relativamente altas de AMPc dentro del oocito, detienen la activación meiótica al su-

primir el factor promotor de la maduración (FPM) (Duranthon y Renard, 2001; Mayes y Sirard, 2002; Josefsberg *et al.*, 2003; Jones 2004); por el contrario, concentraciones relativamente menores de AMPc inducen la activación de FPM, lo que resulta en la reanudación de la meiosis (Park *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2018).

Lo anterior ha conducido a la búsqueda de modificaciones en los protocolos de producción *in vitro* de embriones, encaminados a la prevención de la maduración nuclear espontánea a través de mediadores químicos. Una alternativa sería el uso de inhibidores de las enzimas fosfodiesterasas del AMPc (Thomas *et al.*, 2004; Botigelli *et al.*, 2017; Ramos *et al.*, 2018; Gupta *et al.*, 2020). Debido a la expresión específica de PDE en la unidad folicular, se han evaluado medicamentos que permitan una inhibición selectiva, aumentando la concentración intracelular de AMPc, ya sea en las células de la granulosa o en el oocito (López *et al.*, 2008). Resultados previos de este grupo de investigación demostraron que el Rolipram, un inhibidor de fosfodiesterasas tipo 4 (PDE4), puede reemplazar la acción de las hormonas gonadotrópicas FSH y LH durante el proceso de maduración *in vitro* de oocitos bovinos (López *et al.*, 2008). Sin embargo, la especificidad del Rolipram por las PDE-4 es del orden micromolar e inhibe otras fosfodiesterasas en otros tejidos, presentando efectos colaterales (López *et al.*, 2008; Ramos Leal *et al.*, 2018). De esta manera, se han desarrollado nuevas generaciones de inhibidores con constantes de inhibición más bajas (Huang *et al.*, 2001; Bolger, 2017), que pueden inducir la maduración del oocito sin afectar su competencia para el desarrollo embrionario *in vitro*.

El 4- (3-clorofenil) -1,7-dietilpirido [2,3-d] pirimidin-2 (1 H)-ona o YM976 es un inhibidor específico de la PDE-4 (Aoki *et al.*, 2001a). Se han estudiado sus efectos en procesos inflamatorios (Aoki *et al.*, 2000), como antiasmático (Aoki *et al.*, 2001b), como relajante muscular (Moriuchi *et al.*, 2003), como

inhibidor de la proliferación de líneas células tumorales (Kowalczyk *et al.*, 2009), como inhibidor de la emesis y náuseas (McDonough *et al.*, 2020) y en combinación con fármacos anestésicos (Aragon *et al.*, 2021). No obstante, no se ha evaluado como inhibidor específico de la PDE-4 durante las PIVE. En la actualidad su nombre ha sido modificado como Y4877 según el catálogo de Sigma Aldrich. En consecuencia, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del inhibidor de fosfodiesterasas tipo 4, YM976, sobre la maduración *in vitro* de oocitos bovinos y su capacidad para formar embriones después de la fertilización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de Ovarios y Manipulación de los Oocitos

Los ovarios de bovino fueron obtenidos de hembras sin definición de raza, sacrificadas en la Central Ganadera de Medellín, Colombia. Inmediatamente después de la evisceración, se eligieron los órganos reproductivos en cuyos ovarios hubiera al menos un cuerpo lúteo. Los ovarios fueron removidos y depositados en solución tampón de fosfato salino (PBS) estéril a 37 °C, y trasladados al Laboratorio de Genética de la Universidad Nacional, sede Medellín, en un tiempo no mayor a 30 minutos.

En el laboratorio, los ovarios fueron lavados dos veces con solución PBS atemperado a 37 °C y puestos en baño maría a la misma temperatura. Los folículos ováricos con tamaño entre 3 y 8 mm fueron aspirados con jeringa de 5 ml y aguja N.º 18. El líquido folicular conteniendo los CCOs fue depositado en un tubo cónico de 15 ml a 37 °C y protegido de la luz. Los aspirados foliculares se pasaron por un filtro de células de poros de 100 μ m de diámetro. Los oocitos fueron separados y depositados en caja de Petri estéril de 60x15 mm, con 3 ml de medio TCM-199 con sales de Hank (Tissue Culture Medium

199, Gibco/Invitrogen). Los CCOs fueron clasificados morfológicamente bajo visión por estereomicroscopio y solo aquellos con células del cumulus compacto y con más tres capas de células de la granulosa fueron seleccionados para el proceso de maduración *in vitro* (Lindner y Wright, 1983; Hawk y Wall, 1994; Ayala *et al.*, 2018). Finalmente, los CCOs fueron lavados tres veces en medio TCM 199 con sales de Hank y transferidos a caja de Petri de 35 mm con el mismo medio, para ser utilizados en los procedimientos experimentales.

Maduración *in vitro* (MIV)

El medio base de maduración *in vitro* estuvo compuesto por TCM199 (12340030, sales de Gibco Earls), que contenía 25 mM de L-glutamina, 6 mg/ml de albúmina de fracción V (BSA), suero fetal bovino al 3%, 1 μ g/ml de 17 β -estradiol, piruvato de sodio 0.30 mM y ácido ascórbico 100 μ M. El medio fue servido en gotas de 50 ml y cubiertas con aceite mineral en cajas de Petri de 35 mm de diámetro. Los CCOs fueron depositados en grupos de 10 por gota para la maduración *in vitro*. Las condiciones de cultivo fueron 38.5 °C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa (Otero *et al.*, 2017).

Tratamientos Experimentales

Los CCOs fueron asignados al azar en una de las seis condiciones de MIV, dos controles (positivo y negativo) y cuatro tratamientos experimentales. Control 1 (C1): medio de maduración suplementado con 25 μ g/ml de hormona estimulante del folículo (Folltropin), 5 UI/ml de hormona luteinizante (Chorulon); Control 2 (C2): medio base de maduración sin suplementación hormonal; Tratamiento 1 (YM1), Tratamiento 2 (YM10), Tratamiento 3 (YM100), Tratamiento 4 (YM1000): medio base de maduración suplementado con 1, 10, 100 o 1000 nM de YM976, respectivamente.

Para evaluar la reanudación de la meiosis en metafase II, los oocitos fueron desnudados y teñidos con Hoechst 33342. Se

utilizó un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i, con filtro C-FL UV-2E/C de 465-495 nm) para determinar la expulsión del primer cuerpo polar en los seis tratamientos.

Fertilización y Desarrollo *in vitro*

Cumplidas las 24 horas de maduración *in vitro* en las condiciones de cultivo, los CCOs fueron lavados en medio de fertilización FERT-TL (IVL02, Caisson Laboratories, USA) suplementado con 10 mg/ml de heparina (Sigma H0519), hipotaurina 1 mM (Sigma H1384), epinefrina 250 mM (Sigma E4642), penicilamina 2 mM (Sigma P4875), solución antibiótica 1X (ICN 1670049 MP Biomedicals) y transferidos a gotas de 50 μ l del mismo medio.

Para todos los procesos de fertilización *in vitro* se utilizó semen congelado del mismo toro. El semen fue descongelado a 37 °C por 1 min, se seleccionaron los espermatozoides viables y móviles mediante gradiente de *swim up* durante 45 min. Se utilizó una concentración final de 2×10^6 espermatozoides/ml. Las condiciones de fertilización fueron de 38.5 °C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa, durante 18-20 horas. Finalizado el tiempo de fertilización, los cigotos fueron transferidos a medio de cultivo KSOM-Evolve (día 1) suplementado con 6 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA-FAF), solución antibiótica 1X y suero fetal bovino al 3% para evaluar el desarrollo embrionario temprano (D1).

Análisis de los Datos

La evaluación de la expansión del complejo cúmulo-oocito se hizo a las 24 horas de MIV, mediante el uso del estereomicroscopio (Nikon SMZ 450, Nikon Instruments, USA). Se consideró como Grado 1: poco o nada de expansión, Grado 2: la expansión moderada de las capas externas del cúmulo y, Grado 3: expansión de todas las capas (Calder *et al.*, 2003; Ayala *et al.*, 2018). La reanudación de la metafase II se evaluó por la expulsión del

primer cuerpo polar. En el desarrollo embrionario temprano, se determinó la tasa de clivaje como número de embriones con dos o más células sobre el total de oocitos inseminados al día 3 (D3), el número de embriones con cuatro o más células sobre el total de oocitos inseminados al D3, la tasa de producción de blastocistos al día 7 (D7) y la tasa de producción de blastocistos expandidos al día 8 (D8).

Los datos fueron tomados utilizando cada una de las gotas de cada tratamiento como una repetición, sobre las cuales se realizaron las mediciones de las variables de respuesta, expansión de las células del cúmulo, reactivación de la meiosis II y desarrollo embrionario temprano (clivaje, embriones de cuatro o más células, embriones en etapa de blastocisto y en blastocisto expandido). El efecto los tratamientos sobre cada variable fue analizada mediante un análisis de varianza unifactorial. Se realizaron pruebas de comparación entre medias mediante la prueba de Tukey para tamaño de muestra (n) desigual en las variables de respuesta. Se estimaron correlaciones de Pearson entre las variables, grado de tres de expansión del cúmulo, reanudación de la meiosis II, tasa de clivaje, embriones con cuatro o más células y porcentaje de embriones en etapa de blastocisto y blastocisto expandido considerando una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $p < 0.05$. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa Statistica v. 10.0 (TIBCO Software, Tulsa OK, USA).

RESULTADOS

El efecto del uso del YM976 sobre el grado de expansión de las células de cúmulo a 24 horas de maduración *in vitro* se presenta en el Cuadro 1. En los grupos control, C1 presentó el mayor grado de expansión (grado 3) ($p = 0.00001$), en tanto que para C2 fue en el grado 1 ($p = 0.01652$). El porcentaje de grado expansión de las células del cúmulo no varió significativamente entre los grupos suplementados con YM976. Por otro lado, para

Cuadro 1. Efecto del uso del YM976 en la expansión de las células de cúmulo a 24 horas de maduración *in vitro* de complejos cúmulo-oocito bovinos (%)

Tratamiento	n	Expansión del cúmulo			p-valor
		Grado 1	Grado 2	Grado 3	
		Promedio ± DE	Promedio ± DE	Promedio ± DE	
C1	110	1.63±0.48 ^{B,b}	17.22±16.11 ^{B,a}	81.12±15.07 ^{A,a}	0.00001
C2	110	63.46±36.04 ^{A,a}	23.18±21.43 ^{B,a}	13.36±11.61 ^{B,b}	0.01652
YM1	90	43.01±34.59 ^{A,a}	32.16±31.38 ^{A,a}	24.83±23.19 ^{A,b}	0.59313
YM10	50	52.81±44.78 ^{A,a}	23.97±23.71 ^{A,a}	23.22±21.54 ^{A,b}	0.23811
YM100	70	32.89±19.71 ^{A,a}	46.68±16.17 ^{A,a}	20.43±15.79 ^{A,b}	0.07718
YM1000	80	50.16±26.83 ^{A,a}	37.41±21.85 ^{A,a}	12.43±11.91 ^{B,b}	0.03546
p-valor		0.02226	0.80066	0.00016	

^{A,B} Indican diferencias estadísticas entre valores de la misma fila

^{a,b} Indican diferencias estadísticas entre valores de la misma columna

C1: medio de maduración suplementado con 25 µg/ml de hormona estimulante del folículo, 5 UI/ml de hormona luteinizante, C2: medio base de maduración sin suplementación hormonal; YM1, YM10, YM100, YM1000: medio base de maduración suplementado con 1, 10, 100 o 1000 nM de YM976, respectivamente

Grado 1: poco o nada de expansión, Grado 2: la expansión moderada de las capas externas del cúmulo y, Grado 3: expansión de todas las capas

Cuadro 2. Efecto del uso del YM976 en la reanudación meiótica de oocitos bovinos cultivados *in vitro* (%)

Tratamiento	Reanudación de la metafase II	
	n	Promedio ± DE
C1	120	79.2±4.3 ^a
C2	110	55.9±7.5 ^c
YM1	90	60.4±9.2 ^b
YM10	60	84.0±13.1 ^a
YM100	70	61.8±6.2 ^b
YM1000	80	45.8±5.9 ^c
p-valor		0.00015

^{a,b,c} Indican diferencias estadísticas entre valores

C1: medio de maduración suplementado con 25 µg/ml de hormona estimulante del folículo, 5 UI/ml de hormona luteinizante, C2: medio base de maduración sin suplementación hormonal; YM1, YM10, YM100, YM1000: medio base de maduración suplementado con 1, 10, 100 o 1000 nM de YM976, respectivamente

el grado 1 de expansión, el menor porcentaje se observó en el grupo de oocitos madurados en presencia de gonadotropinas (C1) ($p=0.02226$); en cambio, para el grado 3, la mayor cantidad de oocitos con cúmulo expandido se encontró en C1 ($p=0.00016$), no habiendo diferencias significativas entre tratamientos para el grado 2.

Los oocitos madurados en presencia de gonadotropinas (C1) y bajo una concentración del inhibidor de PDE-4 YM976 de 10 nM (YM10) presentaron los porcentajes más altos de reanudación de la metafase II (Cuadro 2). Los tratamientos YM1 y YM100 presentaron resultados similares entre sí, pero menores a C1 y YM10. Los menores porcentajes de reanudación meiótica se observaron en YM1000 y C2.

El desarrollo embrionario temprano por efecto del YM976 durante la producción *in vitro* de embriones bovinos se presenta en el Cuadro 3. La tasa de clivaje al día 3 no varió

Cuadro 3. Efecto del uso del YM976 en el desarrollo embrionario temprano durante la producción *in vitro* de embriones bovinos (%)

Tratamiento	Tasa de clivaje		Cuatro o más células		Blastocisto		Blastocisto expandido	
	n	Promedio ± DE	n	Promedio ± DE	n	Promedio ± DE	n	Promedio ± DE
C1	50	72.7±19.9 ^a	70	44.6±23.8 ^a	70	21.0±2.7 ^a	50	43.5±15.3 ^a
YM1	50	73.6±22.2 ^a	60	42.4±22.9 ^a	60	26.2±13.3 ^a	60	43.7±19.8 ^a
YM10	60	62.7±2.7 ^a	80	40.1±10.2 ^a	60	22.9±4.4 ^a	80	37.7±3.4 ^a
YM100	30	69.0±9.0 ^a	50	43.6±9.7 ^a	30	10.5±0.5 ^b	30	15.3±1.3 ^b
YM1000	40	50.3±9.9 ^a	50	15.8±2.0 ^b	40	10.7±1.4 ^b	30	20.0±1.0 ^b
p-valor	0.33701		0.01334		0.02031		0.01703	

^{a,b,c} Indican diferencias estadísticas entre valores de la misma columna

C1: medio de maduración suplementado con 25 µg/ml de hormona estimulante del folículo, 5 UI/ml de hormona luteinizante, YM1, YM10, YM100, YM1000: medio base de maduración suplementado con 1, 10, 100 o 1000 nM de YM976, respectivamente

entre tratamientos ($p=0.33701$). El número de embriones con cuatro o más células fue menor en YM1000 ($p=0.01334$). El porcentaje promedio de embriones que alcanzó esta fase en C1, YM1, YM10 y YM100 fue de 42.68%. El porcentaje de embriones que se desarrollaron hasta la etapa de blastocisto al día 7 y la fase de blastocisto expandido fue mayor ($p=0.02031$ y $p=0.01703$, respectivamente) en C1, YM1 y YM10 respecto a YM100 y YM1000.

Las correlaciones de Pearson entre las variables en estudio se presentan en el Cuadro 4. Solo se encontró una correlación significativa ($p=0.045$) y de magnitud positiva, entre el grado 3 de expansión del cúmulo y la tasa de clivaje. La reactivación de la meiosis II presentó correlaciones negativas ($p>0.05$) con las variables de desarrollo embrionario temprano, al igual que entre en embrión con cuatro o más células y los blastocistos expandidos.

DISCUSIÓN

La maduración del oocito se inicia durante el crecimiento folicular y se completa durante el pico preovulatorio de LH, el cual induce la ovulación. Esta maduración, involucra cambios a nivel citoplasmático y nuclear, que capacitan al oocito para los posteriores eventos como la fertilización y el desarrollo embrionario (Sovernigo *et al.*, 2017). Por otro lado, la competencia meiótica se refiere a la capacidad del oocito para completar el ciclo meiótico o maduración nuclear, que es adquirida durante el crecimiento folicular y está estrechamente relacionada con el tamaño del oocito y este a su vez con el tamaño del folículo (Bo y Mapletoft, 2013); mientras que la adquisición de la competencia para el desarrollo depende de la íntima relación del oocito con las células de la granulosa, cuya función principal es la de nutrir al oocito hasta etapas finales de su desarrollo (Alemu *et al.*, 2018).

Cuadro 4. Correlaciones de Pearson entre las variables de respuesta estudiadas sobre la maduración y desarrollo embrionario temprano durante la producción *in vitro* de embriones bovinos

	Grado 3 de expansión del cúmulo	Reactivación de la meiosis II	Tasa de clivaje	Cuatro o más células	Blastocisto	Blastocisto expandido
Grado 3 de expansión del cúmulo		0.125	0.045	0.678	0.789	0.112
Reactivación de la meiosis II	0.710		0.657	0.345	0.875	0.578
Tasa de clivaje	0.887	0.371		0.232	0.672	0.837
Cuatro o más células	0.281	-0.377	0.654		0.074	0.567
Blastocisto	0.269	-0.470	0.560	0.732		0.572
Blastocisto expandido	0.713	0.489	0.489	-0.132	0.368	

Valores de correlación por debajo de la diagonal. Valores de probabilidad por encima de la diagonal

Sin embargo, durante la producción *in vitro* de embriones, los oocitos son aspirados del folículo, interrumpiendo la maduración que ha estado adquiriendo durante la dinámica folicular, para ser sometidos a una maduración forzosa en presencia de gonadotropinas. Durante este tiempo, las gonadotropinas inducen la expansión y maduración nuclear hasta metafase II en el oocito, procesos que son mediados principalmente por la vía del AMPc (Ramos *et al.*, 2018). Cuando los niveles de AMPc dentro del oocito disminuyen, se induce la continuación de la meiosis, caracterizada por el rompimiento de la vesícula germinal generando la maduración del oocito (Ferré *et al.*, 2020). A su vez, los niveles de AMPc son regulados por las enzimas fosfodiesterasas (PDE) que hidrolizan el AMPc en AMP, con una expresión específica de compartimiento en la unidad folicular, donde la PDE tipo 3 (PDE-3) se expresa en el oocito y la PDE tipo 4 en las células del cúmulo (López *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2020). Así entonces, la utilización del YM976 debería prevenir la degradación de AMPc en

oocitos bovinos, resultando en su acumulación en cúmulos y oocitos, manteniendo estables las uniones gap, retardando la reanudación de la meiosis (Santana *et al.*, 2019). Esta prolongación de las uniones gap durante la maduración *in vitro* en presencia de inhibidores de PDE-4 podría permitir el paso de metabolitos, iones, nucleótidos y aminoácidos, que mejoran la maduración citoplasmática del oocito, aproximándose a una sincronización entre la maduración citoplasmática y nuclear (Luciano *et al.*, 2011).

De cumplirse lo anterior, el porcentaje de maduración nuclear encontrado en los tratamientos YM1, YM10, YM100 y YM1000, deberían ser similares al encontrado en cúmulos madurados en presencia de gonadotropinas. Sin embargo, el resultado demuestra una cinética diferente, donde, tanto para los grados 1 y 3 de expansión del cúmulo, las estructuras maduras en presencia de gonadotropinas fueron mayores (Cuadro 1). En el grado 3, es clara la relación inversa

entre el porcentaje de maduración y el aumento en la concentración de YM976 en el medio de cultivo. También, durante la reanudación de la meiosis II (Cuadro 2), se nota que, en la concentración de 10 nM de YM976 se alcanza el mayor valor, para luego disminuir de manera inversamente proporcional a la concentración de YM976. Estos resultados podrían ser explicados de dos maneras: concentraciones altas de YM976 (YM100 y YM1000) podrían tener efecto inhibitorio sobre la PDE-3 localizada en el oocito; por otro lado, la expresión diferencial de subtipos de PDE-4 (A, B, C, D) o variantes generadas por *splicing* alternativo, provocarían una amplia variedad de isoformas de fosfodiesterasa con mecanismos diversos de regulación de la actividad su catalítica (Santana *et al.*, 2019).

Resultados similares son presentados al utilizar los inhibidores de PDE-4 Rolipram, Buro lactona I, Ro 20-1724, Roflumilast y Roscovitina, sobre la reanudación de la meiosis II (Huang *et al.*, 2001; Sagirkaya *et al.*, 2007; López *et al.*, 2008; Marques *et al.*, 2011; Santana *et al.*, 2019). Esto demuestra las posibles diferencias en la cinética de maduración según el bloqueador y su mecanismo de acción. Este reporte sería el primero en evaluar el efecto del YM976 sobre el grado de expansión de cúmulo, un indicador confiable de la futura calidad del embrión (Bo y Mapletoft, 2013; Lopera-Vasquez *et al.*, 2017).

El porcentaje de clivaje no varió significativamente entre todas las condiciones experimentales utilizadas, con un rango entre 50.3 y 73.6%, sugiriendo que el porcentaje de clivaje no es un buen criterio para evaluar la competencia del oocito, debido a que se presentaron diferencias en el porcentaje de maduración nuclear que no se correlacionan con los porcentajes de clivaje. Tasas similares a las del presente estudio son reportados por Alm *et al.* (2005) (67.4%), Sagirkaya *et al.* (2007) (76.2%) y Santana *et al.* (2019) (67.5%), utilizando otros inhibidores de PDE. Por otro lado, el porcentaje de embriones en estado de cuatro o más células

fue similar a otros reportes (Sirard, 2017; Marques *et al.*, 2011; Santana *et al.*, 2019). En el presente estudio, solo el tratamiento de mayor concentración del inhibidor YM976 (YM1000) fue diferente al resto de tratamientos, sugiriendo que esa concentración puede tener un efecto deletéreo durante la maduración de oocito. Esto también se observó por la correlación negativa entre embriones en estado de cuatro o más células y el porcentaje de embriones en estado de blastocisto expandido.

Concentraciones bajas de YM976 (1 y 10nM) favorecieron el desarrollo de los embriones hasta la etapa de blastocisto, con porcentajes similares a los obtenidos en los oocitos madurados en presencia de gonadotropinas. Esto es concordante con el uso de Rolipram (López *et al.*, 2008, Santana *et al.*, 2019) y Buro lactona I (Marques *et al.*, 2011) como inhibidores de PDE en el medio de cultivo. Estas diferencias en el porcentaje de blastocistos con YM100, a pesar de que el porcentaje de maduración nuclear y de clivaje fueron similares a los resultados con YM1, sugieren que el parámetro del porcentaje de blastocisto es un criterio de evaluación de la competencia y calidad del oocito.

Los datos sugieren una relación inversa entre la concentración del YM976 en el medio de maduración del oocito y la cantidad de embriones que llegaron hasta la etapa de blastocisto expandido, obteniéndose valores similares al control con bajas concentraciones del inhibidor (1 y 10 nM). Es posible que la baja eficiencia en la producción de embriones podría estar relacionadas con la concentración del inhibidor; no obstante, también podría ser afectada tanto por la calidad intrínseca del oocito como por las condiciones cultivo *in vitro*. En este sentido, se ha reportado que cuando la maduración nuclear de los oocitos se produce durante un periodo de tiempo prolongado utilizando un inhibidor de PDE-4 en el medio de maduración, la calidad de los embriones producidos es claramente reducida (Santana *et al.*, 2019). Sin embargo, en el presente estudio, la duración

del proceso de maduración *in vitro* para todos los tratamientos fue de 24 horas, que es el tiempo usual para este procedimiento.

Por último, las diferencias entre los resultados del presente estudio y los reportes de literatura podrían justificarse por el tipo de oocitos recuperados en ovarios de planta de sacrificio, los cuales son heterogéneos en términos de calidad y competencia. Finalmente, se sugiere evaluar un rango entre 1 y 10 nM para determinar la concentración óptima del inhibidor para la producción *in vitro* de embriones bovinos.

CONCLUSIONES

- Las concentraciones 1 y 10nM del inhibidor de PDE-4 YM976, durante la maduración *in vitro* de oocitos, disminuyen la expansión de las células de la granulosa.
- Altas concentraciones (100 y 1000 nM) del inhibidor de PDE-4 YM976 presentan efectos deletéreos sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos, mientras que, en concentraciones de 1 y 10 nM como único estímulo, presentan una maduración nuclear y competencia para el desarrollo embrionario similar a los oocitos madurados con gonadotropinas, sugiriendo que pueden ser aplicadas en procesos de maduración *in vitro* de oocitos bovinos.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del proyecto código 90201020. Al grupo de Biotecnología Animal por proporcionar la infraestructura necesaria para la realización de este trabajo. A la Central Ganadera de Medellín, por su colaboración en el aporte del material biológico. A los profesionales Viviana Torres, Silvia Naranjo, Diana Maturana, Juan Camilo Álvarez y demás miembros del grupo de trabajo quienes apoyaron en los procesos de laboratorio y procesamiento del material de estudio.

LITERATURA CITADA

1. **Alemu TW, Pandey H, Salilew-Wondim D, Gebremedhn S, Neuhofer C, Tholen E, Holker M, et al. 2018.** Oxidative and endoplasmic reticulum stress defense mechanisms of bovine granulosa cells exposed to heat stress. *Theriogenology* 110: 130-41. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.12.042
2. **Alm H, Torner H, Löhrke B, Viergutz T, Ghoneim IM Kanitz W. 2005.** Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology* 63: 2194-2205. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.050
3. **Aoki M, Fukunaga M, Kitagawa M, Hayashi K, Morokata T, Ishikawa G, Kubo S, et al. 2000.** Effect of a novel anti-inflammatory compound, YM976, on antigen-induced eosinophil infiltration into the lungs in rats, mice, and ferrets. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 1149-1155.
4. **Aoki M, Fukunaga M, Sugimoto T, Hirano Y, Kobayashi M, Honda K, Yamada T. 2001a.** Studies on mechanisms of low emetogenicity of YM976, a novel phosphodiesterase type 4 inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 1142-1149.
5. **Aoki M, Yamamoto S, Kobayashi M, Ohga K, Kanoh H, Miyata K, Honda K, Yamada T. 2001b.** Antiasthmatic effect of YM976, a novel pde4 inhibitor, in guinea pigs. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 165-173.
6. **Aragon IV, Boyd A, Abou Saleh L, Rich J, McDonough W, Koloteva A, Richter W. 2021.** Inhibition of CAMP-Phosphodiesterase 4 (PDE4) potentiates the anesthetic effects of isoflurane in mice. *Biochem Pharmacol* 186: 114477. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114477
7. **Ayala L, Samaniego G, Nieto P, Rodas R, Dutan J, Calle G, Murillo Y, et al. 2018.** Competencia del ovocito bovino obtenido por ovum pick-up valorado

- mediante el azul brillante de cresilo. *Rev Inv Vet Perú* 29: 552-558. doi: 10.15381/rivep.v29i2.13816
8. **Bernal-Ulloa S, Heinzmann J, Herrmann D, Hadeler K, Aldag P, Winkler S, et al. 2016.** Cyclic AMP affects oocyte maturation and embryo development in prepubertal and adult cattle. *Plos One* 11(2): e0150264. doi: 10.1371/journal.pone.0150264
 9. **Bo G, Mapletoft R. 2013.** Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim Reprod* 10: 344-348.
 10. **Bolger GB. 2017.** The PDE4 CAMP-Specific phosphodiesterases: targets for drugs with antidepressant and memory-enhancing action 63-102. In: Han-Ting Z, Xu Y, James M. O'Donnell (eds). *Phosphodiesterases: CNS functions and diseases*. Advances in neurobiology. Springer. P 63-102.
 11. **Botigelli RC, Schwarz KL, Zaffalon FG, Del Collado M, Castro FC, Fernandes H, Verde CL. 2017.** Influence of nitric oxide and phosphodiesterases during *in vitro* maturation of bovine oocytes on meiotic resumption and embryo production. *Zygote* 25: 321-330. doi: 10.1017/S096719941700017X
 12. **Calder MD, Caveney AN, Smith LC, Watson AJ. 2003.** Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and CX43 marker gene *mRNAs* during maturation *in vitro*. *Reprod Biol Endocrin* 11: 1-14. doi: 10.1186/1477-7827-1-14
 13. **Conti M, Bo C, Richard F, Mehats C, Sang-Young Chun, Horner K, Jin C, Tsafiriri A. 2002.** Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Moll Cell Endocrinol* 187: 153-59. doi: 10.1016/S0303-7207(01)00686-4
 14. **Duranthon V, Renard JP. 2001.** The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* 55: 1277-1289. doi: 10.1016/S0093-691X(01)004-82-4
 15. **Ferré LB, Kjelland ME, Ströbech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross JP. 2020.** Review. Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal* 14: 991-1004. doi: 10.1017/S1751731119002775
 16. **Gupta A, Pandey AN, Sharma A, Tiwari M, Yadav PK, Yadav AK, Pandey AK, et al. 2020.** Cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors: possible therapeutic drugs for female fertility regulation. *Eur J Pharmacol* 883: 173293. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.-173293
 17. **Hawk H, Wall R. 1994.** Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology* 41: 1571-1583. doi: 10.1016/0093-691X(94)90823-2
 18. **Huang Z, Ducharme Y, Macdonald D, Robichaud A. 2001.** The next generation of PDE4 Inhibitors. *Curr Opin Chem Biol* 5: 432-438. doi: 10.1016/S1367-5931(00)00224-6
 19. **Jones KT. 2004.** Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Moll Hum Reprod* 10: 1-5. doi: 10.1093/molehr/gah009
 20. **Josefsberg L, Galiani D, Lazar S, Kaufman O, Seger R, Dekel N. 2003.** Maturation-promoting factor governs mitogen-activated protein kinase activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. *Biol Reprod* 68: 1282-1290. doi: 10.1095/biolreprod.102.006882
 21. **Kowalczyk P, Kinjo T, Kowalczyk M, Walaszek Z, Hanausek M, Slaga T. 2009.** Effect of phosphodiesterase antagonists on glucocorticoid mediated growth inhibition in murine skin cell lines. *Eur J Pharmacol* 610: 29-36. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.03.039
 22. **Lindner GM, Wright RW. 1983.** Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20: 407-416. doi: 10.1016/0093-691x(83)90201-7

23. **Lonergan P, Fair T. 2016.** Maturation of oocytes *in vitro*. *Annu Rev Anim Biosci* 4: 255-268. doi: 10.1146/annurev-animal-022114-110822
24. **Lopera-Vasquez R, Hamdi M, Maillou V, Lloreda V, Coy P, Gutierrez-Adan A, Bermejo-Alvarez P, et al. 2017.** Effect of bovine oviductal fluid on development and quality of bovine embryos produced *in vitro*. *Reprod Fert Develop* 29: 621-629. doi: 10.1071/RD15238
25. **López Y, Mejía A, Escobar E, Jaramillo B, Vásquez N, Echavarría H. 2008.** Efecto del inhibidor de fosfodiesterasa tipo 4-Rolipram, sobre la maduración *in vitro* de oocitos bovinos. *Rev Colomb Cienc Pecu* 21: 59-65.
26. **Luciano A, Franciosi F, Modina SC, Lodde V. 2011.** Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through camp-dependent mechanism(s). *Biol Reprod* 85: 1252-1259. doi: 10.1095/biolreprod.-111.092858
27. **Marques M, Mello M, Tavares L, Nicácio A, Assumpção A, Visintin J. 2011.** Maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos após bloqueio da meiose com inibidores de MPF. *Braz J Vet Res Anim Sci* 48: 468-477. doi: 10.11606/S1413-95962011-000600005
28. **Mayes M, Sirard M. 2002.** Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest. *Biol Reprod* 66: 180-184. doi: 10.1095/biolreprod66.1.180
29. **McDonough W, Aragon IV, Rich R, Murphy JM, Abou L, Boyd A, Koloteva A, et al. 2020.** PAN-Selective inhibition of CAMP-phosphodiesterase 4 (PDE4) induces gastroparesis in mice. *FASEB Jo* 34: 12533-12548. doi: 10.1096/fj.202001016RR
30. **Moriuchi H, Nakahara T, Maruko T, Sakamoto K, Ishii K. 2003.** Relaxant effect of YM976, a novel phosphodiesterase 4 inhibitor, on bovine tracheal smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 470: 57-64. doi: 10.1016/s0014-2999(03)-01754-0
31. **Otero R, Costa ED, Pereira E. 2017.** Maturação nuclear *in vitro* de ovócitos bovinos selecionados pelo método azul cresil brilhante. *Rev Colomb Cienc Anim* 9: 345-354. doi: 10.24188/recia.v9.n2.-2017.617
32. **Otero R, Hernández-Herrera D, Pérez J. 2020.** Producción de embriones transgénicos bovinos por microinyección de un vector lentiviral pre y pos fertilización. *Biotec Sec Agropec Agroind* 18: 64-73. doi: 10.18684/bsaa.v18n1.1412
33. **Park B, Lee H, Lee Y, Elahi F, Lee J, Lee ST, Park C, Hyun S, Lee E. 2016.** Cilostamide and forskolin treatment during pre-IVM improves preimplantation development of cloned embryos by influencing meiotic progression and gap junction communication in pigs. *Theriogenology* 86: 757-765. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.02.029
34. **Ramos G, Santos C, Gonçalves J, Souza, de Paula C, Garcia L, Reis A, Serapião R. 2018.** Role of CAMP modulator supplementations during oocyte *in vitro* maturation in domestic animals. *Anim Reprod Sci* 199: 1-14. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.11.002
35. **Ramos Leal G, Santos A, Gonçalves J, Vasconcelos C, Altamiro L, Reis Ferreira A, Varella R. 2018.** Role of CAMP modulator supplementations during oocyte *in vitro* maturation in domestic animals. *Anim Reprod Sci* 199: 1-14. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.-11.002
36. **Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First N, Parrish J, Memili E. 2007.** Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation

- and culture conditions. *Animal Reprod Sci* 101: 225-240. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.09.016
37. **Santana BB, Sobral GG, Gomes ET, Batista AM, Teixeira LPR, Tavares KCS, Bertolini M, et al. 2019.** Effect of Rolipram on *in vitro* maturation, gene expression and embryonic development in bovines. *Arq Bras Med Vet Zoo* 71: 1433-1444. doi: 10.1590/1678-4162-10214
38. **Sirard M. 2017.** The Influence of *in vitro* fertilization and embryo culture on the embryo epigenetic constituents and the possible consequences in the bovine model. *J Dev Orig Hlth Dis* 8: 411-417. doi: 10.1017/S2040174417000125
39. **Sovernigo TC, Adona PR, Monzani PS, Guemra S, Barros FDA, Lopes FG, Leal CLV. 2017.** Effects of supplementation of medium with different antioxidants during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reprod Domest Anim* 52: 561-569. doi: 10.1111/rda.12946
40. **Thomas RE, Thompson CJ, Armstrong DT, Gilchrist RB. 2004.** Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during *in vitro* maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. *Biol Reprod* 70: 548-556. doi: 10.1095/biolreprod.-103.021204
41. **Tsafiri A, Sang-Young Chun, Zhang R, Hsueh AJW, Conti M. 1996.** Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Dev Biol* 178: 393-402. doi: 10.1006/dbio.-1996.0226
42. **Viana J, Siqueira M, Palhao M, Camargo L. 2012.** Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. *Anim Reprod* 9: 12-18.