

Acciones específicas de los factores de crecimiento (EGF e IGF-I) en la maduración *in vitro* de oocitos bovinos

P. Lorenzo, M. J. Illera*, J. C. Illera y M. Illera

Departamento de Fisiología Animal
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid
28040 Madrid (España)

(Recibido el 1 de marzo de 1993)

P. LORENZO, M. J. ILLERA, J. C. ILLERA and M. ILLERA. *Specific Actions of Growth Factors (EGF and IGF-I) on in vitro Matured Bovine Oocytes*. Rev esp. Fisiol., 49 (4), 265-270, 1993.

Growth factors (EGF and IGF-I) have different actions on mammalian cells such as proliferation and differentiation. The effect of EGF and IGF-I was examined on *in vitro* matured bovine oocytes. Immature oocytes were obtained by follicular aspiration from slaughtered heifer ovaries and classified in two groups, with or without cumulus cells. Oocytes (n=1,037) were cultured in a serum-free media (TCM-199) for 24 hours at 39 °C in absence of hormones and were divided in 5 treatments: control, EGF (20 ng/ml and 50 ng/ml), IGF-I (100 ng/ml) and EGF + IGF-I (50 ng/ml + 100 ng/ml). Results suggest that the EGF + IGF-I treatment increases significantly ($p < 0.01$) the maturation rate (60.3 %) as compared to control medium (36.5 %) in cumulus cell-enclosed oocytes. No significant differences were observed between the treatments in the denuded oocytes. The effect of EGF + IGF-I added to the maturation media seems to be mediated by the surrounding cumulus cells and enhanced the *in vitro* maturation rate on cumulus cell-enclosed bovine oocytes.

Key words: Growth Factors, EGF, IGF-I, *in vitro* maturation, Bovine oocyte.

El ovario de cualquier hembra doméstica contiene gran número de folículos en distintos estadios de desarrollo, en cuyo interior se encuentran los oocitos en un estado inmaduro (14), con un núcleo muy evidente llamado vesícula germinal (GV).

La maduración de estos oocitos se caracteriza por su progresión desde el estadio de GV hasta el de metafase de la segunda división meiótica. Esta evolución se puede reproducir *in vitro* utilizando medios de cultivo que imiten las condiciones físico-químicas que el gameto femenino tiene en el interior del folículo (12, 24). Para favorecer la maduración en esas condiciones, se añaden a los medios sustancias de diversa

* A quien debe dirigirse toda la correspondencia (Tel. 91-394 38 67. Fax 91-394 38 64).

naturaleza como hormonas, ya que las gonadotropinas (FSH y LH) y algunas hormonas esteroideas (17β estradiol) tienen una acción decisiva en la maduración *in vivo* del oocito (2-4, 23). Otras sustancias también presentes en el ovario, como los factores de crecimiento, pueden ejercer un control sobre ciertas funciones ováricas y la maduración de los oocitos (20). Así, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) participa en las funciones de proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, mientras que el factor de crecimiento similar a la insulina del tipo 1 (IGF-I) actúa como un agente mitogénico muy potente en las mismas células (6). Ambos factores actúan mediante receptores localizados en las membranas celulares, cuya activación origina a su vez la de otros sistemas de mensajeros celulares (5, 20, 29).

El objetivo del presente trabajo es estudiar el posible papel que juegan estos factores de crecimiento sobre la maduración *in vitro* de oocitos bovinos, utilizando medios sin ninguna otra suplementación sérica u hormonal. Por otro lado, se pretende determinar la influencia del cúmulo celular en la acción de estos factores de crecimiento.

Material y Métodos

Obtención de los ovarios. — Proceden de novillas de 1-3 años, sacrificadas en el matadero y transportadas inmediatamente al laboratorio, utilizando un termo con solución fosfato-salina (PBS) tamponada a 39 °C suplementada con antibióticos (estreptomomicina y penicilina, 10 mg/ml y 100 UI/ml, respectivamente). En el laboratorio, los ovarios se lavaron con la misma solución para eliminar los restos de sangre y adherencias (16, 24).

Obtención de los oocitos. — Se realizó mediante la aspiración del contenido de los folículos ováricos de diámetro comprendido entre 2 y 8 mm, utilizando para ello

agujas hipodérmicas de 18 G, conectadas a jeringas de 10 ml. El producto de la aspiración se colocó en un tubo estéril, se decantó durante 30 minutos y el sedimento obtenido se recogió mediante una pipeta Pasteur. Los oocitos se aislaron del sedimento en una placa Petri estéril de 9 cm de diámetro; se recogieron mediante micropipetas estériles, de 20 μ l, conectadas a gomas de aspiración, empleando una lupa esteroscópica de 16 aumentos.

Selección, clasificación y cultivo de maduración. — Los oocitos se pasaron sucesivamente por cinco placas Petri con medio de lavado compuesto de TCM-199 y HEPES 25 mM para eliminar restos de líquido folicular. Antes de iniciar el cultivo de maduración (25, 30) se seleccionaron, según la homogeneidad del cúmulo celular (compacto) y apariencia del citoplasma (uniforme y sin espacio perivitelino), y se clasificaron en dos grupos: tipo A (cúmulo celular completo y más de 6 capas celulares) y tipo B (total o parcialmente desnudados).

Una vez clasificados los oocitos, se colocaron en los siguientes medios de maduración, dispuestos en microgotas de 50 μ l cubiertas de aceite de silicona líquido: TCM-199 (control); TCM-199 + 20 ng/ml de EGF; TCM-199 + 50 ng/ml de EGF; TCM-199 + 100 ng/ml de IGF-I, y TCM-199 + 50 ng/ml de EGF y 100 ng/ml de IGF-I.

Los factores de crecimiento utilizados, EGF (0,1 mg, Sigma) e IGF-I (10 μ g, Boehringer Mannheim) se solubilizaron en 5 ml de TCM-199. El cultivo de maduración se mantuvo durante 24 horas en estufa con 5 % de CO_2 , a 39 °C y 95 % de humedad en el aire.

Fijación y tinción. — Al final del periodo de maduración, los oocitos se fijaron en una solución de ácido acético: etanol (1:3 v/v) durante 24 horas, y se tiñeron con orceína acética (2 %), para visualizar las estructuras nucleares (30). Se valoraron los

siguientes estadios meióticos: degeneración nuclear (Deg); vesícula germinal (GV); metafase I (MI), incluyendo en este estadio los oocitos en metafase I y anafase-telofase I; y metafase II (M II) o estadio de maduración nuclear.

Análisis estadístico. — Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente utilizando el procedimiento 7d del programa BMDP (Biomedical Data Program, Torrance California). Se compararon los valores medios obtenidos de 7 experimentos distintos ($\% \pm \text{e.s.m.}$) por análisis de la varianza (proc. 7d) y se analizaron las diferencias entre las medidas individuales mediante la *t* de Student empleando la notación de Bonferroni. Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

Resultados

Los resultados de maduración nuclear para ambos tipos de oocitos con los distintos tratamientos utilizados se muestran en la tabla I. En los tipos A, los resultados más bajos de maduración (M II) se obtuvieron

en el tratamiento control (36,5 %), aunque estos valores aumentaron cuando se añadieron factores de crecimiento en el medio, alcanzándose el máximo porcentaje (60,3 %) al utilizar EGF + IGF-I. El valor obtenido en este último tratamiento presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el resto de los tratamientos, excepto con el que incluía 50 ng/ml de EGF. Los valores de maduración obtenidos en los oocitos desnudos, no presentaron diferencias significativas entre sí en ninguno de los tratamientos utilizados.

La adición de EGF al medio mostró una evidente relación dosis-respuesta en la maduración de los oocitos con cúmulo completo al utilizar diferentes concentraciones de este factor. El tratamiento con 50 ng/ml de EGF mostró diferencias significativas frente al control ($p < 0,05$). Estas diferencias también se observaron al compararlo con el tratamiento con 20 ng/ml de EGF. El grupo de oocitos madurados con 20 ng/ml de EGF no se diferenció estadísticamente del control.

Las diferencias entre los porcentajes de maduración obtenidos según exista o no cúmulo celular se muestran que los índices de maduración sólo presentan diferencias

Tabla I. *Maduración in vitro de oocitos bovinos con cúmulo completo (A) y desnudos (B).* Los oocitos ($n = 1.037$) se cultivaron en TCM-199 durante 24 h, a 39 °C y 100 % de humedad. Los valores son resultado de 7 experimentos distintos. Deg: degenerados. GV: vesícula germinal. M I: metafase I. M II: metafase II. Las medias ($\% \pm \text{e.s.m.}$) entre distintas filas para el mismo tipo de oocito, seguidas de letras distintas son significativamente diferentes a vs. b, c $p < 0,05$; a, c, vs. d $p < 0,01$.

Tratamiento	Tipo de oocito	n.º oocitos	Estadios meióticos ($\% \pm \text{e.s.m.}$)			
			Deg	GV	M I	M II
Control	A	86	16,8 \pm 3,3	24,9 \pm 6,4	21,8 \pm 3,1	36,5 \pm 3,5 ^a
	B	59	21,9 \pm 3,4	15,8 \pm 3,0	28,0 \pm 3,1	34,3 \pm 6,4 ^a
EGF (20 ng/ml)	A	97	10,6 \pm 1,4	13,6 \pm 2,7	35,4 \pm 1,5	40,4 \pm 3,5 ^a
	B	86	14,0 \pm 1,4	15,0 \pm 3,8	30,4 \pm 6,2	40,6 \pm 4,9 ^a
EGF (50 ng/ml)	A	118	9,3 \pm 1,4	5,5 \pm 1,7	31,9 \pm 3,2	53,3 \pm 4,4 ^b
	B	107	15,8 \pm 1,9	10,0 \pm 2,1	28,7 \pm 1,5	45,5 \pm 4,2 ^a
IGF-I (100 ng/ml)	A	85	13,3 \pm 2,4	7,7 \pm 2,3	30,3 \pm 3,5	48,7 \pm 4,1 ^c
	B	114	14,8 \pm 1,8	14,5 \pm 1,8	25,3 \pm 2,1	45,4 \pm 3,9 ^a
EGF + IGF-I	A	141	11,9 \pm 2,2	2,0 \pm 1,4	25,8 \pm 4,3	60,3 \pm 3,7 ^d
	B	144	12,3 \pm 1,3	5,7 \pm 1,1	40,4 \pm 5,9	41,6 \pm 2,0 ^a

significativas entre los tipos de oocitos A y B, cuando se utilizaron 50 ng/ml de EGF ($p < 0,05$) o con ambos factores conjuntamente ($p < 0,01$).

Discusión

La maduración de los oocitos *in vivo* en los folículos ováricos, depende de factores reguladores de muy diversa naturaleza (28). La adición a los medios de cultivo de esteroides foliculares y gonadotropinas mejora los índices de maduración *in vitro* (15, 26), aunque se necesita la presencia de otros compuestos para completar este proceso (8, 18). De entre todas estas sustancias, los factores de crecimiento han demostrado estimular la maduración *in vitro* de los oocitos de animales de laboratorio (7, 10, 13).

Hasta que se produce el pico preovulatorio de gonadotropinas, el oocito permanece en el estadio de vesícula germinal debido a la influencia de factores inhibitorios producidos por las células de la granulosa, que pasan al oocito por las uniones entre éste y las células que le rodean (1, 9, 30). Se ha sugerido que la interrupción del flujo de AMPc desde el cúmulo celular hacia el oocito provoca el inicio de la maduración. Este parece ser el mecanismo de acción de la LH y del EGF. El efecto dosis-respuesta, obtenido en el presente trabajo al utilizar EGF en el medio de maduración, ha sido señalado en oocitos de ratona (10) y en oocitos bovinos (27), donde al utilizar 50 ng/ml de EGF se obtuvieron índices de maduración ligeramente superiores a los del presente estudio, debido, quizás, a la utilización de un medio básico de maduración (HAM F-12) distinto al utilizado en este trabajo (TCM-199).

La utilización de IGF-I provocó un estímulo significativo de la maduración respecto del grupo control aunque, de la misma manera que lo señalado por otros autores en oocitos de ratona (10), se observó menor efecto que al utilizar EGF. La

dosis elegida de 100 ng/ml de IGF-I, se basó en la existencia de concentraciones análogas de este factor de crecimiento en el líquido folicular bovino (11). Así, se trató de imitar, en lo posible, las concentraciones encontradas *in vivo*. Además, esta concentración fue la más eficaz (entre 1, 10 y 100 ng/ml) para inducir la activación meiótica en oocitos de ratona (10) y en oocitos porcinos (21). Algunos autores (19) indican que este factor de crecimiento puede influir positivamente sobre la maduración y fecundación *in vitro* del oocito bovino y su desarrollo embrionario posterior, aunque no muestran datos de los índices de maduración conseguidos. El IGF-I parece actuar en el cúmulo celular induciendo la creación de receptores para la LH, de manera parecida a la FSH (19, 20). Los mecanismos de actuación del IGF-I parecen ser distintos a los del EGF y están basados en la acción que ejerce directamente sobre el propio oocito, interniniendo en fenómenos de transcripción del ADN, síntesis de nuevas proteínas citoplasmáticas o, tal y como se ha señalado recientemente, en la activación de ciertos componentes proteicos del MPF o Factor Promotor de la Maduración (17). La baja estimulación producida por el IGF-I puede deberse a la ausencia de proteínas de unión (binding-proteins) para este factor, ya que el medio de maduración empleado carecía de cualquier fuente sérica.

La utilización de estos dos factores de crecimiento conjuntamente sólo se ha descrito en oocitos de porcino, con efectos positivos (22). Algunos autores han utilizado IGF-I + TGF β en el medio de maduración de oocitos de rata, con peores resultados (13). El efecto positivo encontrado en el presente estudio, cuando se utilizan EGF e IGF-I conjuntamente, se puede deber a que los factores de crecimiento actúan en el ovario de manera coordinada para producir los correspondientes efectos biológicos (20) y, por tanto, la suma de dos factores de crecimiento, de acciones no antagonicas, pue-

de mejorar los resultados de maduración.

En cuanto a la importancia de la presencia del cúmulo celular en la maduración *in vitro*, resulta evidente en los medios que incluían a ambos factores de crecimiento a la vez ó 50 ng/ml de EGF. Estos resultados están de acuerdo con estudios llevados a cabo, en otras especies animales, con EGF (7, 10) o en medios suplementados con hormonas (24, 30) e indica que, para conseguir una eficaz reanudación meiótica, es necesaria la presencia del cúmulo celular que rodea al oocito. La razón de este efecto puede que sea debida a que cuando una sustancia, en este caso los factores de crecimiento o los productos de su actuación, interrumpe el flujo de compuestos inhibidores hacia el oocito, la comunicación cúmulo-oocito se detiene y el gameto se encuentra libre para reanudar la meiosis. Por lo tanto, en los oocitos desnudos, al no existir cúmulo celular no se pueden ejercer estas acciones quedando a merced de los receptores de la propia membrana con pequeños efectos estimulantes.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran claramente que los factores de crecimiento, empleados separada o conjuntamente, estimulan de manera significativa la maduración *in vitro* de oocitos bovinos, sin ninguna suplementación hormonal ni sérica y de una manera muy significativa en los oocitos con cúmulo celular.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración del Dr. P. Jiménez, del Matadero GYPISA (Pozuelo de Alarcón), la de F. Pescador, del Sistema Informático de Somosaguas (UCM) y la de Teresa Calduch en la realización de este estudio.

Resumen

Los factores de crecimiento ejercen variadas acciones sobre la proliferación y diferenciación

celular ovárica. Se analizan los efectos del EGF e IGF-I, conjunta o separadamente, en la maduración *in vitro* de oocitos bovinos. Los oocitos inmaduros (n = 1.037) obtenidos por aspiración del contenido de los folículos ováricos de novillas sacrificadas en el matadero y clasificados en dos grupos (A y B) dependiendo de la presencia/ausencia del cúmulo celular, se cultivan durante 24 horas a 39 °C en un medio TCM-199, sin suplementación sérica u hormonal y se dividen en 5 tratamientos: control, EGF (20 ng/ml y 50 ng/ml), IGF-I (100 ng/ml) y EGF+IGF-I (50 ng/ml+100 ng/ml). El porcentaje de maduración de los oocitos del grupo A, en el medio con EGF+IGF-I (60,3 %) es más elevado que en el tratamiento control (36,5 %, p<0,01). Los porcentajes de maduración en los oocitos sin células del cúmulo no presentan diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos realizados. Se demuestra que la utilización de EGF+IGF-I incrementa los valores de maduración *in vitro* y que este efecto se ejerce a través de las células del cúmulo que rodean al oocito bovino.

Palabras clave: Factores de crecimiento, EGF, IGF-I, Maduración *in vitro*, Oocito bovino.

Bibliografía

1. Armstrong, D. T., X. Zhang, B. C., Vanderhyden y Khamsi, F.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 626, 137-158, 1991.
2. Bae I. H. y Foote, R. H.: *J. Reprod. Fertil.*, 42, 357-360, 1975.
3. Ball, G. D., M. L. Leibfried, R. W. Lenz, R. L. Ax, B. D. Bavister y First, N. L.: *Biol. Reprod.*, 28, 717-725, 1983.
4. Bavister, B. D.: En "Fertilization and embryonic development *in vitro*". (L. Mastroianni Jr. y J. D. Biggers, eds.) Plenum Press, Nueva York, 1981. pp. 42-58.
5. Carpenter, G. y Cohen, S.: *Ann. Rev. Biochem.*, 48, 193, 1979.
6. Carson, R.S., Z. Zhang, L.A. Hutchinson, A. C. Herrington y Findlay, J. K.: *J. Reprod. Fertil.*, 85, 735-746, 1985.
7. Dekel, N. y Scherizly, I.: *Endocrinology*, 116, 512-516, 1989.
8. DiZerega, G. S., J. D. Campeu, E. L. Ujita, O.

- R. Kling, R. P. Mars, R. L. Lobo y Nakamura, R. M.: *Semin. Reprod. Endocrinol.*, 1, 309, 1983.
9. Downs, S. M., S. A. J. Daniel y Eppig, J. J.: *J. Exp. Zool.*, 245, 86-96, 1988.
10. Downs, S. M.: *Biol. Reprod.*, 41, 371-379, 1989.
11. Echterkamp, S. E., L. J. Spicer, K. E. Gregory, S. F. Canning y Hammond, J. M.: *Biol. Reprod.*, 43, 8-14, 1990.
12. Edwards, R. G.: *Nature*, 208, 349-351, 1965.
13. Feng, P., K. J. Catt y Ketch, M.: *Endocrinology*, 122, 181-196, 1988.
14. Franchi, L., Mandl, A. y Zuekerman, S.: En «The ovary». (S. Zukerman, ed.) Plenum Press, Nueva York, 1962, Vol I, pp. 1-88.
15. Fukui, Y., M. Fukushima, Y. Terawaki y Ono, H.: *Theriogenology*, 18, 161-175, 1982.
16. Fukui, Y. y Ono, H.: *J. Reprod. Fert.*, 86, 501-506, 1989.
17. Hainaut, R., S. Giorgetti, A. Kowlaski, R. Ballotti y Van Obberghen, E.: *Exp. Cell Res.*, 195, 129-136, 1991.
18. Hammond, J. M., J. L. S. Baranao, D. Skaleris, A. B. Knight, J. A. Romanus y Redhler, M. M.: *Endocrinology*, 117, 2553-2555, 1985.
19. Herlerr, A., A. Lucas-Hann y Niemann, H.: *Theriogenology*, 37, 1213-1224, 1992.
20. Hill, D. J.: *J. Reprod. Fert.*, 85, 723-734, 1989.
21. Illera, M. J., J. Arellano, P. Lorenzo, J. Sánchez, G. Silván e Illera, J. C.: 8^o A.E.T.E. Lyon (France), 1992, p. 170.
22. Illera, M. J. y Petters, R. M.: *Theriogenology*, 39, 235, 1993.
23. King, W. A., D. Bousquet, T. Greve. y Goff, A. K.: *Acta Vet. Scand.*, 27, 267-279, 1986.
24. Leibfried, M. L. y First, N. L.: *J. Anim. Sci.*, 48, 76-86, 1979.
25. Lorenzo, P., M. J. Illera, J. Sánchez, G. Silván e Illera, J. C.: *Theriogenology*, 37, 250, 1992.
26. Moor, R. M. y Trounson, A. O.: *J. Reprod. Fert.*, 49, 101-109, 1977.
27. Sanbuissho, A., S. Coskun y Lin, Y. C.: *Assisted Reprod. Tec. Androl.*, 1, 143-153, 1990.
28. Tonetta, S.A. y DiZerega, G. S.: *Endocr. Rew.*, 10, 205-229, 1989.
29. Vlodaysky, I., K. D. Brown y Gospodarowicz, D.: *J. Biol. Chem.*, 253, 3744-3750, 1978.
30. Xu, K. P., T. Greve, S. Smith y Hyttel, P.: *Acta Vet. Scand.*, 27, 505-519, 1986.