SECRECIÓN DE MELATONINA POR LAS CÉLULAS DEL CÚMULUS OVINAS Y POSIBLE ACCIÓN DE ESTA HORMONA SOBRE LOS DAÑOS EN EL DNA DURANTE LA MADURACIÓN *IN VITRO*

Casao, A., Pérez-Pe, R., Forcada, F., Abecia, J.A., Cebrian-Perez, J.A. y Muiño-Blanco, T.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. España. adriana@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La especie ovina posee una reproducción estacional, regulada por la secreción de melatonina nocturna por la glándula pineal. Esta hormona no solo regula el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, sino que trabajos recientes están demostrando que también tiene efectos directos en el ovario y la calidad ovocitaria (Abecia et al., 2008). La melatonina se sintetiza a partir de la serotonina, siendo las enzimas limitantes del proceso serotonin N-acetiltransferasa (AANAT) e hidroxiindol-O-metiltransferasa (HIOMT o ASTM). Recientes trabajos han demostrado la expresión génica de estas enzimas en células del cúmulus de vacuno y rata (El-Raey et al., 2011; Coelho et al., 2013), lo que sugiere la capacidad de estas células para sintetizar melatonina extrapineal. Estos resultados explicarían los datos poco concluyentes obtenidos al añadir esta hormona a los medios de maduración ovocitaria durante los procesos de maduración *in vitro* (Casao et al., 2010). Una de las principales funciones la melatonina durante la maduración del ovocito podría ser actuar como antiapoptótica, protegiendo frente a daños en el DNA tanto al ovocito como a las células del cúmulus que la rodean (Takada et al., 2012). Además, las células del cúmulus, tanto ovinas (Casao et al., 2011) como de otras especies (Kang et al., 2008), también poseen receptores de membrana para esta hormona, en concreto el receptor MT_1. Por tanto, se puede hipotetizar que parte de las acciones antiapoptóticas de la melatonina podrían estar mediadas por la unión a receptores específicos.

Para comprobar esta hipótesis, este trabajo tiene un doble objetivo: en primer lugar, investigar la presencia de las enzimas implicadas en la síntesis de melatonina en las células del cúmulus ovinas, y en segundo lugar, determinar si la acción inhibidora de los daños en el DNA de la melatonina sintetizada por las células del cúmulus durante la maduración del ovocito se realiza a través de receptores de membrana.

MATERIAL Y METODOS

Para la obtención de células del cúmulus y la determinación de las enzimas implicadas en la síntesis de melatonina (experimento 1), se recogieron ovarios de ovejas adultas del matadero de Mercazaragoza, y los ovocitos se extrajeron y maduraron siguiendo el protocolo habitual de nuestro laboratorio (Forcada et al., 2011). Una vez los ovocitos maduraron, las células de la granulosa se separaron mediante un suave pipeteado y sus proteínas se extrajeron mediante un buffer de extracción compuesto por 125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 10% ß-mercaptoetanol, 20% glicerol, y 0.02% azul de bromofenol, tras una incubación en un baño de arena a 95ºC durante 4 minutos, y una centrifugación de 7500xg durante 5 min. a 4ºC. Posteriormente se recogió el sobrenadante, se le añadió un coctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) y se congeló a -20ºC hasta su uso.

Para la detección de las enzimas por *western blotting*, se realizó una electroforesis SDS-PAGE de las proteínas extraídas en geles del 12% de acrilamida, y posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF utilizando el sistema de transferencia *TransBlot Turbo* (Biorad, 2,5 A, 25 V, 10 min). Tras el bloqueo de los sitios de unión inespecíficos, la inmunodetección de las enzimas se llevó a cabo incubando las membranas con anticuerpos primarios frente a AANAT (Anti-Serotonin N-acetyltransferase antibody, Abcam, Cambridge, Reino Unido) e HIOMT (ASTM antibody, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, EE.UU.) durante toda la noche a 4ºC, dilución 1/1000, seguido de 1 h de incubación con un anticuerpo secundario anti-conejo sintetizado en burro, conjugado con el fluorocromo IRDye® 800-CW (Li-Cor Biosciences, Lincoln, EE.UU.). Finalmente, las membranas se revelaron con el sistema de detección de fluorescencia Odyssey® (Li-Cor Biosciences). Extractos de glándula pineal ovina se utilizaron como control positivo.

En la segunda parte de este trabajo (experimento 2), para determinar si la melatonina actúa

a través de receptores de membrana, los ovocitos se obtuvieron y maduraron de la forma descrita anteriormente, pero se dividieron en varios grupos experimentales a los que se les añadió los siguientes compuestos: melatonina 1 µM (grupo M), luzindole 1 µM (antagonista de receptores MT_1 y MT_2, grupo L), 4-P-PDOT 10 nM (antagonista de receptores MT_2 a dosis bajas, grupo P) y DMSO 1/1000 (diluyente de los compuestos anteriores, grupo C). Tras la maduración, se recogieron las células del cúmulus de los ovocitos de los distintos grupos experimentales y el daño en el ADN se estudió mediante la técnica de "TUNEL" (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase mediated-dUTP Nick End Labelling*) usando el kit "*In situ cell death detection kit, fluorescein*", (Roche, Basel, Suiza) y siguiendo las especificaciones del fabricante. Los resultados se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400), y se evaluaron 500 células de cada grupo. Los resultados se analizaron mediante es test de chi-cuadrado, con el paquete estadístico SPSS (SPSS *software*, versión 15.0).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el experimento 1, el *western blot* mostró una banda de 23 kDa, compatible con la presencia de AANAT (Figura 1A), y otra de 68 kDa, en este caso compatible con HIOMT (Figura 1B); además, estas bandas se encuentran en la misma posición que el control positivo (glándula pineal), lo que demuestra que las células de cúmulus ovinas tienen la maquinaria bioquímica necesaria para la síntesis de melatonina. En los últimos años se han ido acumulando evidencias de la síntesis en múltiples órganos de melatonina extrapineal, no sometida a ritmos circadianos, y cuya función parece ser principalmente antioxidante y antiapoptótica (Bubenik, 2002; Shimozuma et al., 2011). La expresión génica de enzimas implicadas en la síntesis de melatonina ya había sido probada en las células del cúmulus de otras especies (El-Raey et al., 2011; Coelho et al., 2013), de forma que esta melatonina se acumularía en el folículo preovulatorio, donde su acción sería disminuir el daño oxidativo de los complejos cúmulus-ovocito (Tamura et al., 2013).

Los resultados del experimento 2 no mostraron diferencias significativas en los niveles de daño en el DNA entre el grupo control (C) y el grupo al que se le añadió melatonina exógena (grupo M), lo que sugeriría que las células del cúmulus ovinas secretan melatonina endógena durante la maduración *in vitro*. Además, la maduración in vitro con un antagonista de los receptores MT_1 y MT_2 (grupo L) aumentó significativamente el porcentaje de células del cúmulus que presentaron daños en el DNA (Figura 2), pero se mantuvo sin diferencias con el control si se maduraron con un antagonista de los receptores MT_2 (grupo P), lo que sugiere que la acción protectora de la melatonina frente al daño en el DNA durante la maduración *in vitro* está mediada por receptores MT_1. De hecho, hay trabajos que indican que el efecto protector de la melatonina frente al daño del DNA de otros tipos celulares está mediado por estos receptores de membrana (Espino et al., 2011; Santoro et al., 2013).

En conclusión, este trabajo demuestra que las células del cúmulus ovinas tienen la capacidad de sintetizar melatonina, y que su capacidad para proteger a estas células de daños en el DNA durante la maduración *in vitro* sería a través de receptores MT_1.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

• Abecia, J. A., Forcada, F., Casao, A. Palacin, I. 2008. *Animal* 2: 399-404. • Bubenik, G. 2002. *Dig. Dis. Sci.* 47: 2336-2348. • Casao, A., Abecia, J. A., Cebrian-Perez, J. A., Muino-Blanco, T., Vazquez, M. I. Forcada, F. 2010. *Span. J. Agric. Res.* 8: 35-41. • Casao, A., Pérez-Pé, R., Forcada, F., Abecia, A., Muiño-Blanco, T. Cebrián-Pérez, J. A. 2011. *ITEA* I: 359-361. • Coelho, L. A., Peres, R., Amaral, F. G. Cipolla-Neto, J. 2013. *Reprod. Fertil. Dev.* 25: 247-247. El-Raey, M., Geshi, M., Somfai, T., Kaneda, M., Hirako, M., Abdel-Ghaffar, A. E., Sosa, G. A., El-Roos, M. E. A. A. Nagai, T. 2011b. *Mol. Reprod. Dev.* 78: 250-262. • Espino, J., Ortiz, Á., Bejarano, I., Lozano, G. M., Monllor, F., García, J. F., Rodríguez, A. B. Pariente, J. A. 2011. *Fertil. Steril.* 95: 2290-2296. • Forcada, F., Buffoni, A., Abecia, J. A., Asenjo, B., Palacin, I., Vazquez, M. I., Rodriguez-Castillo, J. C., Sanchez-Prieto, L. Casao, A. 2011. *J. Appl. Anim. Res.* 39: 412-417. • Kang, J. T., Koo, O. J., Kwon, D. K., Park, H. J., Jang, G., Kang, S. K. Lee, B. C. 2008. *J. Pineal Res.* 46: 22-28. • Santoro, R., Mori, F., Marani, M., Grasso, G., Cambria, A., Blandino, G., Muti, P. Strano, S. 2013. *Carcinogenesis*. • Shimozuma, M., Tokuyama, R., Tatehara, S., Umeki, H., Ide, S., Mishima, K., Saito, I. Satomura, K. 2011. *Histochem. Cell. Biol.* 135: 389-396. • Takada, L., Martins, A., Mingoti, G.

Z., Balieiro, J. C. C., Cipolla-Neto, J. Coelho, L. A. 2012. *Res. Vet. Sci.* 92: 124-127. • Tamura, H., Takasaki, A., Taketani, T., Tanabe, M., Kizuka, F., Lee, L., Tamura, I., Maekawa, R., Asada, H., Yamagata, Y. Sugino, N. 2013. *Endocr. J.* 60: 1-13.

Agradecimientos: Este proyecto está financiado con las ayudas DGA A-26-FSE y CICYT-FEDER AGL2010-18975.

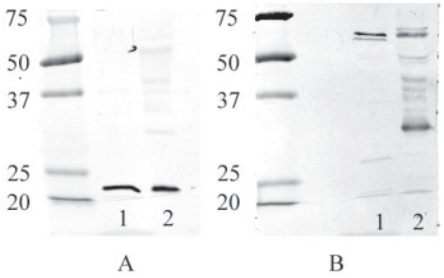


Figura 1. *Determinación de la presencia de las enzimas AANAT (A) e HIOMT (B) en extractos proteicos de células del cúmulus ovinas (1) obtenidas tras la maduración in vitro mediante western-blot con anticuerpos específicos. Extractos de glándula pineal ovina (2) actúan como control positivo.*

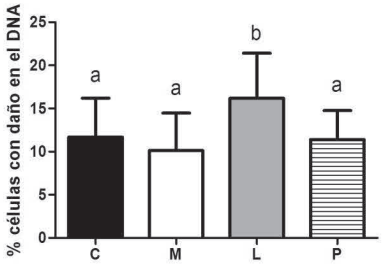


Figura 2. *Porcentaje de células del cúmulus ovinas que presentan daño en el DNA, evaluadas por la técnica TUNEL, tras la maduración in vitro con DMSO 1/1000 (grupo C), melatonina 1 µM (grupo M), luzindole 1 µM (grupo L) o 4-P-PDOT 10 nM (grupo P). Los resultados se expresan como media ± SEM de n=4. Letras diferentes (a, b) indican diferencias de P <0,05.*

MELATONIN SECRETION IN SHEEP CUMULUS CELLS AND ITS POSSIBLE EFFECT ON DNA DAMAGE DURING *IN VITRO* MATURATION

ABSTRACT: Melatonin is secreted by the pineal gland from serotonin, although recent works suggest that other tissues, including ovarian cumulus cells, can also secret this hormone. In order to determine whether sheep cumulus cells can synthetize melatonin, we assessed the presence of serotonin N-acetyltransferase (AANAT) and hydroxyindol-O-methyltransferase (HIOMT) in protein extracts from ovine cumulus cells after *in vitro* maturation (IVM). Western blotting showed a 23 kDa band, compatible with AANAT and a 68 kDa, compatible with HIOMT. We also determined if the melatonin effect on inhibition of DNA damage of cumulus cells during IVM is mediated by the binding to its receptors. We used melatonin receptor antagonists (4P-PDOP and luzindole) and melatonin during IVM. DNA damage was assessed by the TUNEL technique. DNA damage of luzindole-mature cells was significantly higher when compared with the other groups ($P<0.05$), but there were no significant differences between melatonin or 4P-PDOP and control groups. In conclusion, this study shows that sheep cumulus cells have the ability to synthesize melatonin, and that the DNA damage protective effect during IVM might be exerted by binding to MT_1 receptors.

Keywords: AANAT, HIOMT, TUNEL, apoptosis, melatonin