

Efecto de gonadotropinas sobre la maduración y desarrollo embrionario de oocitos bovinos cultivados *in vitro*

Effect of gonadotropins on the maturation and embryo development of bovine oocytes cultured *in vitro*

Roger Salgado O,^{1*} M.Sc, Óscar Vergara G,¹ Ph.D, Leonardo Ramírez P,² MVZ.

¹Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Ciencias Pecuarias. Montería, Colombia. ²Ejercicio particular. *Correspondencia: rdsalgado@sinu.unicordoba.edu.co

Recibido: Enero 20 de 2009; Aceptado: Agosto 20 de 2009.

RESUMEN

Objetivo. Evaluar el efecto de las hormonas FSH y LH sobre las tasas de maduración, fertilización y desarrollo embrionario *in vitro*. **Materiales y métodos.** Se utilizaron 1309 oocitos de ovarios de matadero, donde el medio base fue TCM-199 suplementado (FSH y LH) y se conformaron cuatro tratamientos al azar: T1: sin hormonas, T2: 50 µg/ml FSH + 150 µg/ml LH; T3: 100 µg/ml FSH + 100 µg/ml LH y T4: 150 µg/ml FSH + 50 µg/ml LH. **Resultados.** No se presentó efecto ($p > 0.05$) de los tratamientos suplementados con FSH y LH sobre la tasa de maduración; por el contrario, T1 fue diferente ($p < 0.05$) a los demás tratamientos. Se presentó efecto ($p < 0.05$) entre los tratamientos suplementados con FSH y LH sobre las tasas de fertilización. La tasa de divisiones tempranas, no presentaron efecto ($p > 0.05$) cuando el medio de maduración fue suplementado con FSH y LH. **Conclusiones.** La adición de LH en mayor proporción con respecto a la FSH en el medio de maduración induce una mayor tasa de maduración, fecundación y desarrollo embrionario *in vitro* a partir de oocitos bovinos recuperados postmortem.

Palabras clave: Oocito, FSH, LH, maduración *in vitro*

ABSTRACT

Objective. To evaluate the effect of FSH and LH on the maturation rates, fertilization and embryo development *in vitro*. **Materials and methods.** 1309 oocytes were used slaughterhouse ovaries, where the basal medium was TCM-199 plus (FSH and LH) and four treatments were randomized: T1: no hormones, T2: 50 g / ml FSH + 150 g / ml LH; T3: 100 ng / ml FSH + 100 ng / ml LH and T4: 150 g / ml FSH + 50 g / ml LH. **Results.** No effect was found ($p > 0.05$) from treatments supplemented with FSH and LH on the rate of maturation, by contrast, T1 was different ($p < 0.05$) than the other treatments. Effect was presented

($p < 0.05$) among treatments supplemented with FSH and LH on the rates of fertilization. The rate of early divisions, had no effect ($p > 0.05$) when maturation medium was supplemented with FSH and LH. **Conclusions.** The addition of LH to a greater extent with respect to FSH in maturation medium induces a higher rate of maturation, fertilization and embryo development *in vitro* from bovine oocytes recovered postmortem.

Key words: Oocyte, FSH, LH, *in vitro* maturation

INTRODUCCIÓN

La producción de embriones bovinos *in vitro* trae consigo ventajas como el aprovechamiento de las hembras de alto valor genético para la obtención de gran cantidad de descendientes, disminución del intervalo generacional y por ende aceleración del mejoramiento y homogeneidad del componente genético de los hatos ganaderos. Sin embargo, esta técnica tiene limitaciones debido a la baja habilidad de desarrollo al estadio de blastocitos de los oocitos mamíferos madurados *in vitro* (1, 2) ya que muchos de los factores que afectan el proceso de maduración *in vivo* aun son desconocidos (3).

Los componentes y las condiciones de los medios de cultivo pueden afectar la regulación meiótica de los oocitos mamíferos cultivados *in vitro* (4, 5). Las gonadotropinas hipofisarias juegan un rol muy importante en la regulación de la maduración de los oocitos (6-8). La hormona folículo estimulante (FSH) actúa en la maduración *in vitro* a través de las células del *cumulus*, estimulando la producción de ácido hialurónico y la expansión de estas células, el cual facilita la capacitación espermática, mejorándose así la fertilización y el desarrollo embrionario (9). La hormona luteinizante (LH) estimula la progresión de la meiosis en el oocito del estado de profase a metafase II, en preparación para la fertilización, mediante un decremento del cAMP en el oocito, lo cual es necesario para la transición de profase a metafase (10-13).

Las hormonas LH y FSH, son comúnmente utilizadas en la suplementación de los medios de maduración ya sean independientes o en combinación y en diferentes concentraciones, lo que conlleva a variabilidad entre los resultados de diferentes investigaciones. El

objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de las hormonas FSH y LH en diferentes combinaciones y concentraciones en la capacidad de desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio. El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción animal "LABRA" de la Universidad de Córdoba, ubicado en el corregimiento de Berástegui, municipio de Ciénaga de Oro, Córdoba, Colombia. La zona se encuentra en un bosque húmedo tropical, altura de 10 msnm, temperatura promedio de 32°C, humedad relativa de 84% y precipitación anual de 1100 mm (14).

Recolección de ovarios y oocitos. Los ovarios fueron obtenidos en el matadero municipal de Cereté, Córdoba y transportados al laboratorio en solución salina (NaCl 0.9%) suplementada con 100 µg/ml de estreptomina a 35°C. Los oocitos fueron colectados por el método de aspiración directa de los folículos que tenían entre 2 y 5 mm de diámetro con jeringa de 10 ml y aguja calibre 18. Una vez aspirados, el contenido de la jeringa fue depositado en una placa de petri de 90 mm para coleccionar y clasificar los oocitos grado I y II.

Maduración *in vitro*. Los oocitos fueron lavados en medio de maduración TCM 199 suplementado con 10% de SFB, 0.3 mM de piruvato de Na, 75 µg/ml de gentamicina y cultivados en gotas de 50 µl en grupos de 10 a 20, cubiertos con aceite mineral, incubados por 24 h a 38.8°C, 5% de CO₂ y humedad atmosférica del 96%, distribuidos al azar en cuatro tratamientos:

T1 = Sin suplemento de FSH y LH

T2 = Suplementado con 50 µg/ml de FSH y 150 µg/ml de LH.

T3= Suplementado con 100 µg/ml de FSH y 100 µg/ml de LH.

T4 =Suplementado con 150 µg/ml de FSH y 50 µg/ml de LH.

Fertilización *in vitro*. Después de la maduración, los oocitos fueron lavados tres veces en medio de fertilización TAL FERT (TALP Caisson) suplementado con 10 µg/ml de heparina y PHE (0.25 mM epinefrina + 1 mM hipotaurina + 3 mM penicilamida). Los espermatozoides se obtuvieron a través del método de Swim-up y se le adiciono a cada gota de fertilización aproximadamente 1.5×10^6 esperm/ml. Los espermatozoides y los oocitos fueron cultivados en gotas de 50 µl por 24 h a 38.8°C, 5% de CO₂ y humedad relativa del 96%.

Cultivo *in vitro* de embriones. Después de la fertilización, los presuntos cigotos fueron lavados en medio de desarrollo TCM-199 suplementado con 20% de SFB, 0.3 mM de piruvato y 50 µg/ml de gentamicina. Luego se cultivaron en gotas de 50 µl (10 a 20 presuntos cigotos/gota) cubiertas con aceite mineral a 38.8°C, 5% de CO₂ y humedad relativa del 96%. El cultivo se continuó hasta el día 7 post-fertilización.

Evaluación de la maduración y fertilización *in vitro*. Para la evaluación de la maduración y de la fertilización, a los oocitos que se encontraban en MIV por 24 h o en FIV por 18 a 24 h, se les retiraron todas las células del *cumulus* y se procedió a montarlos en una lámina portaobjetos. Luego fueron sumergidos en solución fijadora (una parte de ácido acético/tres partes de metanol) por 24 horas. Posteriormente fueron teñidos con orceina al 2% en 45% de ácido acético de 10 a 15 min y fueron examinados en un microscopio de contraste de fase a 100X.

EVALUACIÓN EMBRIONARIA

Evaluación embrionaria temprana (estado 2-8 células). La evaluación de la división embrionaria temprana se realizó de

manera directa el día 3 del cultivo, (el día 0 fue el día de la fecundación), mediante observación con estereoscopio, se evaluaron las tasas de división de 2 a 8 células.

Evaluación embrionaria al estado de mórula-blastocito. La evaluación de la tasa de producción de embriones al estado de mórula (Mo) y blastocitos (B) fue realizada de forma directa en un estereoscopio, observando la cantidad que se encontraban en estos estados avanzados y clasificados en Mo compactas o blastocito, para poder determinar la tasa de producción de embriones para cada tratamiento.

Análisis estadístico. Los resultados correspondientes a la tasa de maduración, fecundación y desarrollo embrionario de los oocitos cultivados *in vitro*, fueron analizados a través de un análisis de varianza (ANAVA), y se establecieron diferencias significativas por medio de la prueba de Duncan.

RESULTADOS

Maduración *in vitro*. No se presentó efecto ($p > 0.05$) en las tasas de maduración *in vitro* para T2, T3 y T4 respectivamente. Por el contrario, hubo efecto ($p < 0.05$) para T1 con respecto a los demás tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Tasas de maduración *in vitro* de oocitos bovinos según el tratamiento

Tratamientos	Nº oocitos	Metafase II (MII)	
		Nº	%
T1: Sin hormonas	96	36	36.43 ^b
T2: 150 µg/ml LH + 50 µg/ml FSH	96	89	92.43 ^a
T3: 100 µg/ml LH + 100 µg/ml FSH	96	84	87.21 ^a
T4: 50 µg/ml LH + 150 µg/ml FSH	96	85	88.26 ^a

Porcentajes con diferente letra difieren estadísticamente ($p < 0.05$)

Fertilización *in vitro*. Se presentó efecto ($p < 0.05$) en las tasas de fertilización para T2. No hubo efecto ($p > 0.05$) entre T3 y T4; sin embargo, fueron diferentes a los otros tratamientos. Las tasas de fertilización presentaron ($p < 0.05$) para T1 comparado

con los tratamientos suplementados con FSH y LH (Tabla 2).

Tabla 2. Tasas de fertilización *in vitro* de oocitos bovinos según el tratamiento.

Tratamientos	Nº oocitos	Fecundados	
		Nº	%
T1: Sin hormonas	115	41	35.73 ^c
T2: 150 µg/ml LH + 50 µg/ml FSH	116	95	81.81 ^a
T3: 100 µg/ml LH + 100 µg/ml FSH	116	82	70.63 ^b
T4: 50 µg/ml LH + 150 µg/ml FSH	116	75	64.63 ^b

Porcentajes con diferente letra difieren estadísticamente ($p < 0.05$)

Divisiones tempranas (2-8 células). No se presentó efecto ($p > 0.05$) en las tasas de divisiones tempranas (2-8 células) para T2, T3 y T4 respectivamente. Mientras que hubo efecto ($p < 0.05$) para T1 comparado con los demás tratamientos (Tabla 3).

Tabla 3. Tasa de clivaje (2-8 células) *in vitro* de oocitos bovinos según el tratamiento.

Tratamientos	Nº oocitos	Clivaje (2-8 células)	
		Nº	%
T1: Sin hormonas	118	21	19.40 ^c
T2: 150 µg/ml LH + 50 µg/ml FSH	118	60	53.33 ^a
T3: 100 µg/ml LH + 100 µg/ml FSH	117	56	50.91 ^a
T4: 50 µg/ml LH + 150 µg/ml FSH	109	48	48.23 ^a

Porcentajes con diferente letra difieren estadísticamente ($p < 0.05$)

Desarrollo embrionario al estado de mórula-blastocisto. No Hubo efecto ($p > 0.05$) entre T2 y T3 sobre las tasas de desarrollo embrionario al estado morula-blastocito. Sin embargo T2 fue diferente ($p < 0.05$) a los demás tratamientos; mientras que T3 y T4 fueron similares ($p > 0.05$) pero diferente a T1 (Tabla 4).

Tabla 4. Tasa de producción de embriones *in vitro* de oocitos bovinos según el tipo de tratamiento.

Tratamientos	Nº oocitos	Embriones	
		Nº	%
T1: Sin hormonas	118	11	10.15 ^c
T2: 150 µg/ml LH/50 µg/ml FSH	118	41	35.83 ^a
T3: 100 µg/ml LH/100 µg/ml FSH	117	33	28.75 ^{ab}
T4: 50 µg/ml LH/150 µg/ml FSH	109	27	25.76 ^b

Porcentajes con diferente letra difieren estadísticamente ($p < 0.05$)

DISCUSIÓN

Las tasas de maduración de los tratamientos suplementados con FSH y LH en las concentraciones y combinaciones utilizadas en el presente estudio estimularon altas tasas de maduración nuclear (87 a 92%). Ha sido demostrado que la LH o FSH sola o en combinación, induce altas tasas de maduración de oocitos bovinos *in vitro*. Resultados similares han sido comunicados por Ratto et al (15) quienes encontraron a concentraciones de 0.08 UI de h-FSH una tasa de maduración del 93%; Chohan y Hunter (16) 92% al utilizar 10 µg/ml de b-FSH y 10 µg/ml de b-LH; Boelhauve et al (17); 84% y 81.7% al utilizar 22 µg/ml de FSH ó 8 µg/ml de LH respectivamente.

En la ausencia de gonadotropinas (FSH y LH) solamente el 36.43 % alcanzó la maduración nuclear (Metafase II), lo cual indica la importancia de las gonadotropinas (FSH y LH) para una adecuada maduración *in vitro* (10, 18, 19). Este resultado podría ser explicado dado que los oocitos al ser extraídos de los folículos y cultivados en un medio adecuado, inician la maduración nuclear en ausencia de FSH y LH, debido a que son retirados los factores inhibidores de la meiosis presente en el líquido folicular (20-23). Resultados similares han sido reportados por Zuelke y Brackett (7), quienes obtuvieron 37.5% de maduración nuclear en ausencia de hormonas.

En este estudio se demostró que las mayores tasas de fertilización *in vitro* (81.81%) fueron alcanzadas cuando el medio de maduración contenía una mayor proporción de LH, lo que demuestra la influencia positiva de esta hormona sobre la tasa de penetración. Esto podría ser explicado por una mayor tasa de maduración nuclear que estaría favoreciendo cambios en la zona pelúcida, específicamente a nivel de receptores ZP3, que son los responsables de la unión del espermatozoide al óvulo y participar en el proceso de fertilización (24-26). Resultados similares han sido comunicados por Ratto et al (15) y Chohan y Hunter (16), quienes obtuvieron una tasa de fecundación de 76.9% y 79.9% respectivamente.

Las tasas de fertilización para T3 y T4 fueron similares entre ellos, pero inferiores a T2 indicando el efecto ($p < 0.05$) de la relación hormonal (LH y FSH), donde a medida que se disminuye la proporción de LH sobre FSH la tasa de fertilización *in vitro* se ve disminuida (Tabla 2). Resultado similar ha sido comunicado por Zuelke y Brackett (7) quienes obtuvieron 73.5%.

Los medios suplementados con hormonas tienen la capacidad de producir buenas tasas de maduración, fertilización y divisiones tempranas. Los resultados de las tasas de divisiones tempranas en los tratamientos suplementados con hormonas FSH y LH son similares a los comunicados por Chohan y Hunter (16) quienes obtuvieron una tasa de división de 49.4%. No obstante Ratto et al (15) y Choi et al (27) reportaron resultados superiores con tasas de 62.7% y 66.7% (en cocultivo de células oviductales y medio condicionado, respectivamente) y 84.3%; mientras que Younis et al (28) reportaron resultados inferiores 37.6% y 39.6% para el tratamiento con FSH y LH respectivamente. Por el contrario, una baja tasa de división se presentó cuando los oocitos fueron madurados en ausencia de hormonas FSH y LH lo que podría inferirse en la falta de adquirir la capacidad de desarrollo embrionario por ausencia del estímulo hormonal (FSH y LH) necesario para la adecuada reanudación de la meiosis (10, 27).

La mayor tasa de desarrollo embrionario al estado de mórula-blastocito (35.83%) fue

obtenida a partir de oocitos madurados *in vitro* con una concentración de hormonas en el medio de maduración de 150 $\mu\text{g/ml}$ de LH + 50 $\mu\text{g/ml}$ FSH; siendo similar al tratamiento donde el medio de maduración se suplementó hormonalmente con 100 $\mu\text{g/ml}$ de FSH y 100 $\mu\text{g/ml}$ de LH, pero difiere ($p < 0.05$) con los demás tratamientos. Sin embargo, cuando el medio de maduración fue suplementado con 50 $\mu\text{g/ml}$ LH + 150 $\mu\text{g/ml}$ de FSH no varió significativamente ($p > 0.05$) del tratamiento suplementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ LH + 100 $\mu\text{g/ml}$ FSH. Por el contrario, una baja tasa (10.15%) de embriones al estado de mórula/blastocisto fue observada en el medio de maduración sin la adición de hormonas FSH y LH.

La baja producción de embriones al estado de morula-blastocito (10.15%) en el tratamiento sin la adición de las hormonas FSH y LH podría ser explicado por fallas en la maduración citoplasmática, lo cual afecta la capacidad de desarrollo de los oocitos fertilizados hasta estos estadios embrionarios (20-22). Resultado similar fue hallado por Zuelke y Brackett (7), quienes obtuvieron una tasa de 7.9% en el tratamiento sin hormonas durante la maduración.

En conclusión, el presente estudio demuestra la influencia positiva que tienen las gonadotropinas hipofisarias sobre las tasas maduración, fertilización y desarrollo embrionario *in vitro*, obteniéndose mejores resultados cuando la proporción de LH fue superior que la FSH en el medio de maduración.

REFERENCIAS

1. Dielman SJ, Hendriksen PJ, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, et al. Effect of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* 2002; 57:5-20.
2. Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 2002; 61:234-248.

3. Li YH, Jiao LH, Liu RH, Chen XL, Wang H, Wang WH. Localization of angiotensin II in pig ovary and its effects on oocyte maturation *in vitro*. *Theriogenology* 2004; 61:447-459.
4. Kito S, Bavister BD. Male pronuclear formation and early embryonic development of hamster oocytes matured *in vitro* with gonadotrophin, amino acids and cysteamine. *J Reprod Fertil* 1997; 110:35-46.
5. Downs SM, Mastropolo AM. Culture conditions affect meiotic regulation *in cumulus* cell-enclosed mouse oocyte. *Mol Reprod Dev* 1997; 46:551-566.
6. Moor RM, Trouson AO. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fertil* 1997; 49:101-109.
7. Zuelke KA, Brackett, BG. Luteinizing hormones enhanced *in vitro* maturation of bovine oocyte with and without protein supplementation. *Biol Reprod* 1990; 43:784-787.
8. Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge ML, First NL. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol Reprod* 1991; 44:256-260.
9. Sirard MA, Desrosier S, Assidi M. *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *Theriogenology* 2007; 68(Supl 1): S71-S76.
10. Eppig JJ, Viveiros MM, Bivens CM, De La Fuente R. The Ovary (Second Edition). En: Regulation of mammalian oocyte maturation. Part II. [En línea]. USA: ACADEMIC PRESS; 2003. [fecha de acceso 16 de octubre de 2008]. URL disponible en: <http://www.science-direct.com/science/book/9780124445628>.
11. Mehlmann LM, Kalinowski RR, Ross LF, Parlow AF, Hewlett EL, Jaffe LA. Meiotic resumption in response to luteinizing hormone is independent of a Gi family G protein or calcium in the mouse oocyte. *Dev Biol* 2006; 299:345-355.
12. Bilodeau S, Fortier MA, Sirard MA. Effect of adenylate ciclasa stimulation on meiotic resumption and cyclic AMP content on zone-free and cumulus-enclosed bovine oocyte *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1993; 97:5-11.
13. Plancha CE, Albertini DF. Hormonal regulation of meiotic maturation in the hamster oocyte involves a cytoskeleton-mediated process. *Biol Reprod* 1994; 51:852-864.
14. Instituto geográfico Agustín Codazzi, Córdoba. Características geográficas. Santa Fe de Bogotá: 1995.
15. Ratto M, Berland M, Wolter M. et al. Desarrollo de embriones de bovino obtenidos por fecundación *in vitro* cultivados con células oviductales o medio condicionado y transferidos a hembras receptoras. *Arch Med vet* 1999; 31(1):89-96.
16. Chohan KR, Hunter AG. *In vitro* maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. *Theriogenology* 2004; 61:373-380.
17. Boelhauve M, Sinowatz F, Wolf E and Paula-Lopes F. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of *in vitro* produced blastocysts. *Biol Reprod* 2005;73:737-744.
18. Bevers MM, Dieleman SJ, Van den Hurk R, Izadyar F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology* 1997; 47:13-22.
19. Sirard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 2001; 55:1241-1254.

20. Conti M, Bo Andersen C, Richard F, Mehats C, Chun S, Horner K, et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187:153-159.
21. Sirard MA, Richard F, Mayes M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology* 1996; 49:483-497.
22. Chian RC, Niwa K, Sirard MA. Effects of cumulus cell on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 1994; 41:1499-1508.
23. Luvoni GC, Chigioni S, Perego L, Lodde V, Modena S, Luciano AM. Effect of gonadotropins during *in vitro* maturation of feline oocyte-cúmulos cell functional coupling and intracellular concentration of glutathione. *Anim Reprod Sci* 2006; 96:66-78.
24. Bauskin AR, Franken DR, Eberspaecher U, Donner P. Characterization of human zona *pellucida* glycoproteins. *Mol Hum Reprod* 1999; 5(6):534-540.
25. Bleil JD, Wassarman PM. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona *pellucida* glycoprotein. *Dev Biol* 1983; 95(2):317-24.
26. Florman HM, Wassarman PM. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* 1985; 41(1):313-24.
27. Choi YH, Carnevale EM, Steidel GE, Squires J, Squires EL. Effect of gonadotrophin on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology* 2001; 56:61-670.
28. Younis AI, Brackett BG, Fayer-Hosken RA. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Res* 1989; 23:189-201.