

INDUCCIÓN DE TOLERANCIA A ESTRÉS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO EN BOVINOS

Stress tolerance induction during early embryonic development in cattle

Pía Loren¹, Jennie Risopatrón², María Elena Arias³, Ricardo Felmer⁴, Raúl Sánchez⁵

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.7>

¹ Magister en Ciencias con
mención en Biología Celular
y Molecular Aplicada,
Universidad de La Frontera.

² Magister en Ciencias con
mención en Reproducción
Animal, Universidad Austral
de Chile.

³ Doctor en Ciencias con
mención en Biología Celular
y Molecular Aplicada.,
Universidad de La Frontera.

⁴ Ph.D., University of
Edinburgh, Edimburgo.

⁵ Doctor en Medicina, J.L.
Universidad de Giessen.

E-mail:
raul.sanchez@ufrontera.cl.

RESUMEN

La exposición de ovocitos mamíferos por cortos periodos de tiempo a diferentes tipos de estrés como alta presión hidrostática, osmótico, térmico, mecánico u oxidativo puede inducir tolerancia estrés en embriones mamíferos. El objetivo del estudio fue evaluar la tasa de desarrollo embrionario y la expresión génica relativa de HIF1A y HSP70 en blastocistos bovinos generados a partir de ovocitos bovinos maduros tratados con 3-morfolinosisidonimina (SIN-1). Ovocitos bovinos inmaduros fueron madurados durante 22-23 horas. Posteriormente, los ovocitos maduros fueron incubados con SIN-1 (Control, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ y 10⁻⁴ M SIN-1) por 1 hora. La co-incubación de los gametos para la fecundación *in vitro* fue realizada durante 18 horas. Los presuntos cigotos fueron cultivados hasta el día 7. Los resultados muestran que la tasa de división al día 3 no se ve afectada por ningún tratamiento, mientras que la tasa de generación de blastocistos se ve disminuida con 10⁻⁵ y 10⁻⁴ M, no así con 10⁻⁷ y 10⁻⁶ M SIN-1. Al evaluar la expresión génica de HSP70 y HIF1A, se observó un incremento de los niveles de HSP70 para 10⁻⁷M y para HIF1A 10⁻⁷, 10⁻⁶ y 10⁻⁴ M SIN-1. En conclusión, es posible generar una inducción de tolerancia a estrés en embriones bovinos pre-tratados con bajas concentraciones SIN-1.

Palabras clave: *embrión, bovino, estrés, expresión génica.*

ABSTRACT

The short-term exposure of mammalian oocytes to hydrostatic pressure, osmotic stress, thermal, stress, mechanical stress or oxidative stress might induce stress tolerance in mammalian embryos. The objective of study was to evaluate the embryonic development rate and relative gene expression of HIF1A and HSP70 in bovine blastocysts generated from bovine oocytes

treated with SIN-1. Bovine oocytes were matured in TCM-199 medium supplemented by 22-23 hours. Following, the oocytes were incubated with SIN-1 (Control, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ and 10⁻⁴ M SIN-1) by 1 hour. Later, the gamete incubation for *in vitro* fertilization were realized during 18 hours. The presumptive zygotes were cultivated until 7 day. The results show that the cleavage rate at day 3 did not affect by any treatment, while the blastocyst rate was decreased with

10^{-5} and 10^{-4} M, but not with 10^{-7} y 10^{-6} M SIN-1. To assess the relative gene expression of HSP70 and HIF1A, it was observed an increase in the level of HSP70 for 10^{-7} M and for HIF1A 10^{-7} , 10^{-6} and 10^{-4} M SIN-1. In conclusion, is possible to generate a stress tolerance induction in bovine embryos pre-treated with low concentrations of SIN-1.

Keywords: *embryo, bovine, stress, gene expression*

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, se ha intentado mejorar la calidad de los embriones generados mediante procedimientos *in vitro*. Sin embargo, las condiciones de cultivo *in vitro* son diferentes a las condiciones de cultivo *in vivo* y pueden representar una fuente de estrés oxidativo para los embriones generados. El estrés oxidativo se define como el desbalance entre los agentes oxidantes y los antioxidantes resultado por el incremento en la producción de oxidantes y/o reducción de antioxidantes, generando un estado de estrés en la célula. La mayor fuente de especies reactivas de oxígeno (EROs) se origina a partir de O_2 , el cual al no ser completamente reducido es transformado a anión superóxido ($\bullet O_2^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\bullet OH$) (Goud *et al.*, 2008). De la misma manera, la principal fuente de especies reactivas de nitrógeno (ERNs) es el óxido nítrico (NO), el cual es generado a partir de la conversión de L-arginina mediante 3 diferentes isoformas de NO sintasa (NOS): neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS) (Goud *et al.*, 2014). Existe una dualidad en el efecto de EROs y ERNs en la fisiología de los gametos, son necesarias para la maduración de los ovocitos (Morado *et al.*, 2009) pero en condiciones anormales o mayores a 5% O_2 pueden alterar el desarrollo embrionario causando apoptosis (Goto *et al.*, 1993). 3-morfolinisidnonimina (SIN-1) es un potente vasodilatador y un donador de EROs y ERNs, el cual ha sido utilizado para determinar su efecto como donador de peroxinitrito, observándose un incremento en la capacitación de espermatozoides bovinos criopreservados cuando estos son incubados a 10^{-5} M (Rodríguez and Beconi 2009).

Recientemente, se ha postulado que la inducción de tolerancia a estrés en los ovocitos y embriones mamíferos podría implicar una mejora en el desarrollo embrionario, creando una nueva oportunidad para estudiar estos factores. Por esta razón, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la exposición de ovocitos bovinos maduros a 3-morfolinisidnonimina (SIN-1) sobre el desarrollo embrionario y la expresión relativa de dos genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo, HIF1A y HSP70.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Todos los reactivos fueron comprados en Sigma (St. Louis, MO) a menos que se indique lo contrario.

Selección y maduración de ovocitos.

Ovarios bovinos fueron colectados de hembras de un matadero local (Frigorífico Temuco, Chile). Los ovocitos fueron aspirados desde folículos entre 2 – 8 mm de diámetro y seleccionados de acuerdo al criterio de citoplasma homogéneo y al menos 4 capas de células del cúmulo. Los ovocitos seleccionados fueron cultivados en grupos de 40 – 50 en 500 μL de TCM-199 suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal inactivado (Hyclone Laboratories, Inc., UT), 0,2 mM piruvato de sodio, 25 $\mu g/mL$ sulfato de gentamicina, 6 mg/mL hormona FSH (Sioux Biochemical, Inc., Sioux City, IA), 6 $\mu g/mL$ hormona LH (Sioux Biochemical) y 1 mg/mL estradiol por 22-23 horas a $38,5^\circ C$, 5 % CO_2 y humedad a saturación.

Preparación de espermatozoides

Semen bovino criopreservado con fertilidad probada fue descongelado a $37^\circ C$, sometidos a un gradiente discontinuo de Percoll® (45 y 90% (v/v)); Pharmacia) y lavados con TALP-Sperm suplementado. La concentración final fue ajustada para fecundar con 1×10^6 espermatozoides/mL.

Modulación del estado redox por SIN-1

Antes de la fecundación *in vitro*, los ovocitos maduros fueron incubados con diferentes concentraciones de SIN-1 (M5793) durante 1 hora: 0, 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} M.

Fecundación in vitro

Los ovocitos maduros fueron lavados en medio TALP-IVF y luego depositados en la placa de fecundación. Los ovocitos fueron co-incubados con los espermatozoides durante 18 horas a $38,5^\circ C$, 5 % CO_2 y humedad a saturación.

Cultivo in vitro

Luego de la fecundación, los presuntos cigotos fueron despojados de las células del cúmulo y transferidos a gotas de 50 μL de medio KSOM (EmbryoMax, Millipore Corp, Billerica, Ma) bajo aceite mineral en grupos de 25 – 30 cigotos en una atmósfera de baja tensión de oxígeno (5% CO_2 , 5% O_2 and 95% N_2), $38,5^\circ C$ y humedad a saturación. A las 72 horas del cultivo, se suplementó con suero bovino fetal 5% (v/v). Evaluación de desarrollo embrionario

Se evaluó la tasa de división de los embriones cultivados al día 3 post inicio de cultivo embrionario,

así como la tasa de generación de blastocistos al día 7 post inicio de cultivo embrionario.

Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Tres pool de embriones de cada tratamiento (n=5 blastocistos expandidos/pool) fueron lisados y sometidos a extracción de ARN utilizando el Kit PicoPure RNA Isolation (Arcturus, Carlsbad, CA, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ensayo de transcripción reversa fue llevado a cabo utilizando el Kit RevertAid H Minus First Strand (Fermentas Inc., MD, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADNc fue almacenado a -80°C hasta su uso.

PCR cuantitativa

Los niveles de expresión relativa de HIF1A (NM_174339.3) y HSP70 (NM_203322.2) relacionados con la tolerancia a estrés fueron analizados por RT-Qpcr utilizando Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix (Stratagene) en un termociclador Mx3000P (Agilent Technologies, CA, USA). Además, los genes de referencia utilizados fueron SF3A1 (NM_001081510.1) y HMBS (NM_001046207.1).

Las secuencias de los partidores fueron las siguientes (de 5' -> 3'):

HIF1A-F CCATTTTCCACTCAGGACAC y
 HIF1A-B AATTCATCACTGGTGGCTGT;
 HSP70-F CAACAAGATCACCATCACCA y
 HSP70-R CACTTGTCCAGCACCTTCTT;
 SF3A1-F GCGGGAGGAAGAAGTAGGAG y
 SF3A1-R TCAGCAAGAGGGACACAAA;
 HMBS-F CTTTGGAGAGGAATGAAGTGG y
 HMBS-R AATGGTGAAGCCAGGAGGAA.

Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en duplicado en un volumen final de 20 μ L para todos los genes: 4 μ L ADNc, 10 μ L Master mix, 2 μ L de partidore forward (250 nM final), 2 μ L partidore reverse (250 nM final) y 4 μ L agua grado PCR. El programa de PCR consistió en una denaturación inicial de 95°C por 5 min, 40 ciclos a 95°C por 20 s para denaturación, 58°C por 20 s para alineación de los partidores y 72°C por 20 s para la extensión final.

Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos experimentales fueron analizadas mediante ANOVA de una vía para la tasa de división así como la tasa de generación de blastocistos. Para la expresión relativa, los valores cuantitativos fueron estimados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Subsecuentemente, los resultados fueron sometidos a ANOVA para cada tratamiento. $P < 0,05$

fue considerado estadísticamente significativo. Todos los análisis fueron realizados con JMP® 10 (SAS Institute, Inc.).

RESULTADOS

Producción in vitro de embriones

Los resultados demuestran que la tasa de división a las 72 horas no se ve afectada entre los grupos tratados con respecto al control (Figura 1, $p=0,0613$). De la misma forma, al evaluar la tasa de generación de blastocistos al día 7, no se observaron diferencias cuando los ovocitos maduros fueron tratados con 10^{-7} y 10^{-6} M SIN-1. Sin embargo, elevadas concentraciones de SIN-1 (10^{-5} y 10^{-4}) mostraban una reducción significativa en la tasa de generación de blastocistos (Figura 1).

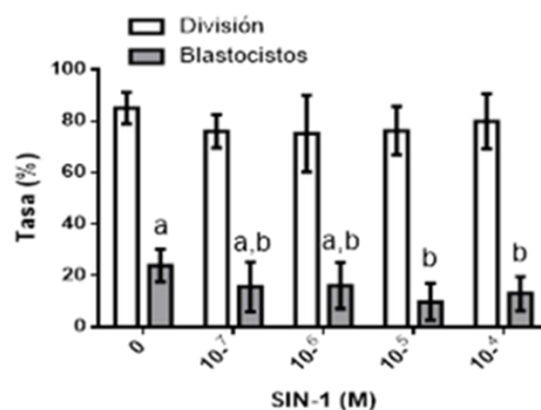


Figura 1. Producción in vitro de embriones bovinos generados a partir de la exposición de ovocitos bovinos maduros a diferentes concentraciones de SIN-1. Las columnas con diferentes superíndices difieren significativamente.

Expresión relativa

El análisis de la expresión relativa de los genes HSP70 ($p=0,042$, Figura 2A) y HIF1A ($p < 0,0001$, Figura 2B) mostró diferencias entre los grupos tratados con respecto al control. Se observa un incremento en los niveles de HSP70 en blastocistos bovinos generados a partir de ovocitos tratados con 10^{-7} M SIN-1. De la misma manera, se observa un incremento en los niveles de expresión de HIF1A en blastocistos bovinos generados a partir de ovocitos tratados con 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-4} M SIN-1.

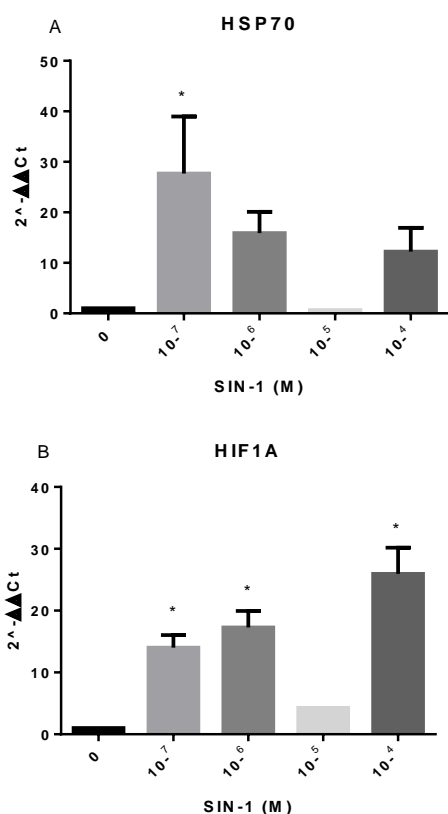


Figura 2. Análisis de expresión génica relativa en blastocistos expandidos de cada tratamiento luego de 7 días de cultivo ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$). A) HSP70 y B) HIF1A.

DISCUSIÓN

Las EROs y ERNs actúan como moléculas de señalización modulando varios aspectos de la fisiología de los gametos, existiendo una dualidad en sus efectos, son necesarias en procesos fisiológicos como en el fluido folicular para la maduración de los ovocitos y reanudación de la meiosis (Morado *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2010), pero en procesos patológicos su incremento puede alterar el desarrollo embrionario con arresto y apoptosis (Goto *et al.*, 1993).

SIN-1 es un vasodilatador y donador de EROs y ERNs, que en solución acuosa libera $\bullet O_2^-$ y NO (An *et al.*, 2015) y es utilizado para determinar el efecto como donador de ONOO⁻ en estudios de reproducción. En concentraciones de 10^{-5} M SIN-1 puede acelerar la capacitación de espermatozoides bovinos criopreservados (Rodríguez and Beconi 2009), pero disminuye la motilidad total y progresiva así como algunos parámetros de cinética espermática en espermatozoides humanos (Uribe *et al.*, 2015). Sin embargo, el efecto SIN-1 en ovocitos en especies mamíferas no ha sido estudiado. Pero, otros inductores

de estrés oxidativo como H_2O_2 en concentraciones de $100 \mu M$ en ovocitos bovinos maduros mejoran el desarrollo embrionario, posiblemente por incremento de la tolerancia a estrés (Vandaele *et al.*, 2010). De la misma forma, ovocitos bovinos tratados por 1 hora con 10^{-6} y 10^{-5} M nitroprusiato de sodio (SNP) mantiene la tasa de generación de blastocistos con respecto al grupo control sin inductor (Cheuquemán *et al.*, 2015). Efecto similar se demostró en nuestro estudio con la exposición de ovocitos bovinos maduros a 10^{-7} y 10^{-6} M SIN-1 con un adecuado desarrollo embrionario, comparado con el grupo control.

En relación a la expresión génica se evaluaron aquellas proteínas que se expresan en relación a estrés, como son las proteínas de estrés térmico (HSPs), chaperonas moleculares que ayudan a prevenir la denaturalización de las proteínas durante y luego de diversos tipos de estrés (Ang *et al.*, 1991), disminuyendo la incidencia de apoptosis (Esfandiari *et al.*, 2007); como asimismo HIF1 que regula la respuesta adaptativa cuando los niveles de oxígeno son alterados, y la sobreexpresión protege contra el daño celular y apoptosis inducida por condiciones de estrés oxidativo e hipoxia (Kiani *et al.*, 2013). En nuestro estudio se observó un incremento en los niveles de HSP70 (10^{-7} M SIN-1) y HIF1A (10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-4} M SIN-1) en los blastocistos bovinos generados a partir de ovocitos maduros tratados con SIN-1, lo cual indica que el incremento de la expresión de HSP70 y HIF1A es requerida para la mantención de un adecuado desarrollo embrionario y que SIN-1 puede inducir un mecanismo endógeno para sobrellevar el estrés que generado por EROs y ERNs

CONCLUSIÓN

La exposición por cortos periodos de tiempo de ovocitos bovinos maduros a 10^{-7} y 10^{-6} M SIN-1 mantiene un adecuado desarrollo embrionario cuando se evalúa la tasa de generación de blastocistos al día 7. Al analizar la expresión génica relativa, se observa un incremento significativo de los niveles de HSP70 e HIF1A en 10^{-7} M y 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-4} M SIN-1, respectivamente, por lo que estas concentraciones inducen la producción de defensas antioxidantes en blastocistos bovinos, generando embriones que pueden ser resistentes a diversos tipos de estrés. Queda por clarificar si esta tolerancia a estrés generada puede inducir una mejora en la sobrevivencia de los embriones o en la calidad de los embriones en condiciones altamente estresantes, como es el proceso de criopreservación.

Financiamiento

Proyecto Fondecyt 1130888, Conicyt, Gobierno de Chile.

Agradecimientos

Proyecto Fondecyt 1130888, Conicyt, Gobierno de Chile.

Beca de Doctorado Nacional, Conicyt, Gobierno de Chile.

REFERENCIAS

- An JM, Moon SA, Hong SY, Kang JW, Seo JT. Neuroprotective effect of 3-morpholinopyridone against Zn²⁺-induced PC12 cell death. *European Journal of Pharmacology* 2015. 748(0):37-44.
- Ang D, Liberek K, Skowrya D, Zylicz M, Georgopoulos C. Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins. *The Journal of biological chemistry* 1991; 266(36):24233-24236.
- Cheuquemán C, Loren P, Arias M, Risopatrón J, Felmer R, Alvarez J, Mogas T, Sánchez R. 229 Short-Term Exposure of Mature Oocytes to a Nitric Oxide Donor for Inducing Oxidative Stress Resistance on *in Vitro*-Produced Bovine Embryos. *Reproduction, Fertility and Development* 2015. 27(1):204.
- Esfandiari N, Falcone T, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK. Heat-shock proteins modulate the incidence of apoptosis and oxidative stress in preimplantation mouse embryos. *Fertility and sterility* 2007. 87(5):1214-1217.
- Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*. *Free radical biology & medicine* 1993. 15(1):69-75.
- Goud AP, Goud PT, Diamond MP, Gonik B, Abu-Soud HM. Reactive oxygen species and oocyte aging: role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 2008. 44(7):1295-1304.
- Goud PT, Goud AP, Najafi T, Gonik B, Diamond MP, Saed GM, Zhang X, Abu-Soud HM. Direct Real-Time Measurement of Intra-Oocyte Nitric Oxide Concentration *In Vivo*. *PLoS ONE* 2014. 9(6):e98720.
- Kiani AA, Kazemi A, Halabian R, Mohammadipour M, Jahanian-Najafabadi A, Roudkenar MH. HIF-1 α confers resistance to induced stress in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Archives of medical research* 2013. 44(3):185-193.
- Morado SA, Cetica PD, Beconi MT, Dalvit GC. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation *in vitro*. *Reproduction, fertility, and development* 2009. 21(4):608-614.
- Pandey AN, Tripathi A, Premkumar KV, Shrivastav TG, Chaube SK. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. *J Cell Biochem* 2010. 111(3):521-528.
- Rodriguez PC, Beconi MT. Peroxynitrite participates in mechanisms involved in capacitation of cryopreserved cattle. *Anim Reprod Sci* 2009. 110(1-2):96-107.
- Uribe P, Boguen R, Treulen F, Sanchez R, Villegas JV. Peroxynitrite-mediated nitrosative stress decreases motility and mitochondrial membrane potential in human spermatozoa. *Molecular human reproduction* 2015. 21(3):237-243.
- Vandaele L, Thys M, Bijttebier J, Van Langendonck A, Donnay I, Maes D, Meyer E, Van Soom A. Short-term exposure to hydrogen peroxide during oocyte maturation improves bovine embryo development. *Reproduction (Cambridge, England)* 2010. 139(3):505-511.