

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE LEPTINA AL MEDIO DE MADURACIÓN *IN VITRO* SOBRE EL NIVEL DE TRANSCRIPCIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA APOPTOSIS Y LA COMPETENCIA DE OVOCITOS DE TERNERAS PREPÚBERES

Córdova, B. ¹, Morató, R. ¹, De Frutos, C. ², Bermejo-Álvarez, P. ², Gutiérrez-Adán, A. ² y Mogas, T. ¹

¹ Departamento de Medicina y Cirugía Animales. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. España. ² Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid. España. E-mail: bladimir_cordova@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones a partir de animales jóvenes se ha utilizado para disminuir el intervalo generacional y aumentar la intensidad de selección en programas de mejora genética. Además, las terneras prepúberes sirven como modelo para evaluar la capacidad de desarrollo de ovocitos de baja calidad, ya que sus ovocitos muestran un menor grado de competencia comparado con los de animales adultos. En la última década se han realizado diferentes estudios sobre el papel funcional de la leptina añadida al medio de maduración *in vitro* en varias especies como la porcina (Craig et al., 2004), bovina (Boelhaue et al., 2005; Paula-Lopes et al., 2007) o equina (Consiglio et al., 2009). Boelhaue et al. (2005) demostraron que la suplementación con leptina durante la maduración *in vitro* de ovocitos de vaca ejercía un efecto positivo, incrementando la proporción de ovocitos que llegaban al estadio de blastocisto y el número total de células de dichos blastocistos. Otros estudios observaron que la exposición de los ovocitos a concentraciones fisiológicas de leptina aumentaba la fosforilación de STAT3 y MAPK (Craig et al., 2004) y disminuía los niveles de cAMP, promoviendo la ruptura de la vesícula germinal (Matsuoka et al., 1999). Por otra parte, Paula-Lopes et al. (2007) señalaron que la presencia de leptina reducía el porcentaje de células apoptóticas en el cúmulo, factor que se ha correlacionado con la competencia de desarrollo del complejo cúmulo-ovocito en la especie bovina (Ikeda et al., 2003). Por ello, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la leptina sobre el nivel de transcripción de genes involucrados en el proceso de la apoptosis y la competencia del ovocito en terneras pre-púberes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Maduración *in vitro*. Se obtuvieron ovarios de terneras prepúberes de matadero (9 meses) y se transportaron al laboratorio en PBS a 37°C. Los complejos cúmulo-ovocitos (CCO) se obtuvieron mediante aspiración y se seleccionaron aquellos ovocitos que presentaban un citoplasma homogéneo con tres o más capas de células del cúmulo. A continuación, los ovocitos se distribuyeron aleatoriamente en 5 grupos: 1) **SFB**: TCM199 suplementado con 10% suero fetal bovino, 10 ng/ml *epidermal growth factor* (EGF) y 50 µg/ml de gentamicina; 2) **PVA**: TCM199 suplementado con 1 mg/ml de alcohol polivinilo, 10 ng/ml EGF y 50 µg/ml de gentamicina; 3) **L10**, 4) **L100** y 5) **L1000**: PVA suplementado con 10, 100 y 1000 ng/ml de leptina, respectivamente, y se maduraron *in vitro* durante 24 horas a 38,5°C y con un 5% de CO₂ en aire. A continuación, se denudaron mediante pipeteo y se almacenaron, por separado, grupos de 15 ovocitos y sus células del cúmulo correspondientes, a -80°C hasta la extracción de ARN poliadenilado. Los niveles de transcripción de los genes *H2A.z*, *BAX*, *SHC1*, *SHC*, *TP53*, *PGTS2*, *DNMT3A*, *CCNB1* y *LEPR* se determinaron mediante qRT-PCR.

Extracción de RNA, transcripción reversa, y cuantificación de la abundancia de transcripción del mRNA. Los procedimientos de biología molecular se realizaron según lo descrito previamente (Bermejo-Álvarez et al., 2010). Se extrajo ARN poliadenilado de tres grupos de 15 ovocitos y de sus respectivas células del cúmulo de cada grupo experimental, utilizando el kit de extracción directa Dynabeads (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Noruega). Siguiendo las instrucciones del fabricante con pequeñas modificaciones. Inmediatamente después de la extracción, se realizó la transcripción reversa siguiendo las instrucciones del fabricante (BIOLINE, Ecogen, Madrid, España) usando cebadores Poly(T), hexameros aleatorios y la enzima transcriptasa reversa *MMLV*. La cantidad relativa de transcrito se

analizó por PCR cuantitativa en 3 grupos de cDNA por grupo experimental con dos repeticiones para cada gen de interés. Los niveles relativos de abundancia se contrastaron respecto al nivel de la histona H2A.z.

El análisis estadístico de la abundancia relativa de ARN mensajero se realizó mediante el uso del programa SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). Diferencias entre grupos de ovocitos y células del cúmulus fueron analizados mediante ANOVA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dos genes (*PTGS2* y *LEPR*) mostraron diferencias significativas entre los grupos, tanto en ovocitos como en células del cúmulus. La abundancia relativa del transcrito de *PTGS2* fue significativamente mayor en el grupo madurado con SFB en comparación con el resto de los grupos, independientemente de la concentración de leptina. La abundancia de ARN mensajero de este gen se ha correlacionado positivamente con la competencia de los ovocitos en la especie bovina (Assidi et al., 2008) y humana (McKenzie et al., 2004). Por otro lado, la adición de leptina a cualquiera de las tres concentraciones disminuyó la abundancia de ARN mensajero de *LEPR* en comparación con los grupos SFB y PVA, de forma similar a los resultados obtenidos en tejidos adultos (Martin et al., 2000; Tena-Sempere et al., 2000). La abundancia de transcritos de dos genes implicados en la vía apoptótica (*TP53* y *BAX*) varió significativamente entre los grupos específicos, sugiriendo un efecto antiapoptótico de 10 ng/ml de leptina en los ovocitos (*TP53*) y de 100 ng/ml en las células del cúmulus (*BAX*). Por último, se observó un aumento de la cantidad de transcrito de la *de novo* metiltransferasa de ADN *DNMT3A* en los ovocitos y células del cúmulus madurados en presencia de suero en comparación con otros grupos madurados con leptina a diferentes concentraciones. Hasta donde sabemos, no hay informes de un efecto directo de la leptina en la metilación del ADN, por lo que las diferencias de la transcripción pueden haber sido mediadas por efectos de segundo orden. Teniendo en cuenta que se observó un mayor nivel transcripcional de los genes de apoptosis en el grupo madurado con FSB, la expresión más alta de *DNMT3A* puede actuar como un mecanismo de compensación antiapoptótico (Wang et al., 2004; Vinken et al., 2010). En conclusión, nuestros resultados sugieren que la adición de la leptina durante de maduración *in vitro* ejerce un efecto antiapoptótico en el ovocito y las células del cúmulo y reduce la abundancia mRNA del receptor de leptina (*LEPR*).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Assidi M, Dufort I, Ali A, Hamel M, Algriany O, Dielemann S, Sirard MA. 2008. Biol Reprod. 79: 209-222.
- Bermejo-Alvarez P, Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A. 2010. Reprod Biomed Online. 20: 341-349.
- Boelhaue M, Sinowatz F, Wolf E, Paula-Lopes FF. 2005. Biol Reprod. 73: 737-44.
- Consiglio A, Dell'Aquila ME, Fiandanese N, Ambruosi B, Cho YS, Bosi G, Arrighi S, Lacalandra GM, Cremonesi F. 2009. Reprod Biol Endocrinol. 7: 113.
- Craig J, Zhu H, Dyce PW, Petrik J, Li J. 2004. Endocrinology. 145: 5355-63.
- Ikeda S, Imai H, Yamada M. 2003. Reproduction. 125: 369-76.
- Martin RL, Perez E, He YJ, Dawson R Jr, Millard WJ. 2000. Metabolism. 49: 1479-1484.
- Matsuoka T, Tahara M, Yokoi T, Masumoto N, Takeda T, Yamaguchi M, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y. 1999. Biochem Biophys Res Commun. 256: 480-4.
- McKenzie L, Pangas S, Carson S, Kovanci E, Cisneros P, Buster J, Amato P, Matzuk M. 2004. H.R. 19: 2869-2874.
- Paula-Lopes FF, Boelhaue M, Habermann FA, Sinowatz F, Wolf E. 2007. Biol Reprod. 76: 532-41.
- Tena-Sempere M, Pinilla L, Gonzalez LC, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E. J 2000. Endocrinol. 167: 479-486.
- Vinken M, Snykers S, Fraczek J, Decrock E, Leybaert L, Rogiers V, Vanhaecke T. 2010. Toxicol In Vitro. 24: 445-451.
- Wang YA, Kamarova Y, Shen KC, Jiang Z, Hahn MJ, Wang Y, Brooks SC. Cancer Biol. 2005. Ther. 4: 1138-1143.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto Nº. AGL2007-60227 y AGL2009-11358).

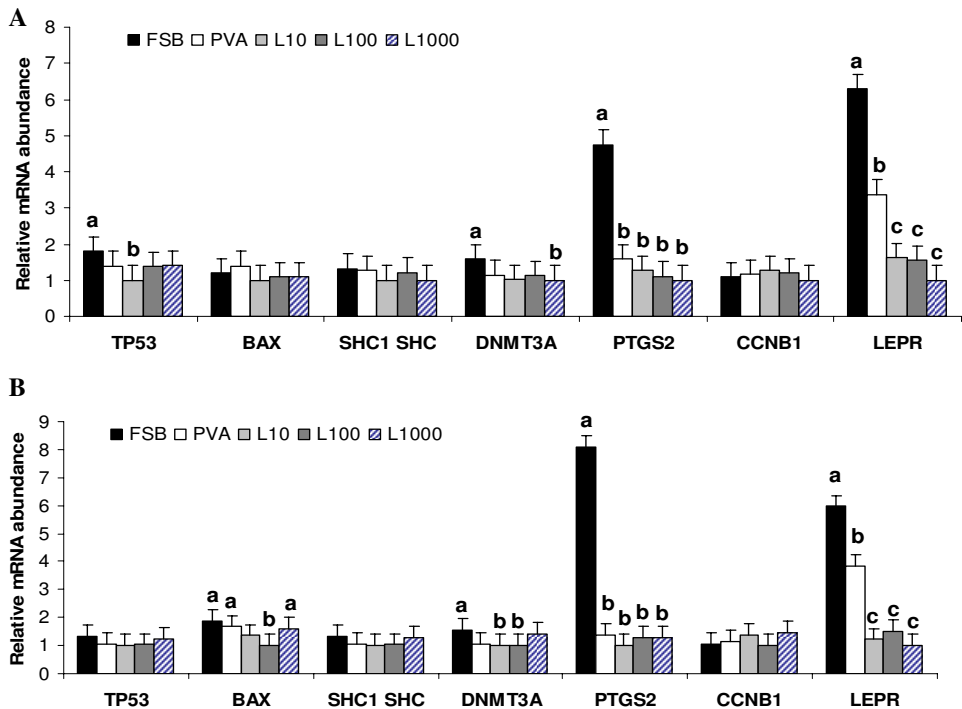


Figura 1. Abundancia relativa de transcritos de 7 de genes relacionados con la apoptosis (*TP53*, *BAX* y *SHC1 SHC*), metilación de ADN (*DNMT3A*), competencia del ovocito (*PTGS2* y *CCNB1*) y el receptor de la leptina (*LEPR*). A: ovocitos; B: células del cúmulus. Valores con diferentes letras en un mismo gen indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

LEVEL OF TRANSCRIPTION OF GENES INVOLVED IN APOPTOSIS AND COMPETENCE OF PREPUBERTAL BOVINE OOCYTES IN VITRO MATURED WITH LEPTIN

ABSTRACT: Leptin has been shown to exert positive effects during *in vitro* maturation of adult bovine oocytes, influencing blastocyst development, apoptosis and the transcript levels of developmentally important genes. The present study was performed to analyze the differential effects of leptin on prepubertal calf cumulus oocyte complexes. In particular, we evaluated whether it affects the transcript levels of genes in oocytes and cumulus cells. Cumulus-oocyte complexes were matured in serum-free medium containing 1 mg/ml polyvinyl alcohol (PVA) and 10, 100 and 1000 ng/ml leptin or in medium supplemented with 10% foetal calf serum (FSB) as a positive control. Relative mRNA levels of seven genes were evaluated by qRT-PCR, and five (*TP53*, *BAX*, *DNMT3A*, *PTGS2* and *LEPR*) showed differences among specific groups. *LEPR* mRNA abundance was significantly higher in the group matured with FCS compared with the other groups. Two genes involved in the apoptosis pathway showed significant differences between specific groups, suggesting an antiapoptotic effect of 10 ng/ml leptin in oocytes (*TP53*) and 100 ng/ml in cumulus cells (*BAX*). In conclusion, the addition of leptin to the *in vitro* maturation medium of prepubertal bovine oocytes exerts an antiapoptotic effect in the oocyte and cumulus cells and decreases the mRNA abundance of leptin receptor (*LEPR*).

Keywords: calf, maturation, leptin, mRNA