

Efecto de la melatonina sobre la competencia ovocitaria de ovocitos bovinos

Effect of melatonin on the oocyte competition of bovine oocytes

Pirela, A. A.¹, Hernández, H.J.¹, Osorio, C.C.¹, Urdaneta, A., Aranguren J.¹, Hernández, J.P.¹, Mosquera, J.²

¹ Laboratorio de Fecundación *in vitro*, Unidad en Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Venezuela.

² Instituto de Investigaciones Clínicas Américo Negrete, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Venezuela.

Autor para correspondencia: amaru.pirela@fcv.luz.edu.ve

1. INTRODUCCIÓN

El establecimiento de programas de Producción *in vitro* de Embriones (PIVE) se presenta como una herramienta para de los sistemas de producción bovina y como una forma de obtener entre un 30 a 40% de crías post Transferencia de Embriones (TE). El estrés oxidativo resultante de la exposición a concentraciones elevadas de oxígeno, luz, concentraciones inusuales de metabolitos y sustratos que inducen reacciones químicas perjudiciales, que provocan la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RON/RNS), ponen en peligro la PIVE. Aunque los gametos poseen mecanismos especializados que le permiten contrarrestar los efectos nocivos de estos radicales, bajo las condiciones *in vitro*, esto genera daños tanto estructurales como funcionales a nivel de mitocondrias, membrana lipídica, ácidos nucleicos, hasta provocar la apoptosis celular (Otoi, Do, Shibata, Taniguchi, Nii *et al.*, 2015). Una estrategia para bloquear los efectos dañinos de ROS/ RNS durante la PIVE, es la suplementación de antioxidantes al medio de cultivo (Papis, Poleszczuk, Wentamuchalska, & Modlinski, 2007; El-Raey, Geshi, Somfai, Kaneda, Hirako *et al.*, 2011; Rodrigues-Cunha, Mesquita, Bressan, Collado, Balieiro *et al.*, 2016).

La Melatonina (MLT) es una indolamina secretada por la glándula pineal que posee un poder antioxidante muy versátil en comparación con otros antioxidantes. Estudios previos demuestran que las suplementaciones en los medios de cultivos con melatonina mejoran la tasa de desarrollo de embriones de ratón fecundados. En ovejas, los suplementos de melatonina incrementaron las tasas de eclosión de blastocistos. La adición de melatonina durante la maduración *in vitro* promueve la competencia meiótica en ovocitos bovinos (El-Raey *et al.*, 2011). Un Estudio reciente demostró que ovocitos bovinos madurados en medios suplementados con MLT son capaces de mejorar el desarrollo embrionario *in vitro* (Tian, Wang, Zhang, He, Ji *et al.*, 2017), así como también proteger las células del cúmulo de la fragmentación nuclear y aumentar la expresión génica de las enzimas antioxidantes (Rodrigues-Cunha *et al.*, 2016). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la suplementación con Melatonina sobre la competencia ovocitaria y la fecundación de ovocitos bovinos.

2. METODOLOGÍA

Los ovarios bovinos fueron obtenidos post-mortem de hembras mestizas *Bos taurus x Bos indicus*, transportados al laboratorio en solución buffer fosfato salina (PBS) a una temperatura entre 30 y 36°C. Fueron lavados dos veces en PBS y un tercer lavado con PBS + 50mg ml⁻¹ de gentamicina (G1397, Sigma). Posteriormente se aspiraron los folículos (3-7 mm de diámetro) con una jeringa provista de una aguja 19G; seguidamente, bajo el microscopio estereoscópico se seleccionaron los complejos cúmulus ovocitos (COC's) que presentaron mayor tamaño, zona pelúcida intacta, citoplasma

homogéneo y una multi-capa de células del cúmulus completas y compactas. Luego, los ovarios fueron lavados tres veces en medio TCM-199 (M-7528, Sigma EE.UU.) suplementado con 5 µl de 17 β- estradiol (E2758, Sigma), 500 µl de suero fetal bovino (SFB; 26140 Gibco), 5 µl de Hormona Folículo Estimulante FSH (500UI, pluset), 5µl piruvato sódico (P5280, Sigma), y 50µl de gentamicina (G1397, Sigma). Posteriormente, los COC's fueron cultivados en grupos de 20-25 por gota de 100 µl de medio y cubiertas con aceite mineral durante 24 horas a 38.5°C en una atmosfera con 5% de CO² en aire saturado de humedad (El-Reay *et al.*, 2011). La Melatonina fue preparada en medio TCM-199, filtrada con un filtro millipore de 0.22 µm y almacenada a -4°C por aproximadamente 15 días.

En esta investigación se utilizaron 4 grupos experimentales: Grupo Control (0), Grupo 1 (10 ng ml⁻¹), Grupo 2 (50 ng ml⁻¹) y Grupo 3 (100 ng ml⁻¹). La FIV se realizó con semen congelado de toros de probada fertilidad. Las pajuelas se descongelaron en baño María a 37°C durante 30 segundos. Seguidamente se colocó el semen en una columna formada por un gradiente discontinuo de Percoll 45% y 90% (P4937, Sigma), para realizar dos lavados con medio TL-FIV suplementado con 6 mg ml⁻¹ de BSA (A6003, Sigma) y centrifugando: (1) a 5600 rpm x 10 min, (2) a 2500 rpm x 5 min. Luego se ajustó la concentración a 1x10⁶ por mililitro de espermatozoides, para proceder a inseminar las gotas con 5 µL (Papis *et al.*, 2007). Los gametos fueron puestos en co-cultivo en los diferentes grupos por 30 horas bajo condiciones de incubación antes mencionadas.

Para evaluar el estadio nuclear y de los presuntos embriones, las células fueron fijadas en una solución de etanol-ácido acético en proporción 3:1 durante 24 horas a 4°C y teñidas con orceína acética al 1%. Posteriormente se determinó la progresión meiótica y tasa de fecundación bajo microscopio óptico (400X, Olympus CX31, Japón). Las muestras de ovocitos y embriones fueron analizadas mediante el test de χ². Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando P<0.05.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 1,308 ovocitos fueron utilizados en este estudio con el fin de evaluar los efectos de la melatonina exógena sobre la MIV de ovocitos. Estos ovocitos fueron distribuidos en cuatro grupos experimentales. La tasa de MIV de ovocitos del grupo control fue de 68.51%, valor similar al encontrado en los demás grupos experimentales 1, 2 y 3 (68.41%; 66.21% y 64.65%, respectivamente; P>0.05). Hubo similar comportamiento entre tratamientos con respecto al porcentaje de embriones divididos luego de la FIV.

El papel de la MLT dentro de la PIVE ha sido investigado ampliamente, demostrando su papel citoprotector, incluyendo funciones antioxidantes y antiapoptóticas, lo cual evidencia un efecto beneficioso dentro de los sistemas *in vitro*. En este estudio se evaluó el efecto de la suplementación en un medio de cultivo para MIV, sobre la maduración nuclear, así como también se valoró el desarrollo de esos ovocitos en la siguiente etapa del ciclo, es decir, en la FIV.

Bajo las condiciones de trabajo de este estudio la MLT adicionada al medio de MIV no demostró tener efectos significativos en las dosis empleadas tal como lo reportado por Rodrigues-Cunha *et al.* (2016), donde no mostro diferencias entre los tratamientos y el grupo control al adicionarle MLT al medio de MIV en concentraciones de 1x10⁻⁶ y 1x10⁻⁹. Incluso se midió el efecto durante la división, blastocisto y eclosión siendo similar este comportamiento.

Tabla 1. Resultados en porcentajes de la maduración *in vitro* MIV donde se muestran ovocitos en metafase II (MII) y porcentajes de embriones divididos resultantes de la Fecundación *in vitro* FIV.

Tratamientos	Maduración <i>in vitro</i> MIV <i>Ovocitos en MII (%)</i>	Fecundación <i>in vitro</i> FIV <i>Embriones Divididos >2 cel. (%)</i>
Control	68.51	61.43
Grupo 1 (10 ng ml ⁻¹)	68.41	64.71
Grupo 2 (50 ng ml ⁻¹)	66.21	60.40
Grupo 3 (100 ng ml ⁻¹)	64.65	57.22

En contraste, otros investigadores han demostrado la mejora de las tasas de maduración con MLT, como lo reportado por El-Raey *et al.* (2011), quienes utilizaron concentraciones similares a las de este estudio y obtuvieron un incremento en la tasa de progresión meiótica de ovocitos en MII (93%) utilizando la concentración de MLT más baja (10 ng ml⁻¹). El mecanismo por el cual la melatonina pudiese estimular la meiosis se desconoce, pero podría estar relacionado con la activación del factor promotor de maduración (MPF). La variación entre resultados pudiese estar relacionado a cambios a nivel de sistemas y medios de cultivo, concentraciones de MLT, manipulación, así como el uso de medios químicamente definidos y adición de factores de crecimientos.

4. CONCLUSIÓN

Bajo las condiciones en las que se realizó este estudio, la melatonina adicionada al medio de MIV no demostró tener efectos significativos en la tasa de progresión meiótica de los ovocitos bovinos e igualmente en los porcentajes de embriones divididos, se recomienda continuar con la línea de investigación para identificar en qué dosis la MLT actúa en los COC's, de manera que se pueda aprovechar su versatilidad para mejorar los sistemas PIVE.

REFERENCIAS

- El-Raey, M., Geshi, M., Somfai, T., Kaneda, M., Hirako, M., Abdel-Ghaffar, A., Sosa, G., Mahmoud, E., El-roos, A., Nagai, T., 2011. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation in vitro in cattle. *Molecular Reproduction and Development*, 78, 250-262.
- He, C., Wang, J., Zhang, Z., Yang, M., Li, Y., Tian, X., Ma, T., Tao, J., Zhu, K., Song, Y., Ji, P., Liu, G. (2016). Mitochondria synthesize melatonin to ameliorate its function and improve mice oocyte's quality under in vitro conditions. *International Journal of Molecular Science*, 17(6), 939.
- Otoi, A. T., Do, L., Shibata, Y., Taniguchi, M., Nii, N., Nguyen, T., Tanihara, F., Takagi, N. (2014). Melatonin supplementation during in vitro maturation and development supports the development of porcine embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(6), 1054-1058.
- Papis, K., Poleszczuk, O., Wenta-Muchalska, E., Modlinski, J. A. (2007). Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration. *Journal of Pineal Research*, 43(4), 321-326.
- Rodrigues-Cunha, M. C., Mesquita, L. G., Bressan, F., Collado, M. D., Balieiro, J. C., Schwarz, K. R., de Castro, F. C., Watanabe, O. Y., Watanabe, Y. F., de Alencar Coelho, L., Leal, C. L. (2016). Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development. *Theriogenology*, 86(7), 1685-1694.
- Tian, X., Wang, F., Zhang, L., He, C., Ji, P., Wang, J., Zhang, Z., Lv, D., Abulizi, W., Wang, X., Lian, Z., Liu, G. (2017). Beneficial effects of melatonin on the in vitro maturation of sheep oocytes and its relation to melatonin. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 834