

INMUNOLocalización DE RECEPTORES PARA MELATONINA MT1A EN CÉLULAS DEL CÚMULUS OVINAS

Casao, A.¹, Pérez-Pe, R.¹, Forcada, F.², Abecía, J.A.², Muiño-Blanco, T.¹ y Cebrián-Pérez, J.A.¹

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular.

² Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. España. E-mail: adriana@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La presencia de melatonina, tanto endógena como exógena, durante la maduración del ovocito en la especie ovina afecta positivamente a su calidad final, tanto en situaciones in vivo (Vázquez et al., 2009; Vázquez et al., 2010) como in vitro (Casao et al., 2010). Sin embargo, el mecanismo por el que la melatonina podría ejercer su acción sobre la maduración ovocitaria no es del todo conocido. Aunque en situaciones in vivo podría ejercer su acción mediante una mejora de la función del eje hipotálamo-hipofisario (Forcada et al., 2007), este mecanismo no explicaría el incremento de las tasas de maduración obtenidas in vitro en presencia de melatonina (Casao et al., 2010).

En el folículo preovulatorio, el ovocito está rodeado de una capa compacta de células de la granulosa especializadas, denominadas células del cúmulus. A su vez, el ovocito está rodeado de la zona pelúcida, formada por mucopolisacáridos que es impermeable a la mayor parte de las sustancias. Por lo tanto, la comunicación entre el ovocito y el fluido folicular se produce a través de las células del cúmulus que emiten prolongaciones (*gap-junctions* o uniones gap) que atraviesan la zona pelúcida y conectan con la membrana plasmática del ovocito (Senger, 2003). La falta de receptores para la mayor parte de las hormonas reproductivas en la membrana plasmática del ovocito, y su presencia en la de las células de la granulosa y el cúmulus (Juengel et al., 2006) confirmarían la teoría de que la maduración ovocitaria está regulada por estas células (Sun et al., 2009). Por tanto, el objetivo de este estudio es demostrar la presencia de receptores para melatonina en la membrana de las células del cúmulus del ovocito inmaduro como primer paso para determinar el mecanismo de acción de la melatonina sobre la maduración ovocitaria.

MATERIAL Y METODOS

Para la obtención de células del cúmulus, se recogieron 20 ovarios de ovejas adultas, sacrificadas en el matadero y se transportaron al laboratorio en PBS con 100 UI/ml penicilina G y 100 µg/ml de estreptomycin, a una temperatura de alrededor de 35°C. Ya en el laboratorio, los ovarios se lavaron 3 veces con PBS a 35°C, se dispusieron en una placa Petri cubiertos parcialmente con medio de manejo (Hepes-TCM199, 0,1% PVA, 0,04% NaHCO₃, 25 UI/ml de heparina, 100 UI/ml penicilina G y 100 µg/ml de estreptomycin) y los folículos se rompieron para liberar los ovocitos y células de la granulosa mediante una combinación de los métodos de punción y *slicing* (Wani et al., 2000). 80 ovocitos con varias capas de células del cúmulus se transfirieron a otra placa con medio de manejo, y las células del cúmulus se separaron mediante una serie de enérgicos pipeteos. Estas células del cúmulus libres en el medio se fijaron añadiendo paraformaldehído al 4% e incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Tras la fijación, 40 µl de la suspensión celular se dispuso sobre portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina y se dejaron secar toda la noche. Al día siguiente las muestras se lavaron 3 veces con PBS (136 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10,1 mM Na₂HPO₄ y 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,2) y se permeabilizaron con tritón X-100 al 0,5% (v/v) en PBS durante 15 minutos. Tras otros tres lavados en PBS, los sitios de unión inespecíficos se bloquearon mediante una incubación con 5% de BSA (w/v) en PBS durante dos horas a temperatura ambiente; pasado ese tiempo, las células de la granulosa se incubaron con el anticuerpo primario MEL-1A/B-R (H-120, *rabbit polyclonal antibody*, Santa Cruz Biotechnology, Inc., EEUU), que reacciona frente a los aminoácidos 161-280 de la región interna del receptor para melatonina MT1A de origen humano, a una concentración de 1/50 en PBS con 1% de BSA (p/v) durante toda la noche a 4°C, excepto una de las muestras, que se incubó únicamente en PBS con 1% de BSA sin anticuerpo primario y que sirvió como control.

Al día siguiente, las muestras se lavaron tres veces en PBS durante 5 minutos, y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (*chicken anti-rabbit*, Invitrogen Corp., Carlsbad, EEUU) a una concentración de 1/800 en PBS con 1% de BSA (p/v) durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado ese tiempo las muestras se lavaron de nuevo tres veces con PBS durante 5 minutos y en oscuridad, se tiñeron con yoduro de propidio para marcar los núcleos, se montaron en portaobjetos con medio de montaje (DABCO, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EEUU) y se estudiaron mediante microscopía de fluorescencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las células del cúmulus incubadas con anticuerpo primario mostraron una intensa fluorescencia verde en forma de punteado en toda la superficie de la membrana plasmática (Figura 1a) correspondiente a los receptores MT1A para melatonina, mientras que las células control únicamente presentaban una fluorescencia roja correspondiente a la tinción de los núcleos con yoduro de propidio (Figura 1b). La presencia de receptores MT1A para melatonina y su expresión génica en células del cúmulus y la granulosa del ovario ya ha sido previamente demostrada en otras especies, en concreto en humana (Yie et al., 1995), rata (Soares et al., 2003) y en la especie porcina (Kang et al., 2008).

A pesar de que el efecto de la melatonina sobre la maduración del ovocito y su calidad final está ampliamente demostrado en muchas especies (Dimitriadis et al., 2005; Kang et al., 2008; Berlinguer et al., 2009), incluida la ovina (Casao et al., 2010), el mecanismo de acción por el que ejercería este efecto todavía no se conoce completamente. Sin embargo, el hecho de que las células de la granulosa secreten activamente melatonina (Kim et al., 2010), y que los niveles de esta hormona en el foliculo pre-ovulatorio sean superiores a los sanguíneos (Brzezinski et al., 1987), sugieren que la presencia de melatonina podría ser fundamental en el proceso de maduración del ovocito.

La presencia de receptores para melatonina en la membrana de las células del cúmulus indicaría que parte de los efectos de la melatonina sobre la maduración del ovocito podrían estar modulados a través de estos receptores. En concreto, la activación de los receptores para melatonina MT1 en células somáticas produce un aumento de la fosforilación de las kinasas ERK1/2 y MEK (Jockers et al., 2008), lo que en las células del cúmulus produciría el bloqueo de las uniones gap, paso indispensable para la reanudación de la meiosis previa a la ovulación (Sun et al., 2009).

En conclusión, los resultados de este trabajo ponen de manifiesto la presencia de receptores para melatonina MT1A en las células del cúmulus ovinas, aunque su relación con las variaciones estacionales de fertilidad in vivo y la competencia ovocitaria in vitro, además de las rutas bioquímicas implicadas, deberán ser estudiadas en trabajos posteriores.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Berlinguer, F., Leoni, G. G., Succu, S., Spezzigu, A., Madeddu, M., Satta, V., Bebbere, D., Contreras-Solis, I., Gonzalez-Bulnes, A. Naitana, S. 2009. *J. Pineal Res.* 46: 383-391.
- Brzezinski, A., Seibel, M. M., Lynch, H. J., Deng, M. H. Wurtman, R. J. 1987. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64: 865-867.
- 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.
- Dimitriadis, I., Papanikolaou, T., Vainas, E., Amiridis, G. S., Valasi, I., Samartzi, F. Rekkas, C. A. 2005. *Reprod. Domest. Anim.* 40: 397-397.
- Forcada, F., Abecia, J. A., Casao, A., Cebrian-Perez, J. A., Muino-Blanco, T. Palacin, I. 2007. *Theriogenology* 67: 855-862.
- Jockers, R., Maurice, P., Boutin, J. A. Delagrangé, P. 2008. *British Journal of Pharmacology* 154: 1182-1195.
- Juengel, J. L., Heath, D. A., Quirke, L. D. McNatty, K. P. 2006. *Reproduction* 131: 81-92.
- 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.
- Kim, M. K., Park, E. A., Choi, W. Y., Lee, W. S., Yoon, T. K. Lee, D. R. 2010. *Fertil. Steril.* 94: S142-S142.
- Senger, P. L. 2003. Pathways to pregnancy and parturition. EEUU, Current Conceptions, Inc.

- Soares, J. M. J., Masana, M. I., Ersahin, C. Dubocovich, M. L. 2003. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306: 694-702.
- Sun, Q.-Y., Miao, Y.-L. Schatten, H. 2009. *Cell Cycle* 8: 2741-2747.
- Vázquez, M. I., Forcada, F., Casao, A., Abecia, J. A., Sosa, C. Palacín, I. 2010. *Reprod. Domest. Anim.* 45: 677-684.
- Vázquez, M. I., Forcada, F., Casao, A., Sosa, C., Palacín, I. Abecia, J. A. 2009. *Anim. Reprod. Sci.* 112: 83-94.
- Wani, N. A., Wani, G. M., Khan, M. Z. Salahudin, S. 2000. *Small Rumin. Res.* 36: 63 - 67.
- Yie, S., Niles, L. Younglai, E. 1995. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 1747-1749.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado con las ayudas AGL2010-18975, AGL2008-01476 (subprograma GAN), y A26-2010/DGA.

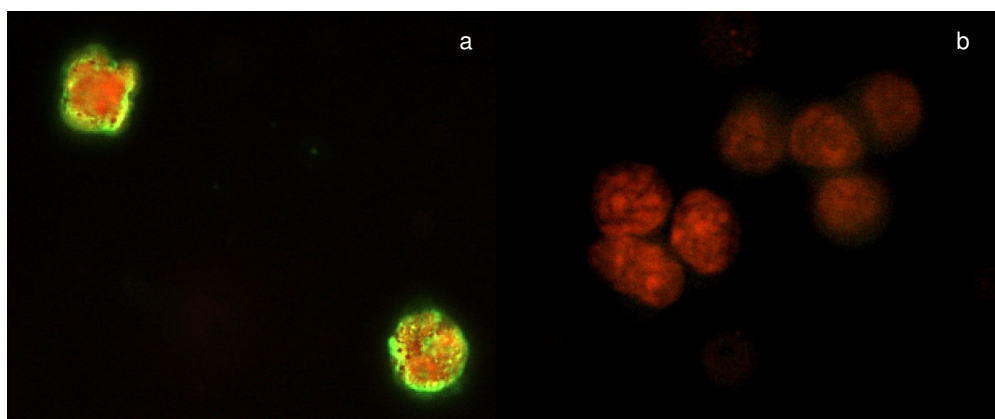


Figura 1: Receptor para melatonina MT1A, visible en forma de punteado en la superficie de la membrana plasmática de las células del cúmulus ovinas tras inmunofluorescencia indirecta (a). Este punteado no está presente en las células utilizadas como grupo control e incubadas sin anticuerpo primario frente a este receptor (b).

IMMUNOLocalIZATION OF MELATONIN RECEPTOR MT1A IN OVINE CUMULUS CELLS

ABSTRACT: Endogen or exogen melatonin increases in vivo and in vitro oocyte developmental competence. This effect could be mediated by melatonin effect over immature oocyte's cumulus cells due to the impermeability of oocyte's zona pellucida to most substances. In order to determine if this effect is mediated by melatonin specific membrane receptors, cumulus cells obtained from adult ewes' ovaries were subjected to indirect immunofluorescence with anti-melatonin receptor MT1A antibody. Direct visualization by fluorescence microscopy of cumulus cells incubated with anti- MT1A showed an intense fluorescence all over the plasma membrane, which did not appear in the cells used as controls. These results indicate the presence of melatonin receptors in ewes' cumulus cells, although the importance this receptor may have on in vivo fertility seasonal variations and in vitro increase of oocyte developmental competence as well as the biochemical pathways implicated should be determined in future studies.

Keywords: Melatonin, receptor, cumulus cells, sheep.