EFECTO DE LA MELATONINA EN LOS PROCESOS DE IVM E IVF EN LA ESPECIE OVINA

Casao, A.[a,b], Yáñiz, J.[a], Forcada, F.[a], Abecia, J.A.[a], Cebrián-Pérez, J.A.[b], Muiño-Blanco, T.[b]

[a] Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, F. de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. adriana@unizar.es
[b] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, F. de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

Apenas hay estudios, en ovino u otras especies, sobre la utilización de melatonina en la producción in vitro de embriones. En un reciente estudio de nuestro grupo demostramos que un implante de melatonina mejora la viabilidad de los embriones obtenidos in vivo en ovejas de edad avanzada (Forcada *et al.*, 2006), por lo que el objetivo de este experimento es determinar el efecto de esta hormona sobre la viabilidad embrionaria en un proceso de FIV.

MATERIAL Y METODOS

Los ovarios se recogieron del matadero de ovejas adultas en estación de anoestro, y se transportaron al laboratorio en PBS con 100 UI/ml penicilina G y 100 µg/ml de estreptomicina, a una temperatura entre 30 y 35ºC. Ya en el laboratorio, los ovarios se limpiaron de tejidos y vasos sanguíneos y se lavaron 3 veces con PBS a 35ºC.

Los ovocitos se liberaron mediante una combinación de los métodos de punción y slicing en una placa Petri cubiertos parcialmente con medio de manejo (Hepes-TCM199, 0,1% PVA, 0,04% $NaHCO_3$, 25 UI/ml de heparina, 100 UI/ml penicilina G y 100 µg/ml de estreptomicina).

Se seleccionaron para madurar los ovocitos con citoplasma homogéneo y varias capas de células de la granulosa, y se lavaron dos veces más en medio de manejo y otra última vez en medio de maduración (TCM-199, 10% (vol/vol) de suero de oveja en celo, 0,1 UI/ml de FSH y LH (HMG-Lepori, Angelini Farma-Lepori, Barcelona), cisteamina 100 µM, piruvato sódico 0,3 mM, 100 UI/ml de penicilina G y 100 µg/ml de estreptomicina).

Tras el último lavado los ovocitos se dividieron en dos grupos, de forma que los ovocitos del primer grupo maduraron con melatonina (10^{-5} M), y el segundo actuó de grupo control. Los ovocitos de cada grupo se transfirieron a un pocillo de una placa 4-well (20 – 40 ovocitos por pocillo) con 500 µl de medio de maduración. Los pocillos se cubrieron con aceite mineral y se incubaron durante 24 horas a 39ºC, con una atmósfera humidificada con el 5% de CO_2.

La melatonina se utilizó a una concentración de 10^{-5} M, que es una dosis intermedia entre las dosis que han producido resultados en otras especies (Ishizuka *et al.,* 2000; Dimitriadis *et al.,* 2005; Parka *et al.*, 2006), diluida en DMSO (0,1% v/v) y PBS.

A las 22 – 24 horas del inicio de la maduración, los ovocitos se denudaron pipeteándolos varias veces suavemente y se lavaron dos veces en medio de fecundación (SOF (Tervit y Whittingham, 1972) sin glucosa, al que se le añade un 2% (vol/vol) de suero de oveja en celo, 10 µg/ml de heparina y 1 µg/ml de hipotaurina), y se colocaron en un pocillo con 350 µl de dicho medio. Al igual que en la fase de maduración, se mantuvo el grupo de melatonina con una concentración de 10^{-5} M, y un grupo control sin melatonina.

Por otro lado, el mismo día de la fecundación se extrajo semen fresco de moruecos de raza Rasa Aragonesa. En el momento de la fecundación, el semen se sometió a un procedimiento de swim-up durante 15 minutos a 39ºC y 5% de CO_2 y se añadió al pocillo con los ovocitos, a una concentración final aproximada de 10^6 espermatozoides/ml. Los pocillos se cubrieron con aceite mineral y los gametos se incubaron durante 24 horas a 39ºC y 5% de CO_2.

El cultivo de los embriones se realizó en un cocultivo con células de la granulosa. Las placas de cocultivo se prepararon el día de la fecundación de los ovocitos, sembrando las células de la granulosa que quedaron en el medio tras denudar los ovocitos, en pocillos de

placas 4-well que contienen 500 µl de TCM-199 con un 10% suero fetal bovino, y se mantuvieron 24 horas en la incubadora a 39ºC y 5% de CO_2.

A las 24 horas los pocillos del cocultivo se lavaron tres veces con SOF de cultivo (SOF, de nuevo sin glucosa, al que se le añadió BME aminoácidos esenciales, MEM aminoácidos no esenciales, 10% (vol/vol) de suero fetal bovino para sustentar el cocultivo, L-glutamina 1 mM y 100 UI/ml penicilina G y 100 µg/ml de estreptomicina).

A las 24 y 36 horas tras la fertilización, los embriones divididos se extrajeron de los pocillos, se pipetearon suavemente para eliminar restos de espermatozoides y células, se lavaron dos veces en SOF de cultivo, y se transfirieron a las placas con el cocultivo. Los pocillos se cubrieron con aceite mineral y se mantuvieron en la incubadora a 39ºC y 5% de CO_2 durante 8 días (contando como día 0 el momento de la fertilización in vitro). El medio de cultivo se cambió cada 2 – 3 días para aportar nuevos nutrientes y eliminar desechos.

Los embriones, que habían madurado en dos medios diferentes, melatonina y control, se dividieron a su vez en dos grupos, de manera que al final se establecen cuatro grupos para su cultivo: MM (ovocitos madurados con melatonina y embriones cultivados con melatonina; n=88), MC (ovocitos madurados con melatonina y embriones cultivados sin melatonina; n=79), CM (ovocitos madurados sin melatonina y embriones cultivados con melatonina; n= 89) y CC (ovocitos madurados sin melatonina y embriones cultivados sin melatonina; n=90).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del cultivo de embriones se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Resultados del cultivo de embriones a día 8.

	Degenerados	< 16 células	Mórulas	Blastocistos
MM	5,68 %	23,86 %	55,68 % [a]	14,77 % [a]
MC	7,59 %	29,11 %	46,84 % [a,b]	16,46 % [a,b]
CM	4,49 %	28,09 %	42,70 % [b]	24,72 % [b]
CC	8,89 %	26,67 %	37,78 % [b]	26,67 % [b]

Superíndices distintos en la misma columna indican diferencias significativas.

En la tabla 1 se puede apreciar claramente que los embriones que proceden de ovocitos madurados sin melatonina alcanzan una fase más avanzada (blastocisto) que los que proceden de ovocitos madurados con ella, en los que predominan las mórulas. Al realizar un análisis estadístico por chi cuadrado, se obtienen diferencias muy significativas ($p<0,01$) si comparamos MM con CC y diferencias significativas ($p<0,05$) si comparamos MM frente a CM y CC. No hay diferencias significativas si lo comparamos con MC.

Una de las razones que puede explicar los resultados de este experimento sería que en otras especies el efecto de la melatonina parece ser dosis-dependiente (Adriaens *et al.,* 2006), con variaciones en función de la especie, de manera que no hay estudios que nos indiquen la dosis óptima para la especie ovina. Tampoco hay estudios sobre la presencia de melatonina en el líquido folicular ovino ni su concentración, que nos podrían haber orientado en la dosis a utilizar, ni sobre la presencia de melatonina en el fluido oviductal en ninguna especie.

Estudios en nuestro grupo con embriones ovinos han utilizado una concentración de 1µg/ml (0,43 x 10^{-5}M), pero se trataba de blastocistos obtenidos in vivo, congelados, descongelados y cultivados durante 24 – 48 horas (Abecia *et al.,* 2002). En este caso, la concentración utilizada claramente favorecía el desarrollo de los embriones hasta la fase eclosión parcial o total, contrastando con los resultados del presente ensayo.

No hay ninguna referencia en la literatura que indique que la presencia de melatonina sea perjudicial para el desarrollo embrionario. Algunos autores indican que la presencia de melatonina en el medio de cultivo no afecta, ni positiva ni negativamente al embrión (Chan y Ng, 1994; McElhinny *et al.,* 1996), pero en nuestro caso es su presencia en el medio de maduración o fecundación la que afecta al posterior desarrollo de los embriones.

En otros estudios se ha demostrado que la concentración de melatonina afecta a la maduración del ovocito, ejerciendo su efecto tanto en el desarrollo del folículo ovulatorio como en la maduración de los ovocitos; sin embargo, una dosis de 10^{-3}M tiene efectos negativos sobre muchos parámetros, y una dosis de 2 x 10^{-3}M es claramente tóxica (Adriaens *et al.,* 2006).

La dosis utilizada en el presente experimento (10^{-5}M) es considerada en el experimento anterior como sin efecto sobre los parámetros evaluados. Sin embargo, los ovocitos obtenidos en el citado ensayo de Adriaens *et al.* (2006) no se fecundaron, por lo que no hay ninguna información sobre el desarrollo embrionario posterior. En general, no hay ningún estudio sobre el efecto de la melatonina en todas las fases del proceso de FIV, sino que los estudios se centran, bien en su efecto sobre la maduración (Dimitriadis *et al.,* 2005; Parka *et al*., 2006), o bien su efecto en el cultivo (Chan y Ng, 1994; McElhinny *et al.*, 1996; Ishizuka *et al.*, 2000; Danilova *et al.,* 2004), por lo que el efecto de la maduración del ovocito con melatonina sobre su posterior desarrollo embrionario no se ha estudiado en ninguna especie.

En cuanto al efecto de la melatonina en el cultivo embrionario, del análisis de la literatura se desprende que la concentración de melatonina en el medio parece ser clave, ya que estudios en ratones muestran grandes variaciones en el porcentaje de blastocistos obtenidos utilizando concentraciones que oscilaban entre 10^{-4}M y 10^{-8}M. Los resultados del presente experimento parecen mostrar que la melatonina afecta de forma negativa al cultivo in vitro de embriones ovinos cuando se utiliza durante la maduración del ovocito, por lo que son necesarios estudios que evalúen la dosis óptima de la hormona pineal a utilizar en cada una de las fases del proceso.

Trabajo financiado por los proyectos AGL 2004-00432 (CICYT) y A26 (DGA)

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abecia, J. A., Forcada, F. and Zuñiga, O. (2002). "The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos in vitro." Vet. Res. Commun. **26**: 151 - 158.

Adriaens, I., Jacquet, P., Cortvrindt, R., Janssen, K. and Smitz, J. (2006). "Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis." Toxicology **In press**.

Chan, W. Y. and Ng, T. B. (1994). "Development of pre-implantation mouse embryos under the influence of pineal indoles." J. Neural Transm. Gen. Sect. **96**(1): 19-29.

Danilova, N., Krupnik, V. E., Sugden, D. and Zhdanova, I. V. (2004). "Melatonin stimulates cell proliferation in zebrafish embryo and accelerates its development." FASEB J.: 03-0544fje.

Dimitriadis, I., Papanikolau, T., Vainas, E., Amiridis, G. S., Valasi, I., Samartzi, F. and Rekkas, C. A. (2005). "Effects of melatonin on in vitro maturation of bovine oocytes." Reprod. Domest. Anim. **40**(4).

Forcada, F., Abecia, J. A., Cebrian-Perez, J. A., Muino-Blanco, T., Valares, J. A., Palacin, I. and Casao, A. (2006). "The effect of melatonin implants during the seasonal anestrus on embryo production after superovulation in aged high-prolificacy Rasa Aragonesa ewes." Theriogenology **65**(2): 356-365.

Ishizuka, B., Kuribayashi, Y., Murai, K., Amemiya, A. and Itoh, M. T. (2000). "The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice." J. Pineal Res. **28**: 48–51.

McElhinny, A. S., Davis, F. C. and Warner, C. M. (1996). "The effect of melatonin on cleavage rate of C57BL/6 and CBA/Ca preimplantation embryos cultured in vitro." J. Pineal. Res. **21**(1): 44-8.

Parka, E., Leea, D., Choa, J., Hana, J., Chaa, K. and Yoona, T. (2006). "Addition of melatonin in in vitro maturation (IVM) medium increases maturation and fertilization of immature human oocytes." Fertility and Sterility **86**(3, Supplement 1): S168.

Tervit, H. R. and Whittingham, D. G. (1972). "Succesful culture in vitro of sheep and cattle ova." J. Reprod. Fert. **30**: 493 - 497.