

EFFECTO METABOLOMICO DE LA SUPLEMENTACION CON SULFATO DE ZINC EN EL CULTIVO DE OVOCITOS DE CERDA, COMO MODELO ANIMAL PARA SU APLICACIÓN EN CELULAS HUMANAS

Parra-Forero, L^{1,3}, García-Contreras, A¹, Romo, S², Góngora, A³, Guevara, J¹, Mendoza, G¹.

¹Universidad Autónoma Metropolitana, ²FES Cuautitlán, ³Centro de Fertilidad Humana en México.

lyparraf19@gmail.com

Introducción: La suplementación de medios de cultivo con Zn se ha estudiado en varias especies, Stephenson y colaboradores (1999), estudió el efecto de la adición de ZnCl₂ en medio de cultivo para fertilización in vitro en bovinos encontrando que con la adición de 10 mg/ml de Zn no afectó la fertilización de los ovocitos, pero usando más altas había inhibición, determinando que con 1mg/ml de adición de Zn ya hay cambios en el ovocito. Lo que sugiere que la inclusión de este mineral puede aumentar las tasas de preñeces por fertilización in vitro y ayuda en la maduración de ovocitos. En humanos no se encuentran reportes de la adición de este ni de ningún mineral al medio de cultivo.

Una rama de la metabolómica se encarga del papel de los microelementos en la maduración ovocitaria. Uno de los más estudiados es el Zinc (Zn), su deficiencia y su toxicidad afectan a todas las especies animales incluyendo al humano, aunque es un mineral traza es esencial para la vida ya que es indispensable para el funcionamiento de más de 300 enzimas, entre ellas la Superóxido Dismutasa, responsable del control de la producción de especies reactivas de oxígeno (Leitch *et al.*, 2009; Sehati *et al.*, 2011). En la parte reproductiva sus efectos son variados la deficiencia puede ocasionar oligozoospermia, alteración en la esteroidogénesis y aumento en la tasa de abortos espontáneos (Lee *et al.*, 2011). En caso de intoxicaciones, la mayoría de los estudios no reportan casos clínicos graves, pero si eventos citotóxicos, García-Contreras (2011) reporta un aumento en la fragmentación de ADN espermático en cerdos alimentados con 200 ppm de Metionato de Zn.

Materiales y Métodos: Se recuperaron del rastro los ovarios de 45 cerdas pre-púberes que fueron llevados al laboratorio en Solución Salina (NaCl 0.9%) a 34°C ± 2. Con el fin de encontrar la concentración útil de Zn, el fluido de folículos preovulatorios se utilizaron para medir la concentración de Zn con un horno de grafito (Perkim Elmer ® P316). Se realizó la digestión de los líquidos foliculares en un microondas de sistema de reacción acelerada MARS 5, utilizando el programa para muestras orgánicas EPA 3051, para su digestión se diluyó 1 ml de líquido folicular con 9 ml de Ácido nítrico. La lectura del Zinc se realizó en un equipo de Absorción atómica Perkim Elmer modelo 3110 y la concentración final fue estimada de acuerdo a las diluciones realizadas.

Se dividieron en dos grupos de 60 Vesículas germinales cada uno: Grupo 1: sin suplementación de Zn (TCM-199) y grupo 2: con la adición de Sulfato de Zn (TCM-199+ Zn 5 mg /mL). Se realizó la incubación por 42 horas y su evaluación se realizó después de haber retirado las células del cumulo con Hialuronidasa al 0.1%, luego fueron teñidas con Hoechst 33342 en microscopio de fluorescencia para evaluar la etapa que alcanzaron: Vesícula germinal (GV), Metafase I (MI), anafase de E / Telofase I (AT1) y la metafase II (MII). Los datos se analizaron mediante un modelo lineal simple y Chi², considerado estadísticamente significativa una p <0.05 (Minitab® 16.0)

Resultados y discusión: La concentración de Zn encontrada en folículos preovulatorios fue 5,29 ± 2,1 mg / ml, por lo cual se determinó 5 mg /mL como dosis única para la suplementación del medio (Tabla 1). Hubo diferencias significativas entre los grupos en cuanto al porcentaje de los estadios de maduración. Grupo 1 y Grupo 2, respectivamente: GV = 0, 40% (P = 0,008), MI = 26,6, 33,3% (P = 0,022), AT1 = 16,6, 17,6% (P = 0,061) y MII = 56.6, 9% (P = 0,005).

Tabla 1. Concentración folicular de Zn medida en horno de grafito.

GRUPO	Zn (pg/μL) (Media/DE)	Volumen (μL) (Media/DE)	Zn por folículo (Media/DE)	P
F1	28,58 (10,25) ^c	146 (43,27) ^b	3,62 (0,78) ^c	0,001
F2	46.82 (17,82) ^a	189 (50,93) ^a	5,54 (1,35) ^b	0,001
F3	32,87 (11,71) ^b	112,27 (28,84) ^c	8,29 (2,1) ^a	0,001

DE: Desviación Estándar de la Media

Estudios realizados en diferentes especies en animales, se han encontrados diferentes concentraciones de Zn en líquido folicular, en vacas se reporta una concentración de 3 μg/ml (Stephenson *et al.*, 1998) y en humanos 0.72 ± 0.12 μg/ml, (Silberstein *et al.*, 2009) nuestros resultados son menores a los encontrados en humanos, aunque este estudio no diferenció entre los distintos folículos, son resultados de una colección del total de líquido presente en un ovario, es posible que la medición individual de folículos por maduración, sea un poco menor como en este estudio.

La estimación que se reportó, es una medida aproximada de la concentración de Zn existente y/o necesaria para que un ovocito madure y sea ovulado, 29.02 µg es la cantidad media de Zn encontrada en folículos F3, estos son considerados preovulatorios. La distinción que se realizó en este estudio, podría dar una aproximación de los requerimientos minerales del ovocito para madurar, esenciales para medios de cultivo por estadio de maduración.

Los efectos de la suplementación de Zn en la producción in vitro de embriones son variadas, un estudio realizado con efectos de la suplementación con magnesio, encontraron que este inhibió la formación de MetafaseII, inhibiendo la calmodulina interfiriendo con la actividad de la quinasa en los ovocitos, y debido a su semejanza al Zn, un estudio hecho con Zinc también inhibió esta fase con la adición de 10mg/ml, en vacas (Stephenson et al., 1998). Otros efectos reportados es debido a un antagonismo con el Calcio este se encuentra en las uniones de la células del cúmulo, si el Zn no se encontrar en las concentraciones adecuadas estas inhibirían o dificultaría la entrada del espermatozoide en el momento de la fecundación y por ende perdidas de embriones (Bernhardt et al., 2011)

Conclusiones: Si bien los estudios en cualquier especie sobre metabolómica aplicada en medios de cultivos de maduración, son nulas, los resultados en tasas de recuperación y de preñez son de prometedor futuro, el aumento en la tasa de maduración sobre todo ovocitaria serán temas de investigación, aun mas cuando se considere realizar estos experimentos en células humanas. Son necesarios más estudios para determinar las concentraciones de Zn necesarias de cada estadio de maduración del ovocito, para que *in vitro*, se pueda suplementar y así aumentar la tasa de recuperación embrionaria. Además, hay que reflexionar sobre el uso actual de medios que no contemplan al embrión como único, pudiendo ser insuficientes los nutrientes para la maduración sea la causa de las bajas tasa de recuperación y de implantación. Cada folículo, dependiendo de su estadio de maduración tiene requerimientos distintos de Zn.

Referencias bibliográficas:

1. Bedwal, R., Bahuguna, A., 1994. Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia* 50, 626-640.
2. Bernhardt, M.L., Kim, A.M., O'Halloran, T.V., Woodruff, T.K., 2011. Zinc Requirement During Meiosis I–Meiosis II Transition in Mouse Oocytes Is Independent of the MOS-MAPK Pathway. *Biology of Reproduction* 84, 526-536.

3. García Contreras, A.d.C., 2011. Efecto de la fuente y nivel de zinc en la morfometría testicular y epididimaria, así como su relación con la producción y calidad seminal del verraco, Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.

4. Klug, A., 2010. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annual Review of Biochemistry* 79, 213-231.

5. Lee, J., Hirsh, A.S., Wittner, B.S., Maeder, M.L., Singavarapu, R., Lang, M., Janarthanan, S., McDermott, U., Yajnik, V., Ramaswamy, S., 2011. Induction of stable drug resistance in human breast cancer cells using a combinatorial zinc finger transcription factor library. *PLoS one* 6, e21112.

6. Leitch, J.M., Yick, P.J., Culotta, V.C., 2009. The right to choose: multiple pathways for activating copper, zinc superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 284, 24679-24683.

7. Sehati, S., Clement, M.H., Martins, J., Xu, L., Longo, V.D., Valentine, J.S., Gralla, E.B., 2011. Metabolic alterations in yeast lacking copper–zinc superoxide dismutase. *Free Radical Biology and Medicine* 50, 1591-1598.

8. Silberstein, T., Saphier, O., Paz-Tal, O., Gonzalez, L., Keefe, D.L., Trimarchi, J.R., 2009. Trace element concentrations in follicular fluid of small follicles differ from those in blood serum, and may represent long-term exposure. *Fertility and sterility* 91, 1771-1774.

9. Stephenson, J.L., Brackett, B., 1999. Influences of zinc on fertilisation and development of bovine oocytes in vitro. *Zygote* 7, 195-201.