

R-236 Rev. Cientif. FCV-LUZ, XXXIII, SE, 273-274, 2023, <https://doi.org/10.52973/rcfcv-wbc119>

Effect of supplementing epinephrine in maturation media on the developmental competence of buffalo oocytes

**Ali Husnain^{1*}, Abdul Khaliq¹, Talha Ashraf¹,
Abdul Rehman¹, Muhammad Yasir Zahoor²,
Muhammad Binyameen³, Amjad Riaz¹**

¹ Department of Theriogenology

² Institute of Biochemistry and Biotechnology, University of Veterinary and Animal Sciences, Lahore, Pakistan,

³ Reproduction Division, Buffalo Research Institute, Pattoki, Pakistan

*Corresponding author: ali.husnain@uvas.edu.pk

ABSTRACT

Epinephrine is a catecholamine that plays a vital role during cellular stress by scavenging free radicals. During *in*

Efecto de la suplementación con epinefrina en los medios de maduración sobre la competencia de desarrollo de los ovocitos de búfala

**Ali Husnain^{1*}, Abdul Khaliq¹, Talha Ashraf¹,
Abdul Rehman¹, Muhammad Yasir Zahoor²,
Muhammad Binyameen³, Amjad Riaz¹**

¹ Departamento de Teriogenología,

² Instituto de Bioquímica y Biotecnología, Universidad de Ciencias Veterinarias y Animales, Lahore, Pakistán,

³ División de Reproducción, Instituto de Investigación Buffalo, Pattoki, Pakistán

*Autor de correspondencia: Ali Husnain (ali.husnain@uvas.edu.pk)

RESUMEN

La epinefrina es una catecolamina que desempeña un papel vital durante el estrés celular al eliminar los radicales li-

in vitro maturation, oocytes experience stressful conditions that likely compromise their development. The objective of the experiment was to investigate the effect of the addition of epinephrine in IVM media on nuclear maturation and *in vitro* developmental competence of oocytes. Buffalo oocytes were harvested from slaughterhouse ovaries. Oocytes of A and B grade were matured for 24 hours in IVM media supplemented with increasing concentrations of epinephrine 0, 0.01, 1.0, and 100 μ M. The maturation of oocytes was examined based on the nuclear maturation after staining with Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). After maturing with epinephrine, oocytes were fertilized for 6 hours with post-thawed semen from a single bull. Presumptive zygotes were cultured in commercial media (IVF Bioscience, Falmouth, UK), and cleavage was observed 48 hours after fertilization. The blastocyst rate was assessed on day 7 of the culture. Maturation and fertilization media were prepared in-house. Blastomere was counted from the hatched blastocyst after staining with Hoechst 33342 using an inverted microscope equipped with Cellsens software. The data was analyzed using the GLIMMIX procedures of SAS. The statistical model included the fixed effect of treatment and random replication. Orthogonal polynomial contrasts were built to assess the dose-response of epinephrine. Results represented as least square means and respective standard error of means (LSM \pm SEM). Adding epinephrine to the maturation media did not affect the nuclear maturation and cleavage. Media supplemented with epinephrine at 0, 0.01, 1.0, and 100 μ M concentrations had a proportion of meiotic I and II oocytes of 83.1 ± 6.0 , 85.5 ± 6.3 , 75.3 ± 5.9 , and $70.9 \pm 6.4\%$ and cleavage rate of 58.2 ± 4.6 , 60.5 ± 4.6 , 54.7 ± 4.5 , and $47.8 \pm 4.4\%$ respectively. However, the proportion of blastocyst out of matured oocytes was increased ($p=0.01$; 35.9 ± 4.5 , 43.2 ± 4.8 , 36.0 ± 4.3 , and $25.8 \pm 3.8\%$) with epinephrine supplementation and the response was maximized (Quadratic effect; $p=0.01$) at 0.01 μ M concentration. Consistently, the proportion of blastocyst out of cleaved embryos tended to increase ($p=0.13$; 62.1 ± 5.0 , 72.4 ± 4.6 , 66.7 ± 4.7 , and $55.3 \pm 5.3\%$) with epinephrine and the response was maximized (Quadratic effect; $p=0.04$) at 0.01 μ M concentration. Supplementation of epinephrine in maturation media increased ($p<0.01$) the blastomere number, and response was maximized (Quadratic effect; $p<0.01$) at 1.0 μ M concentration. It is concluded that supplementing epinephrine in maturation media had a favorable effect on the blastocyst formation, and significant benefits were observed at 0.01 μ M concentration.

Keywords: epinephrine, oocyte, maturation, cleavage rate, blastocyst.

Durante la maduración *in vitro*, los ovocitos experimentan condiciones estresantes que probablemente comprometan su desarrollo. El objetivo del experimento fue investigar el efecto de la adición de epinefrina en medios de maduración *in vitro* (IVM) sobre la maduración nuclear y la competencia de desarrollo *in vitro* de los ovocitos. Los ovocitos de búfalos se recolectaron de ovarios de matadero. Se maduraron ovocitos de grado A y B durante 24 horas en medio IVM suplementado con concentraciones crecientes de epinefrina 0, 0,01, 1,0 y 100 μ M. La maduración de los ovocitos se examinó en función de la maduración nuclear después de la tinción con Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Después de madurar con epinefrina, los ovocitos fueron fertilizados durante 6 horas con semen postdescongelado de un solo toro. Se cultivaron presuntos cigotos en medios comerciales (IVF Bioscience, Falmouth, Reino Unido) y se observó la escisión 48 horas después de la fertilización. La tasa de blastocistos se evaluó el día 7 del cultivo. Los medios de maduración y fertilización se prepararon internamente. Se contó el número de blastómeras a partir del blastocisto eclosionado después de tefir con Hoechst 33342 utilizando un microscopio invertido equipado con el software Cellsens. Los datos se analizaron utilizando los procedimientos GLIMMIX de SAS. El modelo estadístico incluyó el efecto fijo del tratamiento y la replicación aleatoria. Se construyeron contrastes polinomiales ortogonales para evaluar la dosis-respuesta de epinefrina. Los resultados se representan como medias de mínimos cuadrados y el respectivo error estándar de medias (LSM \pm SEM). La adición de epinefrina a los medios de maduración no afectó la maduración y escisión nuclear. Los medios suplementados con epinefrina a concentraciones de 0, 0,01, 1,0 y 100 μ M tuvieron una proporción de ovocitos meióticos I y II de $83,1\pm 6,0$, $85,5\pm 6,3$, $75,3\pm 5,9$ y $70,9\pm 6,4\%$ y una tasa de escisión de $58,2\pm 4,6$, $60,5\pm 4,6$, $54,7\pm 4,5$ y $47,8\pm 4,4\%$, respectivamente. Sin embargo, la proporción de blastocistos a partir de los ovocitos maduros aumentó ($p=0,01$; $35,9\pm 4,5$, $43,2\pm 4,8$, $36,0\pm 4,3$ y $25,8\pm 3,8\%$) con la suplementación con epinefrina y la respuesta se maximizó (efecto cuadrático; $p=0,01$) a una concentración de 0,01 μ M. Consistentemente, la proporción de blastocistos de los embriones escindidos tendió a aumentar ($p=0,13$; $62,1\pm 5,0$, $72,4\pm 4,6$, $66,7\pm 4,7$ y $55,3\pm 5,3\%$) con epinefrina y la respuesta se maximizó (efecto cuadrático; $p=0,04$) a una concentración de 0,01 μ M. La suplementación con epinefrina en los medios de maduración aumentó ($p<0,01$) el número de blastómeros y la respuesta se maximizó (efecto cuadrático; $p<0,01$) a una concentración de 1,0 μ M. Se concluye que la suplementación con epinefrina en los medios de maduración tuvo un efecto favorable sobre la formación de blastocistos y se observaron beneficios significativos a una concentración de 0,01 μ M.

Palabras clave: epinefrina, ovocito, maduración, tasa de escisión, blastocisto.