

CAPACIDAD DE MADURACION IN VITRO DE OVOCITOS OBTENIDOS DE FOLICULOS DE TRES TAMAÑOS DIFERENTES EN BOVINOS

In vitro maturation competence of bovine oocytes from three different follicular sizes

G.T. Segura¹, J.V.Cortez¹, I.S.Cayo^{1,2}

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.24>

¹ *Laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético.*

² *Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agro negocios y Biotecnología, Instituto de investigación en Ganadería y Biotecnología, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, Chachapoyas, Amazonas, Perú.*

E-mail:
tatiana.segura@untrm.edu.pe

RESUMEN

El diámetro folicular y la capacidad meiótica están relacionadas con el potencial de desarrollo embrionario. Nuestro trabajo, tiene como objetivo evaluar la capacidad de maduración *in vitro* de ovocitos obtenidos de tres tamaños foliculares de ovarios bovinos colectados en un matadero local. Los ovarios fueron trasladados al laboratorio en un recipiente isotérmico. Previa a la aspiración del líquido folicular, estas fueron clasificadas según tamaño (diámetro de folículo) en tres grupos (1-2mm, 3-4mm y 5-6mm). Los primeros 30 ovocitos de cada grupo fueron utilizados para determinar el diámetro de los ovocitos, según grupo de tamaño folicular. Los siguientes fueron madurados en medio por 24 horas en una atmósfera húmeda, 5% CO₂ y 38.5°C. En conclusión, se demostró que no existe relación entre el diámetro del ovocito y el diámetro folicular, además los ovocitos procedentes de folículos de 1-2 y 3-4mm presentaron mayor competencia meiótica.

Palabras clave: *Competencia meiótica, tamaño folicular, maduración in vitro.*

ABSTRACT

Follicular diameter and meiotic competence are associated with the developmental competence. The objective of our research was to evaluate the maturation capacity *in vitro* of oocytes harvested from three different follicular sizes from bovine ovaries collected from a local abattoir. The ovaries were transported in an isothermal recipient. Before the follicular aspiration, they were classified in three groups according to the size (follicular diameter: 1-2mm, 3-4mm and 5-6mm). The first group of

thirty oocytes from each follicular size were used to determine the oocyte diameter. Another group was *in vitro* matured for 24 hours in a humidified atmosphere, 5% CO₂ and 38.5 oC. In conclusion, there was no relation between the oocyte and follicle diameter. Moreover, oocytes from 1-2 and 3-4mm showed higher meiotic competence.

Keywords: *Meiotic competence, follicular diameter, in vitro maturation.*

INTRODUCCION.

La demanda de alimentos y la conservación de especies en extinción son la base del uso de las biotecnologías reproductivas, entre las que destacan; maduración, fecundación y cultivo *in vitro* (MIV, FIV y CIV, respectivamente). Estas tres técnicas, han sido usadas como herramientas para hacer más eficiente el uso del pool de ovocitos existentes en el ovario de los bovinos debido a que del total de óvulos en estado de quiescencia, menos del 1% llegan a generar un ternero nacido. Más aún, las tasas de embriones logrados con las herramientas *in vitro*, aún continúan siendo bajas. La obtención *in vitro* de embriones generalmente se ha logrado a partir de folículos que van desde 1-8mm en diámetro (Yang *et al.*, 1998). En suma a ello, investigaciones reportan que los ovocitos adquieren la competencia meiótica cuando alcanzan diámetros superiores a 110 μm , correspondiente a diámetros foliculares entre 2-3mm (Crozet *et al.*, 1981). Sin embargo, la caracterización de los ovocitos por cada diámetro folicular, así como su competencia meiótica y el potencial de desarrollo embrionario, requieren ser investigados. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la capacidad de maduración *in vitro* de ovocitos obtenidos de tres tamaños foliculares de ovarios de matadero en bovino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aspiración, medición y selección de los complejos ovocito-cúmulus

Todos los medios y reactivos usados fueron de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) a menos que se señale lo contrario. Se transportaron ovarios del centro de beneficio de Chachapoyas-Amazonas, en un recipiente isotérmico conteniendo cloruro de sodio al 0.9% (wt/vol) con 0.025 mg/ml de estreptomycin, temperado a 37 °C. En el laboratorio, los ovarios fueron nuevamente lavados en cloruro de sodio al 0.9%. Luego, se aspiraron los complejos ovocito-cúmulus (COCs) usando una jeringa de 10ml y una aguja de 18 G con medio de manipulación HEPES suplementado con 50 mg/ml de gentamicina y 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (SFB).

Los COCs fueron aspirados separadamente a partir de tres tamaños foliculares de la superficie del ovario; 1-2, 3-4 y 5-6mm, los cuáles fueron medidos con una regla. Luego de tres lavados, se midió por cada grupo el diámetro del ovocito; desnudado previamente con 0.5mg/ml de hialuronidasa (el diámetro excluyó la zona pelúcida), con ayuda de un software con cámara (Olympus, Japón) adherida a un microscopio invertido (Olympus, Japón). La clasificación de los COCs por

grupo se realizó en cuatro categorías, dependiendo de la presencia y calidad de las células del cúmulus, la coloración y forma del óvulo (Liebfried y First., 1979; Sato *et al.*, 1990).

Maduración *in vitro* de los complejos ovocito-cúmulus Los COCs de otro lote de ovarios fueron usados para este experimento, siguiendo el procedimiento de aspiración y lavado descrito previamente. Los grupos de COCs según procedencia de tamaño folicular fueron clasificados de forma similar a lo descrito previamente, para posteriormente ser cultivados *in vitro* separadamente por 24 horas en una atmósfera humidificada con 5% CO_2 a 38.5 °C, en placas de 4 celdas (NUNC, USA) en medio de maduración TCM-199 suplementado con 0.25 mg/ml de piruvato de sodio, 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, 0.01UI/ml de hormona foliculo estimulante (FSH), 0.01UI/ml de hormona luteinizante (LH), 0.1mg/ml de glutamina, 10ng/ml factor de crecimiento epidérmico (EGF), 1 $\mu\text{g/ml}$ de 17 β -estradiol y 10% SFB. La estructura nuclear se evaluó con un microscopio binocular (Olympus, Japón) previa fijación de los ovocitos en láminas portaobjeto con ácido acético-etanol (1:3, vol/vol) y teñidos con 1% de aceto-orceína (wt/vol), según lo reportado por Hirao *et al.*, 1995; Motlik y Fulka, 1976).

Los ovocitos fueron clasificados como vesícula germinal (VG) cuando presentaban la membrana nuclear intacta y la cromatina en el nucleoplasma. Los ovocitos fueron clasificados como maduros (metafase II-MII) por la presencia del corpúsculo polar, los cromosomas condensados y la ausencia de la membrana nuclear. Otro grupo de ovocitos fueron seleccionados para continuar el experimento de fecundación *in vitro* post maduración.

Fecundación *in vitro* de los complejos ovocito-cúmulus Para este tercer experimento se usó semen nacional congelado de la raza Holstein. Espermatozoides fueron lavados, seleccionados y capacitados por el método de Percoll (Parrish *et al.*, 1995) y adicionados al medio de fecundación TALP-FIV (Vajta, 2000), suplementado con 0.25 mg/ml de piruvato de sodio, 50 μg de gentamicina, 0.03mg/ml de heparina y 3 mg/ml de suero de albumina bovina factor cinco (BSA-V). Los COCs madurados (Figura 1) y los espermatozoides capacitados se incubaron por 18 horas en una atmósfera humidificada a 38.5°C con 5% CO_2 . A fin de determinar el porcentaje de fecundación, los presuntos cigotos fueron desnudados, fijados y teñidos según lo descrito previamente. La formación de los pronúcleos masculino y femenino fue indicativo de que ocurrió la fecundación (cigoto).

Análisis estadístico

Para determinar la existencia o no de diferencias estadísticas entre los diámetros de los ovocitos por cada tamaño folicular se realizó el análisis de varianza (ANOVA). Para identificar el tamaño folicular que contenga ovocitos con mayor competencia meiótica se usó el post test de TUKEY. En ambos casos el programa estadístico empleado fue el SPSS ver. 19.

RESULTADOS

En la Tabla 1, se observa que no existe diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los diámetros de los ovocitos extraídos de diferentes tamaños foliculares. Además, el número de ovocitos de categoría A (Liebfried y First., 1979; Sato et al., 1990) fue mayor para folículos de diámetro 1-2mm y 3-4mm que para los folículos de 5-6mm.

Tabla 1. Relación entre el tamaño folicular, categoría de los complejos ovocitos-cúmulus (COCs) y diámetro del ovocito

Tamaño Folicular (mm)	N° Ovocitos examinados	Diámetro de ovocitos (μm)
1 a 2mm	30	115, 1 \pm 6,9a
3 a 4mm	30	113, 0 \pm 6,8a
5 a 6mm	30	113, 8 \pm 5,7a

a, b; letras diferentes indica que hay diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

Tabla 2. Competencia meiótica post 24 h de maduración de los complejos ovocitos-cúmulus (COCs) según tamaño folicular

Tamaño Folicular (mm)	N° Ovocitos examinados	Ovocitos en metafase II, n (%)
1 a 2mm	434	385 (89.0)a
3 a 4mm	86	73 (85.0)a
5 a 6mm	12	3 (25.0)b

a, b; letras diferentes indica que hay diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

La competencia meiótica de los ovocitos por tamaño folicular fue evaluada en otro grupo de ovocitos colectados. La Figura 1 y Tabla 2 muestran que los ovocitos de tamaños foliculares de 1-2mm y 3-4mm presentaron significativamente mayor competencia meiótica que aquellos procedentes de los folículos de 5-6mm, logrando un porcentaje de maduración de 89, 85 y 25%, respectivamente.

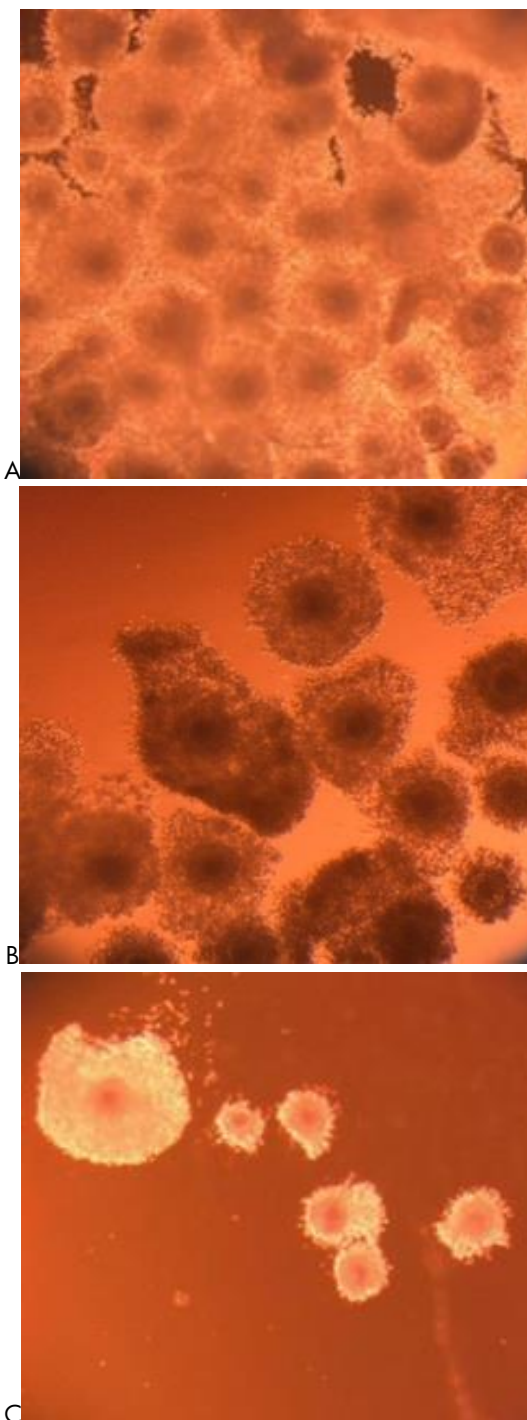


Figura 1. Ovocitos madurados *in vitro*. A. Ovocitos maduros de tamaño folicular de 1-2mm. B. Ovocitos maduros de tamaño folicular de 3-4mm y C. Ovocitos maduros de tamaño folicular de 5-6mm

DISCUSION

Lonergan *et al.* (1994) reportaron que los ovocitos con mayor cantidad de capas de células de cúmulus y con una mayor capacidad para la formación de blastocistos proceden de aquellos folículos mayores a

6mm. Además, se ha establecido que a mayor tamaño folicular, la competencia meiótica y de desarrollo embrionario es mejor (Blondin y Sirard, 1995).

En nuestro estudio se encontró que los diámetros promedios fueron similares en los tres grupos de tamaño folicular. Lo que demuestra que estos ovocitos de folículos pequeños (1-2mm) han completado su fase de crecimiento. En suma a ello, se observó que los ovocitos con mayor competencia meiótica proceden de folículos de 1-2mm y 3-4mm. Este resultado podría deberse a que los folículos de mayor tamaño en nuestro experimento, pueden contener ovocitos en estado de degeneración, ya que las condiciones nutricionales, ambientales y de manejo son pobres en la región de Amazonas y además, se ha demostrado que estos factores tienen influencia sobre el estado reproductivo de la hembra bovina. Adicional a esto, los ovocitos con mayor potencial de generar cigotos, procedían de folículos de tamaño folicular de 3-4mm, lo que sugiere que los ovocitos de menor tamaño folicular, completaron su crecimiento, adquirieron competencia meiótica pero no competencia de desarrollo. En nuestro estudio, todavía se vienen realizando ensayos que nos permitirán obtener datos sobre el tamaño folicular óptimo que proporcionará mayor cantidad de ovocitos que lleguen a blastocistos luego de la fecundación *in vitro*.

CONCLUSIÓN

En conclusión la competencia meiótica fue superior en ovocitos procedentes de folículos de 1-2mm y 3-4mm, obteniendo mayor porcentaje de ovocitos en MII en estos grupos.

REFERENCIAS

- Blondin P, Sirard MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 1995; 41:54-62.
- Crozet N, Motlik J, Szollosi D. Nucleolar fine structure and RNA synthesis in porcine oocytes during the early stages of antrum formation. *Biol Cell.* 1981; 41:35-42.
- Hirao Y, Tsuji Y, Miyano T, Okano A, Miyake M, Kato S, Moor RM. Association between p34cdc2 levels and meiotic arrest in pig oocytes during early growth. *Zygote.* 1995; 3(4):325-332.
- Liebfried, L., First, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci.* 1979; 48:76-86.
- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Mol Reprod Dev.* 1994; 37:48-53.
- Motlik J, Fulka J. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Zool* 1976; 198(2):155-162.
- Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by swimup or percoll on success of *in vitro* fertilization and embryo development. *Theriogenology.* 1995;44:859-870.
- Sato, E., Matsuo, M., Miyamoto, H. Meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*: Improvement of meiotic competence by dibutyl cyclic adenosine 3', 5' -monophosphate. *J Anim Sci.* 68: 1182-1187. 1990.
- Sirard MA, Coenan K, Bilodeau S. Effects of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology.* 1992; 37:39-57.
- Vajta G, Peura TT, Holm P, Páldi A, Greve T, Trounson AO, Callesen H. New method for culture of zona-included or zona free embryos: the well-of-the-well (WOW) system. *Mol Reprod Dev.* 2000. 55:256-264.
- Yang X, Kubota C, Suzuki H, Taneja M, Bols PE, Presicce GA. Control of oocyte maturation in cows-biological factors. *Theriogenology.* 1998; 49:471-82.