



Efeitos da melatonina exógena na viabilidade embrionária e no ambiente uterino de ovelhas

Effects of exogenous melatonin on embryo viability and uterine environment of ewes

María Isabel Vázquez

Unidad Académica de Reproducción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Libertad, SJ, Uruguay. Instituto de Ciencias Veterinarias, INCIVET, Río Cuarto, Cba., Argentina.

Resumo

O objetivo deste artigo é revisar o efeito da melatonina na viabilidade embrionária e ambiente uterino em ovinos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, considerando as vias pelas quais esse hormônio pode ter influência no embrião ou o mecanismo de reconhecimento materno e estabelecimento de gravidez em ovelhas.

Palavra-Chave: melatonina, embrión, útero, oveja

Abstract

The aim of this article is to review the effect of melatonin on embryo viability and uterine environment in sheep, both *in vivo* and *in vitro*, considering the pathways by which this hormone could have influences at the embryo or the mechanism of maternal recognition and establishment of pregnancy in sheep.

Keywords: melatonin, embryo, uterus, ewe

Introducción

El establecimiento y mantenimiento de la gestación es un proceso que integra una multitud de eventos morfo-fisiológicos, endocrinológicos e inmunológicos, entre los principales; que involucran una comunicación muy estrecha entre el embrión y el ambiente uterino. El conocimiento de estos eventos y de los factores que intervienen en esta comunicación materno-embionaria, ha permitido en los últimos años intentar mejorar la viabilidad embrionaria a través de diferentes técnicas y herramientas de manejo nutricional, reproductivo, genéticas, ambientales y/o sanitarias, con el objetivo de aumentar la eficiencia reproductiva y, en consecuencia, la eficiencia productiva de los sistemas.

Es difícil encontrar una tasa de preñez óptima que incluya tanto ovejas como vacas, cuando hablamos de gestación en rumiantes. Y si habláramos de vacas únicamente, ciertamente no sería lo mismo vaca de cría que vaca lechera, a su vez, entre las vacas lecheras también deberíamos distinguir si hablamos de vacas en lactancia o no, ya que los factores que provocan las fallas reproductivas tienen diferente impacto según el estado fisiológico y/o etapa del ciclo productivo en que se encuentre la vaca. Sin embargo, hay un increíble y amplio consenso en la literatura científica de este tema cuando se refiere al momento en que las pérdidas embrionarias ocurren: entre el 25 y el 40% de las pérdidas embrionarias son observadas durante las 3 primeras semanas de gestación (período embrionario) (Hansen, 2011).

Esto nos indica que existe una relación muy estrecha entre la eficiencia reproductiva y la viabilidad embrionaria durante los primeros días tras la fecundación. Por ello, para mejorar la eficiencia reproductiva en las ovejas, debemos enfocarnos en mejorar la supervivencia de los embriones durante las primeras semanas de gestación. Al respecto, existen varios factores externos e internos que influyen sobre la eficiencia reproductiva del ganado ovino. Dentro de los factores externos, los dos más importantes parecen ser la estacionalidad reproductiva y la nutrición. A su vez, dentro de los factores internos nos vamos a enfocar en el ambiente uterino que es donde se desarrolla el embrión durante las etapas más críticas y susceptibles de la gestación (Spencer y Bazer, 1995; Senger, 2005).

Ambiente uterino

Desde el momento en que se produce la ovulación, la LH es la hormona encargada de la formación y mantenimiento del CL (Niswender et al., 1981). Las células de la teca interna y las células de la granulosa del folículo ovulatorio sufren una gradual y rápida transformación en tejido luteal (luteinización) dando



lugar a la estructura denominada cuerpo lúteo, que será quien produzca y secrete P4. Dicha hormona prepara el útero para la implantación del embrión y el mantenimiento de la gestación (Hafez, 1989); para ello, la P4 ejerce un efecto inhibitorio a nivel de la secreción de GnRH en el hipotálamo y de gonadotrofinas (FSH y LH) en la hipófisis. Si la fecundación no se lleva a cabo, se producirá la regresión del CL, con el consiguiente cese en la producción de P4 para permitir el comienzo de un nuevo ciclo estral. La luteólisis tiene lugar al final de la fase luteal y está controlada principalmente por la prostaglandina (PG) F2 α producida por el endometrio (Wathes y Lamming, 1995).

Durante el celo y los primeros días de gestación ocurren alteraciones estructurales (modificaciones en la altura, forma y secreción de las células) a lo largo de todo el oviducto (Murray, 1995). El endometrio también sufre una serie de transformaciones cíclicas en respuesta a la fluctuación de los niveles sanguíneos de las hormonas ováricas (Hafez, 1996). De esta manera, la progesterona y los estrógenos secretados por el ovario, se unen a sus receptores específicos (RP y RE, respectivamente) de localización nuclear, a fin de modular los cambios cíclicos que se producen a nivel de útero. Existen dos tipos de RE: RE α y RE β , pero los primeros son los predominantes en el tracto reproductivo (Meikle et al, 2004). Los estrógenos (E) producen un notable crecimiento uterino. Durante la fase folicular, las glándulas crecen, penetran profundamente en el estroma y comienzan a enrollarse, pero su capacidad secretoria plena se da bajo la influencia de la P4 (Niswender y Nett, 1994). Las glándulas uterinas sufren una marcada hiperplasia e hipertrofia durante la gestación (Gray et al., 2001). El desarrollo y la función del útero dependen de interacciones entre el epitelio y el estroma (Gray et al., 2001). El estroma dirige el desarrollo epitelial, mientras que el epitelio influye en la organización del endometrio y en la diferenciación del miometrio (Cunha et al., 1989; Gray et al., 2001). La P4 actúa en el útero asegurando su quiescencia y estimulando y manteniendo las funciones secretorias endometriales esenciales para el desarrollo temprano del embrión, la implantación, la placentación y el correcto desarrollo feto-placentario hasta el término de la gestación (Graham y Clarke, 1997).

La sensibilidad de un tejido a una hormona determinada depende de la expresión de los receptores específicos en dicho tejido (Clark et al., 1992). La modulación de la concentración de estas proteínas constituye el paso más probable en el control de las respuestas celulares (Clark y Mani, 1994). Las hormonas esteroideas ováricas son importantes moduladoras de sus propios receptores. La concentración de los receptores

esteroideos en el tracto reproductivo de la hembra ha sido estudiada clásicamente en el útero y está demostrado que varía a lo largo del ciclo estral de la oveja (Miller et al., 1977). El Estradiol 17 β (E2), es el más importante de los E debido a su potencia biológica, estimula la síntesis de su propio receptor, así como también la del RP, mientras que la P4 provoca la regulación a la baja (o *downregulation*) de ambos receptores (Clark y Mani, 1994). De esta manera, la concentración uterina de los RP y RE presenta valores máximos

alrededor del celo como respuesta a la acción estimuladora de los E y mínimos durante la fase luteal tardía debido a la acción inhibitoria de la P4 (Miller et al., 1977).

En el caso en que la fecundación si se produzca, tendrá lugar un mecanismo de señalización entre el embrión, el endometrio y el ovario a fin de evitar la regresión del CL, asegurando de esta manera la producción y secreción de P4, lo que favorece el desarrollo temprano del embrión.

Desde el momento en que se produce la fecundación, el ambiente reproductivo materno sufre transformaciones que deberán estar en total sincronía con el desarrollo del embrión para lograr llevar a término dicha gestación (Martal et al., 1997), de lo contrario aumentaría la incidencia de la mortalidad embrionaria (Roche et al., 1981).

Por ello, es el propio embrión el encargado de iniciar los mecanismos que señalan su presencia en el útero y que evitan la regresión del CL. Dicho proceso se ha denominado reconocimiento materno de la gestación (Short, 1969) y se caracteriza por que el embrión se alarga, aumenta de tamaño y secreta hacia el lumen uterino una proteína de la familia de los interferones (IFN) llamada IFN- τ , que tiene como función evitar el desencadenamiento de la luteólisis. Por lo tanto, la elongación del embrión y su producción de IFN- τ son eventos críticos para inhibir los mecanismos de la luteólisis, y por ende, favorecer la producción de P4 por el CL, asegurándose la continuidad del desarrollo embrionario (Spencer et al., 2004).

Efectos de la melatonina en el cuerpo lúteo y la secreción de P4.

Durotoye et al. (1997) han demostrado un efecto directo de la melatonina sobre el cuerpo lúteo (CL) para incrementar la producción de P4. Además, observaron que la melatonina significativamente estimuló la producción de P4 de las células de la granulosa, después de dos días de cultivo *in vitro*, aunque



el grado de respuesta dependió del tamaño de los folículos originarios de esas células (in vitro). Estos resultados demostraron que la melatonina puede actuar directamente en el CL para aumentar la producción de P4 y puede explicar las mejoras encontradas en la función luteal al final de la estación reproductiva, al utilizar efecto macho, en ovejas tratadas con implantes de melatonina exógena, cíclicas y no-cíclicas, que tuvieron concentraciones plasmáticas de P4 más elevadas que las ovejas no tratadas (Abecia et al., 2006). En otro estudio, se obtuvieron resultados similares de este efecto luteotrófico en ovejas implantadas con melatonina respecto de las ovejas controles (Vázquez et al., 2010). Evidencia adicional del efecto de la melatonina sobre la secreción de P4 fue reportada por Manca et al. (2014), quienes compararon el área media de CL y los niveles de progesterona plasmática provenientes de ovejas pinealectomizadas o controles con cirugía “simulada”, donde estas últimas presentaron niveles significativamente mayores que el grupo pinealectomizado. Todos estos datos sugieren que la melatonina tiene influencia sobre el patrón de desarrollo folicular y la capacidad esteroidogénica del cuerpo lúteo.

Efectos de la melatonina en el útero y oviducto.

Varios autores han enfocado su trabajo en los efectos de la melatonina en el útero, tanto en la población de receptores uterinos, en la secreción de PGF2 α e incluso en la hemodinámica útero-placentaria durante la gestación. Al respecto, Gimeno et al. (1980) reportaron que la melatonina, *in vitro*, bloquea la producción de PGF2 α por el útero. Ovejas tratadas con melatonina durante el anestro tuvieron niveles más altos de progesterona plasmática durante la fase lútea inducida por efecto macho, comparada con las ovejas no tratadas (Abecia et al., 2006), lo cual podría estar reflejando una fuerte regulación de la expresión de receptores de progesterona (RP) en el grupo implantado con melatonina. Considerando que, se ha reportado el hallazgo de receptores de melatonina regulados por esteroides en úteros de ratas (Zhao et al., 2000; 2002), un rol de la melatonina en la fisiología endometrial podría ser explicado a través de cambios en los receptores esteroideos del útero. En este sentido, hemos sido los primeros en reportar que el tratamiento con melatonina induce cambios en la sensibilidad endometrial de los esteroides en ovejas subnutridas, ya que observamos un aumento en la expresión de RP en el epitelio glandular profundo acompañado de una disminución de la expresión de receptor de estrógenos (RE) en el estroma profundo del endometrio de ovejas subnutridas tratadas con melatonina. Aunque en general, ni la melatonina ni el tratamiento nutricional tuvieron un efecto en la expresión de RE y RP durante el anestro estacional (Vázquez et al., 2013). Cabe destacar que, las ovejas subnutridas y con implante de melatonina estuvieron asociadas a tasas de viabilidad embrionaria más altas durante el anestro (Vázquez et al., 2013). Además, el tratamiento con melatonina tendió a aumentar el porcentaje de células positivas a PR en el epitelio glandular profundo y la mayor intensidad de tinción de PR se observó en el epitelio glandular luminal y superficial (Vázquez et al., 2013). También, nuestros resultados determinaron que la expresión de la transcripción del ARNm de PR tendía a ser mayor en la estación reproductiva (ER) que en el anestro estacional (AE) ($P = 0.08$) y era menor en las ovejas tratadas con melatonina en comparación con las no tratadas ($P < 0.01$). Esto fue evidente durante la ER tanto en el control como en las ovejas subnutridas ($P < 0.05$). La expresión de ER α también tendió ($P = 0.09$) a ser mayor en el ER que en el AE. No se encontraron efectos de la estación, la nutrición, la melatonina y su interacción para la expresión de IGF-I. Aunque, la expresión de IGF-II e IGF1R fue afectada por la melatonina y su interacción con la nutrición ($P < 0.01$) (Datos no publicados).

A nivel de oviductos, la melatonina exógena no tuvo efecto sobre la expresión de ARNm de PR y ER α , pero aumentó el IGF-I y el IGF-II, principalmente en ovejas subnutridas ($P < 0.05$). Curiosamente, la melatonina también mejoró la viabilidad embrionaria tanto en ovejas control como subnutridas (Vázquez et al., 2009). Por lo tanto, se podría plantear la hipótesis de que la melatonina podría ser parte de un mecanismo compensatorio para aumentar la supervivencia de los embriones en ovejas subnutridas, a través de la mejora del medio oviductal (Vázquez et al., 2018). En la actualidad y hasta donde sabemos, esta fue la primera vez que estos parámetros se evaluaron en el endometrio y en los oviductos de ovejas, durante la estación reproductiva y el anestro estacional.

Estudios adicionales son necesarios para lograr un mejor entendimiento de los mecanismos reguladores y/o moduladores a través de los cuales la melatonina colabora con la supervivencia embrionaria durante las etapas iniciales de la gestación, las cuales marcan un momento crítico en el que actúan los factores que pueden comprometer el desarrollo embrionario.

Agradecimientos

Al Comité Organizador de esta edición CBRA por la invitación a compartir nuestro trabajo en este



Congreso.

Referencias

- Abecia JA, Sosa C, Forcada F, Meikle A.** The effect of undernutrition on the establishment of pregnancy in the ewe. *Reprod Nutr Dev*, 46, 367-378, 2006.
- Clark JH, Schrader WT, O'malley BW.** Mechanisms of steroid hormones action. In "Textbook of Endocrinology", pp. 35-90. Eds Wilson, J.D. y Foster, D.W. W. B Saunders: Philadelphia, USA, 1992.
- Clark JH, Mani SK.** Actions of ovarian steroid hormones. In "The Physiology of Reproduction". pp. 1011-1046. Eds Knobil, E. y Neill, J.D. Raven Press: New York, USA, 1994.
- Cunha GR, Young P, Brody JR.** Role of uterine epithelium in the development of myometrial smooth muscle cells. *Biology of Reproduction*, 40, 861- 871, 1989.
- Durotoye LA, Webley GE, Rodway RG.** Stimulation of the production of progesterone by the corpus luteum of the ewe by the perfusion of melatonin in vivo and by treatment of granulosa cells with melatonin in vitro. *Res Vet Sci*, 62, 87-91, 1997.
- Gimeno MF, Fuentes AM, Landa A, Sterinspeziale N, Cardinali DP, Gimeno AL.** Melatonin – inhibitor of prostaglandin release. *Acta Physiol Latinoamer*, 30, 38–39, 1980.
- Graham JD, Clarke CL.** Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. *Endocr Rev*, 18, 502-519, 1997.
- Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE.** Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod*, 65, 1311-23, 2001.
- Hafez ES.** Anatomía del aparato reproductor femenino. In "Reproducción e inseminación artificial en animales", pp. 20-52. Interamericana-McGraw Hill, Madrid, España, 1996.
- Hansen PJ.** Challenges to fertility in dairy cattle: from ovulation to the fetal stage of pregnancy. *Rev Bras Reprod. Anim*, v.35, n.2, p.229-238, 2011.
- Manca ME, Manunta ML, Spezzigu A, Torres-Rovira L, Gonzalez-Bulnes A, Pasciu V, Piu P, Leoni GG, Succu S, Chesneau D, Naitana S, Berlinguer F.** Melatonin deprivation modifies follicular and corpus luteal growth dynamics in a sheep model. *Reproduction* 147, 885–895, 2014.
- Martal J, Chene N, Camous S, Huynh L, Lantier F, Hermier P, L'haridon R, Charpigny G, Charlier M, Chaouat G.** Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN-tau and other cytokines in early pregnancy. *Reprod Fertil Dev*, 9, 355-80, 1997.
- Meikle A, Tasende C, Sosa C, Garofalo EG.** The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. *Reprod. Fertil. Dev*, 16, 385-94, 2004.
- Miller BG, Murphy L, Stone GM.** Hormone receptor levels and hormone, RNA and protein metabolism in the genital tract during the oestrous cycle of the ewe. *Journal of Endocrinology* 73, 91-98, 1977.
- Murray MK.** Epithelial lining of the sheep ampulla oviduct undergoes pregnancy associated morphological changes in secretory status and cell height. *Biol Reprod*, 53, 653-663, 1995.
- Niswender GD, Suter DE, Sawyer HR.** Factors regulating receptors for LH on ovine luteal cells. *J Reprod Fertil Suppl*, 30, 183-189, 1981.
- Niswender GD, Nett TM.** Corpus luteum and its control in infraprimates species. In "The Physiology of Reproduction", pp. 781- 816. Eds Knobil, E. y Neill, J.D. Raven Press, New York, USA, 1994.
- Roche JF, Boland MP, Mcgeady TA.** Reproductive wastage following artificial insemination of heifers. *Vet Rec*, 109, 401-404, 1981.
- Senger PL.** Pathways to pregnancy and parturition. 2nd revised edition, Current Conceptions, Inc., USA, 2003.
- Short RV.** Implantation and the maternal recognition of pregnancy. In "Ciba Foundation Symposium on Foetal Autonomy", pp. 2-26. Eds Wolstenholm, G.E.W. y O'Connor, M. Churchill Livingstone, London, England, 1969.
- Spencer TE, Bazer WT.** Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biology of Reproduction*, 53, 1527-43, 1995.
- Spencer TE, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW.** Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 537-50, 2004.
- Vázquez MI, Forcada F, Casao A, Sosa C, Palacín I, Abecia JA.** Effects of melatonin and undernutrition on the viability of ovine embryos during anestrus and the breeding season. *Anim Reprod Sci*, 112, 83–94, 2009.
- Vázquez MI, Abecia JA, Forcada F, Casao A.** Effects of exogenous melatonin on *in vivo* embryo viability



and oocyte competence of undernourished ewes after weaning during the seasonal anestrus. *Theriogenology*, 74, 618–626, 2010.

Vázquez MI, Forcada F, Sosa C, Casao A, Sartore I, Fernandez-Foren A, Meikle A, Abecia JA. Effect of exogenous melatonin on embryo viability and uterine environment in undernourished ewes. *Anim Reprod Sci*, 141, (1-2), 52-61, 2013.

Vázquez MI, Sosa C, Carriquiry M, Forcada F, Meikle A, Abecia JA. Exogenous melatonin changes oviductal gene expression in pregnant undernourished ewes during the anestrus season. VII International Symposium on Animal Biology of Reproduction, November 6-9, Aracaju, SE, Brazil, 2018.

Wathes DC, Lamming GE. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl*, 49, 53-67, 1995.

Zhao H, Poon AM, Pang SF. Pharmacological characterization, molecular subtyping, and autoradiographic localization of putative melatonin receptors in uterine endometrium of estrous rats. *Life Sci*, 66, 1581–1591, 2000.

Zhao H, Pang SF, Poon AM. Variations of mt1 melatonin receptor density in the rat uterus during decidualization, the estrous cycle and in response to exogenous steroid treatment. *J Pineal Res*, 33, 140–145, 2002.
