EFECTO DE DOSIS REDUCIDAS DE MELATONINA SOBRE LAS TASAS DE MADURACIÓN Y FECUNDACIÓN IN VITRO DE OOCITOS Y SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO EN GANADO OVINO

Casao, A.[1], Ait Amer Meziane, M.[2] Cebrián-Pérez, J.A.[1], Muiño-Blanco T.[1], Abecia, J.A.[2] y Forcada, F.[2]

[1] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. adriana@unizar.es

[2] Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza

INTRODUCCIÓN

La melatonina es una hormona ampliamente utilizada en la reproducción ovina, debido a su capacidad de revertir los efectos del anoestro estacionario aumentando la tasa de ovulación, la función luteal y la viabilidad embrionaria (Abecia et al. 2008). La presencia de melatonina en el fluido folicular ovárico humano (Brzezinski et al. 1987) y de receptores de la misma en las células de la granulosa en diversas especies (Na et al. 2005; Kang et al. 2008) sugieren un efecto directo de esta hormona sobre la competencia del ovocito. Un estudio previo de nuestro grupo demostró que la presencia una dosis alta de melatonina (10^{-5}M) en el medio de maduración disminuye la producción de blastocistos al final del cultivo embrionario en procesos de fecundación in vitro (Casao et al. 2007), por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de varias dosis inferiores de melatonina durante la maduración in vitro de los ovocitos, la fecundación in vitro y el posterior desarrollo de los embriones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovarios se recogieron del matadero de ovejas adultas entre el 27 de agosto y el 3 de diciembre de 2008, 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 lavaron 3 veces con PBS a 35ºC.

Los ovocitos se liberaron mediante una combinación de los métodos de punción y slicing (Wani et al. 2000) 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, 1 µg/ml de FSH y LH, 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 cuatro grupos, y 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, al que se le añade melatonina a tres concentraciones distintas (10^{-6}M, 10^{-8}M, 10^{-10}M), mientras el cuarto grupo permanece como grupo control. 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.

Las dosis de melatonina se prepararon diluyéndola en DMSO y PBS, de forma que la concentración final de DMSO en el medio de cultivo es de 1‰ (Ishizuka et al. 2000).

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 and 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 maduración, se mantuvieron los grupos tratados con melatonina a las mismas concentraciones, 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; tras su recogida el semen se diluyó 1/10 en medio bifase (0,25 mol/l sacarosa, 10 mmol/l Hepes, 2 mmol/l KOH, 5 mmol/l glucosa, 0,5 mol/l sodio fosfato monobásico y 100 mmol/l de ácido tetraacético de etilénglicol EGTA), y se mantuvo a 15ºC hasta su uso. 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.

A las 24 y 36 horas tras la fecundación, 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 (SOF, de nuevo sin glucosa, al que se le añadió 0,4% de BSA, BME aminoácidos esenciales, MEM aminoácidos no esenciales, L-glutamina 1 mM, 100 UI/ml penicilina G y 100 µg/ml de estreptomicina) y se transfirieron a un pocillo de una placa con 500 µl de medio de cultivo manteniendo las concentraciones de melatonina de cada grupo. Los pocillos se cubrieron con aceite mineral y se cultivaron a 39ºC, 5% de CO_2 y 5% de O_2 durante 8 días (contando como día 0 el momento de la fecundación in vitro). Los embriones se evalúan a los días 6, 7 y 8 tras la fecundación, y todos los blastocistos expandidos se vitrifican para su posterior análisis.
El análisis estadístico de las diferencias entre grupos de tratamiento se realizó mediante la prueba de Chi-cuadrado (SPSS, versión 14.0)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de melatonina en los medios de maduración y fecundación durante la estación reproductiva no parece tener ningún efecto significativo sobre el porcentaje de maduración o división embrionaria a las 36 horas, a diferencia de los hallazgos de otros autores (Valasi et al. 2006) y nuestros propios trabajos, en los que el uso de melatonina en el medio de maduración a una concentración de 10^{-6} M aumenta la competencia de los ovocitos y el porcentaje de embriones divididos. En este estudio, el porcentaje de embriones obtenidos 36 horas tras la fecundación del grupo tratado con melatonina a 10^{-6} M es superior a los otros grupos, aunque sin llegar a ser significativo (Tabla 1). Estudios en la especie humana han mostrado altos niveles de melatonina en el fluido folicular preovulatorio (Brzezinski et al. 1987), superiores a los niveles plasmáticos, que además muestran variaciones estacionales (Ronnberg et al. 1990); por tanto, es posible que en la especie ovina se produzca una situación parecida, y los ovocitos obtenidos en estación reproductiva, tal es el caso del presente estudio, estén sometidos a altas concentraciones de melatonina intrafoliculares que disminuyan el efecto de un posterior tratamiento con esta hormona in vitro.
Por otro lado, el tratamiento con melatonina mejoró el porcentaje de blastocistos obtenidos al finalizar el cultivo, aunque el análisis estadístico sólo mostró diferencias significativas ($P<0,05$) utilizando una concentración de melatonina de 10^{-8} M (Tabla 1). Al consultar la literatura, los resultados obtenidos en el cultivo de embriones de diversas especies con melatonina son variables, ya que mientras algunos autores afirman que la adición de melatonina a los medios de cultivo mejora el desarrollo embrionario (Tsantarliotou et al. 2007; Choi et al. 2008; Kang et al. 2008), otros estudios no muestran ningún efecto significativo (McElhinny et al. 1996). En general, los resultados varían mucho dependiendo de la especie y la concentración de melatonina utilizadas, y es posible que sus efectos beneficiosos sobre el desarrollo embrionario sean debidos a su acción antioxidante (Reiter et al. 2000), que protegería a los embriones de los radicales presentes en el tracto reproductor antes de su implantación (Agarwal et al. 2003).
En conclusión, la presencia de melatonina en los medios de cultivo embrionarios in vitro mejora el porcentaje de blastocistos obtenidos, aunque son necesarios más estudios para determinar su mecanismo de acción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abecia, J. A., Forcada, F., Casao, A. & Palacin, I. (2008). *Animal* 2: 399-404.
Agarwal, A., Saleh, R. A. & Bedaiwy, M. A. (2003). *Fertility and Sterility* 79: 829-843.
Brzezinski, A., Seibel, M. M., Lynch, H. J., Deng, M. H. & Wurtman, R. J. (1987). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 64: 865-7.
Casao, A., Yaniz, J., Forcada, F., Abecia, J. A., Cebrian-Perez, J. A. & Muino-Blanco, T. (2007). *Itea-Informacion Tecnica Economica Agraria* 28: 36-38.
Choi, J., Park, S. M., Lee, E., Kim, J. H., Jeong, Y. I., Lee, J. Y., Park, S. W., Kim, H. S., Hossein, M. S., Jeong, Y. W., Kim, S., Hyun, S. H. & Hwang, W. S. (2008). *Molecular Reproduction and Development* 75: 1127-1135.
Ishizuka, B., Kuribayashi, Y., Murai, K., Amemiya, A. & Itoh, M. T. (2000). *Journal of Pineal Research* 28: 48–51.

Kang, J. T., Koo, O. J., Kwon, D. K., Park, H. J., Jang, G., Kang, S. K. & Lee, B. C. (2008). *Journal of Pineal Research* 46: 22-28.
McElhinny, A. S., Davis, F. C. & Warner, C. M. (1996). *Journal of Pineal Research* 21: 44-8.
Na, K., Kim, J., Lee, J., Yoon, T., Cha, K. & Lee, D. (2005). *Fertility and Sterility* 84: S103-S103.
Reiter, R. J., Tan, D. X., Osuna, C. & Gitto, E. (2000). *J. Biomed. Sci.* 7: 444-458.
Ronnberg, L., Kauppila, A., Leppaluoto, J., Martikainen, H. & Vakkuri, O. (1990). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 71: 492-6.
Tervit, H. R. & Whittingham, D. G. (1972). *J. Reprod. Fert.* 30: 493 - 497.
Tsantarliotou, M. P., Attanasio, L., De Rosa, A., Boccia, L., Pellerano, G. & Gasparrini, B. (2007). *Italian Journal of Animal Science* 6: 488-489.
Valasi, F., Tsiligianni, T., Papanikolaou, T., Dimitriadis, I., Vainas, E., Samartzi, F. & Amiridis, G. S. (2006). *Reproduction in Domestic Animals* 41: 341-341.
Wani, N. A., Wani, G. M., Khan, M. Z. & Salahudin, S. (2000). *Small Ruminant Research* 36: 63 - 67.

Tabla 1. *Maduración, división embrionaria a las 36 horas de la fecundación, y porcentaje de blastocitos obtenidos tras 8 días de cultivo de ovocitos obtenidos de ovejas Rasa Aragonesa, madurados y cultivados con distintas dosis de melatonina. Diferentes letras (a, b) en columnas indican diferencias significativas (P<0,05).*

Grupo	Maduración	División 36 horas	Blastocitos totales
10^{-6}M	183/243 (75,3%)	177/243 (72,8%)	91/177 (51,4%)
10^{-8}M	184/247 (74,5%)	172/247 (69,6%)	93/172 (54,1%)[a]
10^{-10}M	182/252 (72,2%)	173/252 (68,7%)	90/173 (52,0%)
Control	193/264 (73,1%)	184/264 (69,7%)	82/184 (44,6%)[b]

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2007-63822 y A26.

THE EFFECTS OF LOW CONCENTRATIONS OF MELATONIN ON IN VITRO MADURATION AND FERTILIZATION OF OOCYTES AND ON EARLY EMBRYO DEVELOPMENT IN SHEEP

ABSTRACT: The aim of this study was to assess the effects of different doses of melatonin on in vitro maturation and fertilization of sheep oocytes, and on in vitro culture of embryos during breeding season. Oocytes from sheep ovaries collected at the slaughterhouse were divided into four groups, three of which were matured with either 10^{-6}, 10^{-8} or 10^{-10}M melatonin, while the other group served as control group. Matured oocytes were fertilized with fresh ram semen, and embryos obtained were cultured for eight days; melatonin doses were maintained during all IVF process. Melatonin treatment during in vitro maturation and fertilization have no significant effects on maturation (75.3%, 74.5%, 72.2% and 73.1% for 10^{-6}, 10^{-8}, 10^{-10}M melatonin and control groups, respectively) or cleavage rate (72.8%, 69.6%, 68.7% and 69.7% for 10^{-6}, 10^{-8}, 10^{-10}M melatonin and control groups, respectively). However, a melatonin concentration of 10^{-8} M increased significantly blastocyst rate when compared with control group (54.1% vs. 44.6%, $P<0.05$), but not when compared with 10^{-6} (51.4%) or 10^{-10} M melatonin (52.0%). In conclusion, low concentrations of melatonin to in vitro embryo production media had no effect on maturation and early embryo development after in vitro fertilization, although 10^{-8}M melatonin increased blastocyst rate after 8 days of embryo culture.

Keywords: melatonin, sheep, IVF, embryo.