

DETECCIÓN DEL RECEPTOR DE LEPTINA EN EL OVARIO DE CONEJA E INFLUENCIA DE LA LEPTINA SOBRE LA MADURACIÓN DE LOS OOCITOS *IN VITRO*

Arias-Álvarez M.¹, García-García R.M.¹, Rebollar P.G.², Revuelta L.¹, Lorenzo P.L.¹

¹ Dpto. Fisiología (Fisiología Animal). Facultad de Veterinaria. UCM.

² Dpto. Producción animal. E.T.S.I. Agrónomos. UPM.

INTRODUCCIÓN

La leptina es una hormona de 16 KDal producida por el gen de la obesidad (*ob* gen) que se sintetiza principalmente en los adipocitos (Zhang et al., 1994); refleja la cantidad de grasa de un animal y la condición corporal (Fortun-Lamothe, 2006), estando implicada en la regulación del peso corporal (Coleman et al., 1978) y en el éxito reproductivo (Chehab et al., 1996). En este sentido, se ha sugerido que la influencia de la leptina sobre la reproducción se ejercería sobre el eje hipotálamo- hipófisis (Brechia et al. 2006) y sobre algunos aspectos de la función ovárica, como el desarrollo folicular (Brannian et al., 2002) y la maduración de los oocitos (Ryan et al., 2002) a través de su unión con receptores específicos de membrana (Ob-R) (Tartaglia et al., 1995). El Ob-R es miembro de la clase I de la superfamilia de los receptores de citoquinas, y tiene 6 isoformas (Tartaglia et al., 1995). Tanto la forma larga como las cortas poseen el mismo dominio extracelular, por lo que se diferencian entre sí por el dominio intracitoplasmático (Fruhbeck, 2006).

La detección del Ob-R en las células de la granulosa del ovario y en el oocito de diferentes especies sugiere que el oocito puede responder a la leptina a través de su receptor (Matsuoka et al., 1999; Craig et al., 2004) en particular, durante la maduración del mismo. Este proceso, a su vez, representa dos sucesos biológicos diferenciados: a) maduración nuclear (de vesícula germinal a metafase II); b) maduración citoplásmica (migración de los gránulos corticales (GC)). Este estudio, pretende, por un lado, determinar la inmunolocalización del Ob-R en el ovario de la coneja y por otro dilucidar el efecto de la leptina sobre la maduración de los oocitos de coneja *in vitro* tanto nuclear como citoplásmica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovarios proceden de conejas adultas sacrificadas en el matadero (Jumogar S.L.).

Immunodetección del receptor de la leptina. Los ovarios fueron fijados en paraformaldehído 4%, y se prepararon para histología según protocolos estándar. Tras el desparafinado y rehidratación, se realizó un tratamiento de calor con olla en buffer citrato 10mM (pH 6). Posteriormente, se suprimió la actividad de la peroxidasa con 0,3% de peróxido de hidrógeno, las secciones se incubaron con suero de bloqueo durante 30 min (1:10, Vector lab.) y a continuación con el anticuerpo primario (1:50, Vector lab.) durante toda la noche a temperatura ambiente. Después, se añadió el anticuerpo secundario (1:200, Vector), el conjugado ABC (Avidin biotin complex, ABC Vector Elite kit, Vector lab.) y, por último, el cromógeno (Vector Nova RED substrate Kit for Peroxidase, Vector lab.). Finalmente, se realizó una tinción de contraste con hematoxilina y se examinó al microscopio óptico.

Maduración *in vitro*. Se aspiró el contenido de los folículos antrales visibles en la superficie del ovario, superiores a 1mm de diámetro (Jelinkova *et al.*, 1994). Los complejos cúmulo oocito (COC) fueron seleccionados para cultivo en base a criterios morfológicos de homogeneidad en el cúmulo y en el citoplasma descritos por Lorenzo *et al.*, (1994). El medio de maduración (MIV) estaba compuesto por TCM-199, piruvato sódico (0,1mg/ml), glutamina (2mM), antibiótico (100UI/ml penicilina-estreptomicina) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) (10ng/ml) suplementado con: 0, 1, 10, 100 ng/ml de leptina o 10% de suero fetal bovino (FCS) (Sigma). El cultivo se realizó 500 µl de medio MIV, a 38° C, 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa, durante 16h.

Confocal. Un total de 715 COC se desnudaron con hialuronidasa (2 mM) y se trataron con pronasa al 0,5% para digerir la zona pelúcida. Posteriormente, se fijaron en paraformaldehído al 4%. A continuación, se lavaron con 0,02% de Tritón X-100 y con PBS con 7,5% de BSA. Seguidamente, se incubaron en una solución de 100 µg/ml de isotiocianato de fluoresceína conjugado con la aglutinina de la *lens culinaris* (FITC-LCA) en PBS para analizar la migración de los GC. A continuación, se incubaron en propidio iodado (PI) para valorar la configuración nuclear de los oocitos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio inmunohistoquímico de los ovarios (Fig. 1) mostró la inmunolocalización del ObR en el citoplasma de las células del estroma y en el cuerpo lúteo. Igualmente, en las células de la granulosa de los folículos primordiales, primarios y secundarios, así como en los oocitos. En las células de la teca interna la detección del Ob-R fue moderada mientras que en la teca externa fue negativa. Estos resultados son acordes a los obtenidos por otros autores en otras especies (Matsuoka et al., 1999; Ryan et al., 2002; Paula-Lopes et al., 2007) en las cuales se ha observado la presencia de ambas formas del Ob-R. Estos hallazgos sugieren que los ovarios, y en particular los oocitos, son capaces de responder a la leptina a través de su receptor.

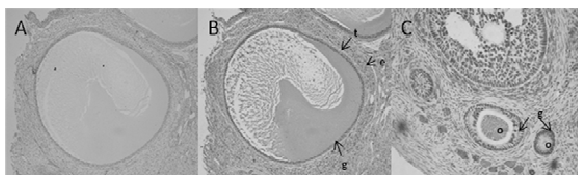


Fig. 1. Inmunolocalización del ObR en el ovario de la coneja. A) control negativo; B) folículo antral: células de la granulosa (g), teca (t), y estroma (e); C) folículos preantrales: células de la granulosa (g), oocitos (o).

El presente trabajo muestra, además, que la leptina influye sobre la maduración *in vitro* de los oocitos de coneja (Tabla 1). En particular, tanto los medios suplementados con FCS como con 10ng/ml leptina ejercen los efectos más beneficiosos a nivel nuclear comparados con 0, 1 y 100ng/ml leptina. Estos datos concuerdan con los resultados de Craig et al. (2004) y Paula-Lopes et al. (2007). Todos los tratamientos que incluyen leptina y FCS mejoran la maduración citoplasmática en cuanto a la migración periférica de los GC se refiere, comparados con el medio sin leptina.

Tabla 1. Maduración *in vitro* de oocitos de coneja con diferentes concentraciones de leptina

	0 ng/ml lep	1 ng/ml lep	10 ng/ml lep	100 ng/ml lep	10% FCS
MII (%)	42,4 ^a	47,9 ^{ab}	57,0 ^b	43,1 ^a	55,7 ^b
Migración de GC (%)	14,8 ^a	26,9 ^b	28,7 ^b	25,3 ^b	24,7 ^b

Los valores con diferentes letras presentan diferencias significativas ($P < 0,05$)

Aunque algunos autores no observan ningún efecto de la leptina sobre la maduración nuclear *in vitro* de los oocitos (Swain et al., 2004), otros estudios realizados en varias especies muestran que la leptina mejora la maduración nuclear y citoplasmática de los oocitos aunque el efecto beneficioso difiere en función de las especies y del medio de cultivo. Así, en ganado porcino (Craig et al., 2004) y en vacuno (Van Tol et al., 2008), concentraciones en torno a 10-100ng/ml y 1000ng/ml de leptina respectivamente, mejoran la maduración de los oocitos *in vitro*. Sin embargo, Boelhaue et al. (2005) y Paula-Lopes et al. (2007) muestran que concentraciones de 1-10ng/ml de leptina mejoran la de los oocitos bovinos, siendo estos niveles los más próximos a los fisiológicos. Los resultados obtenidos tanto en la coneja como en otras especies podrían indicar que, *in vivo*, la leptina ejercería su

efecto sobre los oocitos de forma sinérgica con otros factores autocrinos/paracrinos/endocrinos a concentraciones distintas a las necesarias *in vitro*.

Nuestro estudio indica que el Ob-R se localiza en diferentes compartimentos ováricos y que, además, la leptina influye positivamente tanto en la maduración nuclear como citoplasmática de los complejos cúmulo-oocito de coneja madurados *in vitro*. Serán necesarios más estudios al respecto para entender las interrelaciones metabólicas y hormonales que relacionan la condición corporal de los animales con su éxito reproductivo.

Agradecimientos: Al Dr. Contreras por su inestimable ayuda. A la financiación: MEC AGL07-60168 y grupos de investigación (920249). M. Arias-Álvarez, es PDI en formación de la UCM (financiado por la CAM y el FSE). R.M. García-García, agradece la financiación al MEC mediante el programa Juan de la Cierva.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boelhaue M, Sinowatz F, Wolf E, Paula-Lopes FF.2005. *Biol Reprod.*73:737-44.
- Brannian JD, Hansen KA.2002. *Semin. Reprod. Medicine.*20:103-12.
- Brecchia G, Bonanno A, Galeati G, Federici G, Maranesi M, Gobbetti A, Zerani M, Boiti C.2006. *Domest. Anim. Endocrinol.*31:105-22.
- Chehab FF, Lim ME, Lu R. 1996. *Nat. Genetics.*• Coleman DL.1978. *Diabetologia.*14:141-48.
- Craig J, Zhu H, Dyce PW, Petrik J, Li J.2004. *Endocrinology.*145:5355-63.
- Fortun-Lamothe L.2006. *Anim. Reprod. Sci.*93:1-15.
- Frühbeck G.2006. *Biochem J.*393:7-20.
- Jelinkova L, Kubelka M, Motlik J, Guerrier P.1994. *Mol. Reprod. Dev.*37:210-15.
- Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC, Illera M. 1994. *J. Reprod. Fertil.*101: 697-701.
- Matsuoka T, Tahara M, Yokoi T, Masumoto N, Takeda T, Yamaguchi M, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y.1999. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*256:480-84.
- Paula-Lopes FF, Boelhaue M, Habermann FA, Sinowatz F, Wolf E.2007. *Biol. Reprod.*76:532-41.
- Ryan NK, Woodhouse CM, Van der oek H, Gilchrist RB, Armstrong DT, Norman RJ.2002. *Biol. Reprod.*66:1548-54.
- Swain JE, Dunn RL, McConnell, Gonzalez-Martinez J, Smith GD.2004. *Biol. Reprod.*71:1446-52.
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI.1995. *Cell.*83:1263-71.
- Van Tol HT, van Eerdenburg FJ, Colenbrander B, Roelen BA.2008. *Mol. Reprod. Dev.*2008.75:578-87.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM.1994. *Nature.* 372:425-432.

DETECTION OF LEPTIN RECEPTOR IN RABBIT OVARY AND EFFECT OF LEPTIN ON OOCYTE *IN VITRO* MATURATION

ABSTRACT: The aim of this work was to study the immunolocalization of the leptin receptor (Ob-R), in rabbit's ovaries and the influence of leptin on meiotic (metaphase II rate) and cytoplasmic maturation (cortical granule migration rate (CG)) of rabbit oocytes matured *in vitro* (IVM). Ovaries and cumulus-oocyte complexes (COC) were collected from slaughterhouse animals. Ob-R were found widely localized in the ovary; stromal and granulosa cells shown a positive signalling in cytoplasm. Oocytes and corpora lutea (CL) exhibited immunoreactivity for Ob-R as well. Addition of 10 ng/ml leptin and 10% FCS to IVM medium significantly increased the rate of oocytes reaching MII ($P<0.05$). In addition, percentage of oocytes showed CG migration to the cortex was significantly reduced without leptin treatment or FCS ($P<0.05$) In conclusion, leptin receptor is localized in several ovarian compartments in the rabbit while leptin also improves both meiotic and cytoplasmic *in vitro* maturation of rabbit oocytes.

Key words: leptin, Ob-R, oocyte maturation