

DIFERENTES FUENTES DE LÍQUIDO FOLICULAR EN EL DESARROLLO *IN VITRO* DE EMBRIONES BOVINOS

DIFFERENT SOURCES OF FOLLICULAR FLUID ON *IN VITRO* DEVELOPMENT OF BOVINE EMBRYOS

Larocca, C.*¹, J. Calvo², I. Lago¹, G. Roses¹ y M. Viqueira¹

*¹Area Biotecnología de la Reproducción. Facultad de Veterinaria. Las Placas 1550. CP.11600. Montevideo. Uruguay. E-mail: cloral@adinet.com.uy.

²Departamento de Morfología y Desarrollo. Facultad de Veterinaria. Las Placas 1550. CP. 11600. Montevideo. Uruguay. E-mail: cloral@adinet.com.uy

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Ovocito. Bovino. Licor folicular.

ADDITIONAL KEYWORDS

Oocyte Bovine. Follicular fluid.

INTRODUCCIÓN

Diversos autores han estudiado el efecto del suero de vaca en celo (SVC) y líquido folicular bovino (LFb) en el medio de maduración *in vitro*, y en el medio de desarrollo (Larocca *et al.*, 1993; 1997).

Se ha estudiado el efecto de adicionar LFb a diferentes concentraciones y de diferentes fuentes al medio de maduración *in vitro*, encontrando efectos positivos (Romero y Sidel, 1994; Sirard *et al.*, 1995). La adición de LFb durante la maduración *in vitro* (MIV) apunta principalmente a su efecto sobre los complejos cumulus-ovocito primarios (CCO), (Gordon, 1994). El LFb contiene esteroides, glucosaminoglicanos y muchos otros metabolitos sintetizados por las células de la teca folicular (Larocca *et al.*, 1995a).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del LFb obtenido de folículos de 5-7 y de más de 15 milímetros

de diámetro (pre-ovulatorios), adicionado inmediatamente y a las 48 h de la inseminación *in vitro* sobre el desarrollo embrionario.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron 1888 CCO A y B (First y Parrish, 1987), fueron lavados 3 veces en m-PBS con 5 p.100 de suero de ternero (ST).

Los CCO fueron madurados 22 horas en medio de cultivo TCM-199 (Gibco Lab, Burlington, Ontario, Canada), suplementado con 5 p.100 ST, penicilina/estreptomina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) más 10 p.100 de LFb obtenido de folículos de 5-7 milímetros de diámetro y de los pre-ovulatorios >15 mm. (Holy, 1969).

Se incubaron a 38,5°C, 99 p.100 de humedad relativa y 5 p.100 CO₂ en aire.

El licor folicular bovino fue centrifugado a 800 G durante 30 minutos y el sobrenadante inactivado durante 30 minutos a 56°C.

El semen de dos pajuelas congeladas-descongeladas fue capacitado por centrifugación a 500 G durante 5 minutos, en medio Brackett y Oliphant (BO, Brackett y Oliphant, 1975), sin glucosa, complementado con 4UI/ml heparina (Sigma), y 10 mM de cafeína benzoato de sodio (Sigma). La concentración final del BO se ajustó a 2UI/ml de heparina, 5 mM de cafeína benzoato de sodio y 10 mg/ml de albúmina sérica bovina fracción V (BSA, Sigma) la concentración del semen fue de 1×10^6 espermatozoides/ml. Los CCO (1888) y el semen se co-incubaron en gotas de 100 μ l bajo aceite mineral durante 18 horas.

Los ovocitos en los distintos grupos fueron incluidos en gotas de 100 l de medio de cultivo bajo aceite mineral. El medio de desarrollo fue renovado cada 48 horas.

Se realizaron dos experimentos: En el experimento 1, inmediatamente después de la FIV, 1371 cigotos fueron divididos en 3 grupos. El grupo 1, control (G1)-MCE sin LFb; grupo 2 (G2)- MCE más 20 p.100 de LFb de folículos pre-ovulatorios y grupo 3 (G3)-MCE más 20 p. 100 de LFb de folículos de 5-7 mm de diámetro.

Experimento 2, después de la FIV, 517 cigotos fueron divididos en 3 grupos: control (G1)- MCE. Para los restantes grupos, se adicionó al MCE 48 horas post FIV 20 p.100 de LFb pre-ovulatorio en el grupo 2 (G2), y 20 p.100 de LFb obtenido de los folículos de 5-7 mm de diámetro para el grupo 3 (G3).

La tasa de división (TD) se evaluó

a las 48 horas de la FIV y el desarrollo a morula compacta (MC) y blastocisto (BL) al día 8.

Los resultados se analizaron por el método de Chi-cuadrado complementado con la corrección de Yates.

RESULTADOS

A las 48 horas de la FIV, en el experimento 1, de 1371 CCO dividieron 741. En el G1, 66 embriones desarrollaron a 29 MC, 27 a BL y 10 a blastocistos expandidos (BEx). Para el G2, 105 embriones desarrollaron a 53 MC, 32 BL, y 20 BEx, y para el G3, 95 embriones desarrollaron a 16 MC, 46 BL y 33 BEx. Los resultados se muestran en la **tabla I**.

En el experimento 2 los resultados mostraron que: 251 de 517 CCO dividieron a las 48 horas (TD 48,5 p.100 G1- 90/180, 50 p.100; G2 -87/167, 52,1 p.100 G3- 74/170 43,5 p.100 de los divididos desarrollaron en el G1: 13 MC(14,4 p.100), 10 BL(11,1 p.100) y 3 BEx.(3,3 p.100) total 26/ 90 29,8 p.100; G2 -14 MC(16,0 p.100), 11 BL(12,6 p.100) y 7 BEx,(8,0 p.100) total 32/ 87, 36,8 p.100 y en el G3 -2 MC, 14 BL y 7 BEx, total 23/74 31,0 p.100. No se encontraron diferencias significativas, $p < 0,05$, aunque hubo un mayor desarrollo en el G2 respecto a los otros grupos.

DISCUSIÓN

Los resultados en el experimento 1 mostraron diferencias significativas entre el grupo 2 y el grupo 1 en el desarrollo embrionario. En el experi-

LÍQUIDO FOLICULAR EN EL DESARROLLO *IN VITRO* DE EMBRIONES BOVINOS

Tabla 1. Efecto de la adición de líquido folicular bovino (LFb) inmediatamente a la fertilización *in vitro*. (Effect of the addition of bovine follicular fluid (bFF) immediately after *in vitro* fertilization).

Grupo	n	TD (p.100)	DE/TD (p.100)	DE/n (p.100)
1	428	220/428 ^a (51,4)	66/220 ^a (30,0)	66/428 ^a (15,4)
2	480	259/480 ^a (54,0)	105/259 ^a (40,5)	105/480 ^b (21,9)
3	463	262/463 ^a (56,6)	95/262 ^a (36,3)	95/463 ^{ab} (20,5)
Total	1371	741/1371 (54,0)	266/741 (35,9)	266/1371 (19,4)

Valores en la misma columna con diferentes superíndices difieren significativamente ($p < 0,05$).
Nota (n: número; TD: Tasa de división; DE: Desarrollo embrionario).

mento 2 no se halló diferencia significativa entre los grupos. En ambos experimentos, no se halló diferencia significativa en la TD.

Sirard *et al.* (1995), utilizando LFb provenientes de folículos de 5-10 milímetros de diámetro encontraron un menor desarrollo embrionario al utilizar LFb que al utilizar LFb de folículos dominantes.

El grupo 3 de este trabajo contiene LFb de folículos de 5 a 7 mm de diámetro. Este grupo no tuvo diferencia significativa con el grupo control en el experimento 1, si bien mostró una tendencia a comportarse como el grupo 2, o sea a tener un mayor desarrollo embrionario.

Para confirmar o descartar esta tendencia sería necesario aumentar el número de ovocitos por grupo y de esta forma poder concluir si el LFb de folículos de 5-7 mm de diámetro tiene un efecto positivo o negativo sobre el desarrollo embrionario. Los resultados de Sirard *et al.* (1995), estarían indicando que existe un componente negativo para el desarrollo embrionario en el LFb obtenido de folículos de 5 a 10 mm de diámetro. Los resultados del presente trabajo no coinciden con los de Sirard *et al.*, ya que la adición de LFb de folículos de 5-7 mm diámetro, si bien no mejora significativamente el desarrollo, tiende a ello.

Choi *et al.* (1998), emplearon el LFb como aditivo en el medio de desarrollo, sin obtener un efecto beneficioso sobre la tasa de desarrollo. Este autor concluye la necesidad de una mayor investigación, utilizando LFb derivado de folículos pre-ovulatorios. En nuestros resultados el LFb tuvo un efecto significativo sobre la tasa de desarrollo hasta blastocisto expandido cuando fue adicionado inmediatamente a la FIV en el experimento 1.

En el trabajo de Choi *et al.* (1998), el medio de desarrollo empleado fue TCM 199 en co-cultivo con células de oviducto bovino. En nuestro trabajo, el medio empleado fue CR1aa sin co-cultivo. Existe la posibilidad de que las células oviductales hayan enmascarado los resultados benéficos del LFb en el desarrollo. A partir de los resultados, y dada la escasa bibliografía existente sobre este tema, sería interesante realizar nuevas investigaciones comparando el uso de diferentes medios de desarrollo sin y con diferentes co-cultivos.

De acuerdo a los resultados obteni-

dos en este trabajo podrían existir uno o más factores promotores del desarrollo embrionario, positivos en el LFb.

En conclusión, nuestros resultados indican un efecto favorable del LFb

adicionado inmediatamente a la inseminación *in vitro*, independientemente de si el mismo se obtuvo de folículos entre 5 a 7 mm o de más de 15 mm de diámetro (pre-ovulatorios).

BIBLIOGRAFÍA

- Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 12: 260-274.
- Choi, Y.H., M. Takagi, H. Kamishita, M.P.B. Wijayagunawardane, T.J. Acosta, K. Miyazawa and K. Sato. 1998. Developmental capacity of bovine oocytes matured in two kinds of follicular fluid and fertilized *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, 50: 27-33.
- First, N.L. and J.J. Parish. 1987. *In vitro* fertilization of ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility*, 34: 151-165.
- Gordon, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos, pp: 113-114, CAB INTERNATIONAL, U.K.
- Holý, L. 1969. Biología de la Reproducción Bovina., pp: 59-64, Ciencia y Técnica, Cuba.
- Iritani, A., Z.S. Cheng and K. Utsumi. 1992. Effects of follicular factors on the IVM-IVF bovine oocytes. In: Proceedings of the 20th International Congress on Animal Reproduction (The Hague, The Netherlands) 1: 342-344.
- Larocca, C., S. Kmaid and J. Calvo. 1993. Effect of follicular fluid and oestrus cow serum on maturation, fertilization and development of the bovine oocyte *in vitro*. *Theriogenology*, 39: 253.
- Larocca, C., S. Kmaid, I. Lago, G. Rosés, D. Fila, M. Viqueira and A. Berglavaz. 1997. Influence of follicular fluid from different sources on *in vitro* development of bovine embryos produced *in vitro*. *Theriogenology*, 47: 292.
- Romero, A. and J.E. Seidel, Jr. 1994. Effects of bovine follicular fluid on the maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 41: 383-394.
- Shellander, K., F. Fuhrer, B.G. Brackett, H. Korb and W. Schelger. 1990. *In vitro* fertilization and cleavage of bovine matured oocytes in medium supplemented with oestrus cow serum. *Theriogenology*, 33: 477-485.
- Sirard, M.A., F. Roy, B. Patrick, P. Merimillod and L.A. Guilbault. 1995. Origin of the follicular fluid added to the media during bovine IVM influences embryonic development. *Theriogenology*, 44: 85-94.

Recibido: 25-6-03. Aceptado: 13-2-04.

Archivos de zootecnia vol. 53, núm. 203, p. 332.