

# EFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGF) SOBRE LA MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS CULTIVADOS *In vitro*

## Effect of Epidermal Growth Factor (EGF) on the Maturation of Bovine Oocytes Cultured *In vitro*

Roger Salgado-Otero<sup>1</sup>, Juan Simanca-Sotelo<sup>1</sup> y Oscar Vergara-Garay<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Ciencias Pecuarias, Grupo de Reproducción y Producción Animal. A.A. 354 Montería, Colombia. \*rodasaot@yahoo.es

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del factor de crecimiento epidermal (EGF) sobre la tasa de maduración de ovocitos bovinos cultivados *in vitro* en un medio de maduración químicamente definido. Se utilizaron 484 ovocitos de ovarios recolectados de hembras en matadero, siendo el medio base TCM 199 suplementado con piruvato de sodio, 17  $\beta$  estradiol y gentamicina (Medio control). Se conformaron cuatro tratamientos al azar: T1: Controlsin EGF; T2: control más 1ng de EGF; T3: control más 10 ng de EGF y T4: control más 50 ng de EGF. Los resultados indican que hubo diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) del EGF sobre la proporción de ovocitos, encontrándose mayor proporción de ovocitos que alcanzaron el estado de metafase II en el tratamiento con 50 ng/mL de EGF (73%), seguido por 10 ng/mL (54,2%) y con 1 ng/mL de EGF (32,3%). No obstante, entre el medio control y el suplementado con 50 ng/mL de EGF no se encontraron diferencias significativas (70,3 -73%, respectivamente), indicando que ambos medios favorecen la maduración de ovocitos. En conclusión, la suplementación del medio de maduración químicamente definido no demostró algún efecto estimulador del EGF sobre el porcentaje de metafase II a partir de ovocitos bovinos recuperados de ovarios *post mortem*.

**Palabras clave:** Factor de crecimiento epidermal, maduración *in vitro*, ovocitos.

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of epidermal growth factor (EGF) on the rate of maturation of bovine oocytes cultured *in vitro* in a chemically defined maturation me-

dium. Four hundred eighty four slaughterhouse ovaries oocytes were used, where the base medium was TCM 199 supplemented with sodium pyruvate, 17  $\beta$  estradiol, gentamicin. Four treatments were randomly formed: T1: no EGF (Control), T2: 1 ng of EGF, T3: 10 ng of EGF and T4: 50 ng of EGF. The results indicate that significant difference ( $P < 0.05$ ) of EGF on the proportion of oocytes, there was a higher proportion of oocytes that reached metaphase II status to the concentration of 50 ng/mL of EGF (73%), followed by 10 ng/mL (54.2%), and 1 ng/mL of EGF (32.3%). However, among the control medium and the supplemented with 50 ng/mL of EGF were no significant differences (70.3 -73%, respectively), indicating that both means favor the maturation of oocytes. In conclusion, the supplementation of chemically defined maturation medium showed no stimulatory effect of EGF on the percentage of metaphase II oocytes from of bovine ovaries collected *post mortem*.

**Key words:** Epidermal growth factor, *in vitro* maturation, oocytes.

### INTRODUCCIÓN

El proceso de producción de embriones bovinos (*Bos taurus-Bos indicus*) *in vitro* puede dividirse en tres pasos fundamentales, los cuales, independientemente del protocolo utilizado, en orden cronológico son: maduración de ovocitos, fecundación y cultivo de embriones. Estos tres pasos, comprenden procesos fisiológicos, condicionando cada uno el éxito o el fracaso del siguiente [11].

Es conocido que el desarrollo embrionario depende de la competencia del ovocito. Tal competencia, que involucra al citoplasma y núcleo es adquirida progresivamente por el ovocito durante el proceso de maduración. La adquisición de la competencia es un proceso muy bien coordinado que incluye cambios morfológicos, estructurales, transcripcionales del citoplas-

ma y compartimiento nuclear de los ovocitos. Este proceso permite la fecundación y desarrollo de embriones [10].

Por otra parte, se han utilizado medios químicamente definidos, para determinar el efecto de la hormona folículo estimulante (FSH) y de los factores de crecimiento sobre la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos bovinos y en la caracterización bioquímica de los efectos hormonales sobre el metabolismo del ovocito durante la MIV [8]. El factor de crecimiento epidermal (EGF) como suplemento de los medios de maduración ovocitaria, en sustitución de suplementos séricos es utilizado en medios absolutamente definidos para evitar la influencia de factores desconocidos presentes en el suero. En este sentido se ha demostrado el efecto positivo de la utilización del EGF en el medio de MIV sobre diferentes etapas del desarrollo del ovocito, que demuestran una maduración ovocitaria más eficaz. Al respecto, se han observado efectos promotores del EGF presente en el medio de MIV, definido o indefinido, sobre los siguientes parámetros evaluados: Expansión de las células del cúmulo, estimulación de la ruptura de la vesícula germinal, maduración nuclear, penetración, disminución de la poliespermia, penetración monoespérmica, formación del pronúcleo masculino tras la penetración espermiática, penetración normal, estimulación de la división y estimulación del desarrollo embrionario [8]. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del EGF en diferentes concentraciones, sobre la maduración de ovocitos bovinos cultivados *in vitro* en un medio químicamente definido.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Localización.** 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, ubicado entre los 8° 53' LN y 75° 37' LO [13]. Esta zona está clasificada como bosque seco tropical, presenta temperatura promedio de 32°C, humedad relativa del 84%, una altura sobre el nivel del mar de 10 m y precipitación promedio anual de 1100 mm, que se distribuye irregularmente en dos períodos: uno lluvioso, con 85% del total de la precipitación anual; y uno seco, comprendido entre los meses de noviembre y abril [6].

**Recolección de ovarios y ovocitos.** Los ovarios fueron obtenidos en el matadero municipal de Cereté, Córdoba y transportados al laboratorio en termos que contenían solución salina (NaCl 0,9%) suplementada con 100 mg/mL de estreptomina a 35°C. Los ovocitos fueron colectados por el método de aspiración directa de los folículos, que tenían entre 2 y 5 mm de diámetro, a través de la utilización de una 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 ovocitos. Se utilizaron ovocitos que presentaban un cumulus denso, con un mínimo de 5 a 6 capas de células, citoplasma homogéneo de color marrón o gris oscuro uniforme (Grado I) y ovocitos que presentaban entre 3 y 4 cé-

lulas del cumulus más oscuro y menos transparente, citoplasma con granulación más gruesa y más oscura (Grado II) [9].

**Tamaño de la muestra.** Para el estudio se realizaron seis réplicas de 48 ovocitos por cultivo, los cuales se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos de 10 a 12 ovocitos cada uno para el proceso de MIV, empleando un total de 484 ovocitos.

**Maduración *in vitro*.** El medio Control para este experimento fue el medio de maduración de ovocitos, químicamente definido TCM 199, suplementado con 0,3 Mm de piruvato de sodio, 1 µg/mL de estradiol, 75 µg/mL de gentamicina y cultivados en gotas de 50 µL en placas de Petri en grupos de 10 a 12 ovocitos cubiertos con aceite mineral, incubados (Termo Scientific, modelo 3110, EUA) durante 24 horas (h) a 38,8°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad atmosférica del 96%, y distribuidos aleatoriamente en cuatro tratamientos:

T1= Grupo control sin suplemento de EGF

T2 =Grupo control suplementado con 1 ng/mL de EGF

T3 =Grupo control suplementado con 10 ng/mL de EGF

T4 =Grupo control suplementado con 50 ng/mL de EGF

**Evaluación de la maduración.** Para la evaluación de la maduración nuclear, a los ovocitos se les retiraron todas las células del *cúmulo* y se procedió a montarlos en una lámina portaobjetos. Luego fueron sumergidos en solución fijadora (una parte de ácido acético/tres partes de metanol) durante 24 h. Posteriormente, fueron teñidos con orceína al 2% en 45% de ácido acético de 10 a 15 min y fueron examinados en un microscopio óptico Leica (DML52, Alemania) a 100X. Se consideró un ovocito maduro aquel que mostrara la presencia de metafase II. Todos los químicos y medios utilizados en este estudio fueron comprados de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), excepto el suero fetal bovino que fue comprado de GIBCO (Gibco BRL, Grand Island NY, EUA).

**Análisis estadístico.** Los resultados correspondientes a la tasa de MIV, fueron analizados a través de un análisis de varianza (ANAVA). Como los datos de la variable respuesta eran en porcentaje, hubo la necesidad de transformarlos mediante el arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje, para cumplir con supuesto de normalidad. Posterior al análisis de varianza, se realizó la prueba de comparación de medias de Duncan. Los datos fueron analizados usando el programa SAS [14].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del trabajo señalan que hubo diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) del EGF sobre la proporción de ovocitos, encontrándose la mayor proporción de ovocitos que alcanzaron el estado de metafase II (73%) en la concentración de 50 ng/mL, seguido de 10 ng/mL (54,2%) y 1 ng/mL de EGF (32,3%). No obstante, entre el grupo control y el suplementado con 50 ng/mL de EGF no se presentó diferencia significativa ( $P > 0,05$ ) (TABLA I).

**TABLA I**  
**TASA DE MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS BOVINOS SEGÚN EL TRATAMIENTO**

Tratamientos	Nº de Ovocitos	Metafase II (MII)	
		%	DS
T1 = Control	124	70,3 <sup>a</sup>	14,1
T2=Grupo control suplementado con 1 ng/mL de EGF	124	32,3 <sup>b</sup>	6,2
T3=Grupo control suplementado con 10 ng/mL de EGF	120	54,2 <sup>c</sup>	7,2
T4=Grupo control suplementado con 50 ng/mL de EGF	116	73,0 <sup>a</sup>	6,7

Porcentajes con diferente letra difieren estadísticamente (P<0,05). DS: Desviación estándar.

El efecto estimulador del EGF sobre la maduración nuclear ha sido reportado en ratón (*Mus musculus*) y humanos por Das y col. [3] y en bovinos por Im y Park [7], encontraron que el EGF es capaz de promover la maduración nuclear en un medio químicamente definido. En este sentido, Parky col.[12] encontraron diferencia significativa (P<0,05) solo al emplear 30 ng/mL de EGF (97%) con respecto al tratamiento control (77%), mientras que a la dosis de 10 y 50 ng/mL de EGF no tuvieron diferencia significativa (P>0,05). Por el contrario, Harper y Brackett [5], no obtuvieron efecto (P>0,05) en la proporción de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II, al adicionar 1, 10 y 100 ng/mL de EGF a un medio de maduración definido libre de suero y hormonas (rango, 71,8 - 76,5%). De igual manera, Lonergan y col. [9] no obtuvieron diferencias en las tasas de maduración nuclear al emplear 1, 10 y 100 ng/mL de EGF o suero como únicos suplementos del medio de maduración químicamente definido en ovocitos bovinos. Así mismo, Coskun y col. [1], no observaron diferencias significativas (P>0,05) al utilizar 10 y 50 ng/mL de EGF sobre la MIV en bovinos. Los resultados del presente estudio, mostraron que dosis bajas (1 y 10 ng/mL) de EGF ejercen un efecto negativo sobre la maduración nuclear de los ovocitos en comparación con 50 ng/mL y el control; dado el alcance de este estudio no es posible explicar estos resultados, por lo cual se requieren futuras investigaciones que nos permitan aclarar los mecanismos moleculares involucrados en ese proceso.

Entre el tratamiento control y dosis de 50 ng/mL de EGF no se encontró diferencia significativa (P>0,05; 70,3 y 73,0%, respectivamente), indicando que la suplementación a estas dosis no tiene efecto sobre la maduración nuclear *in vitro* de los ovocitos. Resultados similares han sido reportados en caninos (*Canis lupus familiaris*) por Song y col. [15] y Cui y col. [2].

## CONCLUSIONES

La suplementación del medio de maduración químicamente definido con dosis bajas (1 y 10 ng/mL de EGF) mostraron un efecto negativo, pero la dosis de 50 ng/mL no mostró algún efecto estimulador del EGF sobre el porcentaje de metafase II.

## AGRADECIMIENTO

Al laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal -LABRA- de la Universidad de Córdoba por el apoyo en la realización de esta investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] COSKUN, S.; SANBUISHO, A.; LIN, Y.C.; RIKIHISA, Y. Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor (EGF). **Theriogenol.** 36:485-494. 1991.
- [2] CUI, X.S.; JIN, Y.X.; SHEN, X.H.; LEE, J.Y.; LEE, H.S.; YIN, X.J.; KONG, I.K.; KIM, N.H.; Epidermal growth factor enhances meiotic resumption of canine oocytes in the presence of BSA. **Theriogenol.** 66: 267–274. 2006.
- [3] DAS, K.; STOUT, L.E.; HENSLEIGH, H.C.; TAGATZ, G.E.; PHIPPS, W.R.; LEUNG, B.S. Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. **Fert. Esteril.** 55:1000-1004. 1991.
- [4] GUSTAVO, A. P. Producción *in vitro* de embriones bovinos. En: **Biotecnología de la Reproducción.** 2ª Ed., Ediciones Reprobiotec, Mar del Plata, Argentina, Pp 318-320. 2008.
- [5] HARPER, K.M.; BRACKETT, B.G. Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with Epidermal Growth Factor y low concentrations of gonadotropins. **Biol. Reprod.**48: 409-416. 1993.
- [6] HOLDRIDGE, L. El Diagrama de las zonas de vida. En: **Ecología basada en zonas de vida,** 5ta Reimp., Editorial IICA, San José, Costa Rica. Pp 13-26. 2000.
- [7] IM, K.S.; PARK, K.W. Effects of epidermal growth factor on maturation, fertilization and development of bovine follicular oocytes. **Theriogenol.** 44:209-216. 1995.
- [8] KENKISTEPE, L.; BURNLEY, C.A.; BRACKETT, B.G. Production of viable bovine blastocyst in defined *in vitro* conditions. **Biol. Reprod.** 52:1410-1417. 1995.
- [9] LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; VAN LONENDONCKT, A.; DONNAY, I.; KATHIR, H.; MERMILLOD, P. Role of Epidermal Growth Factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro.* **Biol. Reprod.** 54:1420-1429. 1996.
- [10] LUVONI, G.C.; CHIGIONI, S.; ALLIEVE, E.; MACIS, D. Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes. **Theriogenol.** 63:41-59. 2005.
- [11] MUCCI, N.; ALLER, J.F.; KAISER G.G.; HOZBOR, F.; ALBEIRO, R.H. Reproducción *in vitro* de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. **Arch. Med. Vet.** 38: 97-104. 2006.

- [12] PARK, K.W.; IGA, K.; NIWA, K. Exposure of bovine oocytes to EGF during maturation allows them to develop blastocysts in a chemically-defined medium. **Theriogenol.** 48:1127-1135. 1997.
- [13] SANTANA, V.J. Ciénaga de Oro. En: **Diccionario Cultural de Córdoba**. 2da Ed. Domus Libri, Santafé de Bogotá, Colombia. Pp 86-90. 1999.
- [14] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). SAS/STAT User's Guide (Release 9.0), Cary, NC, USA. 2001.
- [15] SONG, H.J.; KANG, E.J.; MAENG, G.H.; OCKA, S.A.; LEE, S.L.; YOO, J.G.; JEONA, B.G.; RHO, G.J. Influence of epidermal growth factor supplementation during *in vitro* maturation on nuclear status and gene expression of canine oocytes. **Res. Vet. Sci.** 91:439-445. 2011.