

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación
Suplementación con el factor IGF-I en el medio de maduración sobre la
producción *in vitro* de embriones bovinos

Estudiantes

Ángel Faustino Ayala Artica
Rufino Daniel Martínez Díaz

Asesores

John Jairo Hincapie, D.Sc.
Rogel Castillo, M.Sc.

Honduras, junio 2022

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA MARGARITA MAIER ACOSTA

Vicepresidente y Decana Académica

CELIA O. TREJO RAMOS

Directora Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros.....	5
Índice de Figuras	6
Índice de Anexos	7
Resumen	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Ubicación Experimental	14
Condiciones Experimentales	14
Metodología.....	16
Día -1: Recolección, Acondicionamiento de Ovarios y Aspiración Folicular	16
Día 0: Fertilización in vitro (FIV)	18
Día 1: Cultivo in vitro (CIV)	20
Tratamientos.....	21
Variables para Analizar	21
Diseño Experimental y Análisis Estadístico	21
Resultados y Discusión.....	22
Recolección de Ovocitos	22
Porcentaje de Maduración (MIV)	23
Porcentaje de Fertilización in vitro (FIV).....	24
Porcentaje de Clivaje y Apoptosis.....	25
Porcentaje de Mórulas y Blastocistos	27
Porcentaje de Embriones.....	28
Eficiencia General	29
Conclusiones	31
Recomendaciones.....	32

Referencias.....	33
Anexos.....	36

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Descripción de las soluciones madre, medios base, volúmenes a utilizar y suplementación de los diferentes medios Minitube® (Alemania) a utilizar en el protocolo de PIV.....	15
Cuadro 2 Soluciones stock para la suplementación de los medios Minitube® (Alemania).....	16
Cuadro 3 Metodología para preparar la solución 10X SP-TL.....	18
Cuadro 4 Metodología para la preparación de Percoll 90%.....	19
Cuadro 5 Valores porcentuales de ovocitos madurados para MIV+ IGF-I y MIV control.....	24
Cuadro 6 Valores porcentuales de ovocitos fertilizados, en clivaje y apoptosis al tercer día para MIV+ IGF-I y MIV control.....	26
Cuadro 7 Valores porcentuales de embriones y su categoría para MIV y MIV+ IGF-I.....	29
Cuadro 8 Eficiencia del procedimiento de PIV, relacionando los embriones producidos con los ovocitos viables, madurados, fertilizados y clivaje para MIV y MIV+ IGF-I.....	30

Índice de Figuras

Figura 1 Día -1: ovocitos aspirados y viables	23
Figura 2 Izquierda: ovocitos madurados con IGF-I. Derecha: ovocitos madurados control	24
Figura 3 Ovocitos fecundados a las 18 horas. Derecha: Línea de clivaje. Izquierda: segundo cuerpo polar	25
Figura 4 Ovocitos en proceso de clivaje a las 72 horas de cultivo <i>in vitro</i> . Derecha: tratamiento con IGF-I. Izquierda: Tratamiento control.....	25
Figura 5 Derecha: MIV + IGF-I Blastocistos expandidos al día 7. Izquierda: MIV Control Blastocistos expandidos al día 7	27
Figura 6 Blastocistos protruyendo al día 9.....	28
Figura 7 Composición del blastocisto protruido	29

Índice de Anexos

Anexo A Acondicionamiento de Ovarios	36
Anexo B Aspiración folicular y preparación de gotas de lavado de colección y maduración.....	37
Anexo C Microgotas flotantes para maduración <i>in vitro</i>	38
Anexo D Descongelación de semen, medio para capacitación con semen y percoll 90%-45% luego de primera centrifugación y medio de acondicionamiento de semen luego se la segunda centrifugación	39
Anexo E Ovocitos madurados transferidos a placas nunc de fertilización	40

Resumen

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la suplementación con el factor IGF-I en el medio de maduración sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos; se obtuvieron 41 ovarios de vacas faenadas de los cuales se aspiraron un total de 413 ovocitos, logrando 370 viables, para luego ser distribuidos entre los dos tratamientos: 183 para IGF-I y 172 para control. Se utilizaron los medios de maduración (MIV), fertilización (FIV) y cultivo (CIV) de Minitube® para cada etapa del proceso de producción *in vitro*. El diseño experimental utilizado fue Completamente al Azar (DCA) con dos tratamientos (MIV + IGF-1 y MIV control); Para el análisis de los datos se utilizó la prueba de distribución de frecuencias Chi-Cuadrado (χ^2) con la ayuda del programa Statistical Analysis Systems con un nivel de significancia exigido de $P \leq 0.05$. Se encontraron diferencias significativas entre IGF-I y Control en cada una de sus fases de maduración, fertilización, clivaje y embriones de: 88.52 y 77.91%; 87.72 y 67.91%; 82.09 y 70.33%; 66.36 y 48.44%, respectivamente. De igual manera la mejor eficiencia en todo el proceso de producción *in vitro* (PIV) entre embriones/ovocitos viables, madurados, fertilizados y en clivaje fue de: 39.89% y 18.02; 45.06% y 23.13%; 54.48% y 34.07%; 66.36% y 48.44% para el tratamiento con IGF-I y Control, respectivamente. Bajo las condiciones de este estudio los mayores porcentajes de maduración y fertilización *in vitro*, clivaje y blastocistos se obtuvieron con la suplementación de IGF-I en el medio de maduración *in vitro*.

Palabras clave: Apoptosis, competencia oocitaria, fertilizados.

Abstract

The objective of this investigation was to determine the effect of supplementation with IGF-I factor in the maturation medium on the *in vitro* production of bovine embryos. A total of 41 ovaries were obtained from culled cows from which a total of 413 oocytes were aspirated, obtaining 370 viable oocytes, which were distributed between the two treatments: 183 for IGF-I and 172 for the control. Minitube® maturation (IVM), fertilization (IVF) and culture (CIV) media were used for each stage of the *in vitro* production. The experimental design used was completely randomized (CRD) with two treatments: IVM + IGF-1 and IVM which was the control treatment, the Chi-square (χ^2) frequency distribution test was used and for data analysis the Statistical Analysis System software with a required significance level of $P \leq 0.05$. There were significant differences between IGF-I and Control treatment in each of their maturation, fertilization, cleavage and embryo stages of: 88.52 and 77.91%; 87.72 and 67.91%; 82.09 and 70.33%; 66.36 and 48.44%, respectively. In addition, the highest efficiency in the whole *in vitro* production (IVP) process among viable, matured, fertilized and cleavage embryos/oocytes were 39.89% and 18.02%; 45.06% and 23.13%; 54.48% and 34.07%; 66.36% and 48.44% for IGF-I treatment and control, respectively. Under the conditions of this study, the highest percentages of maturation and *in vitro* fertilization, cleavage and blastocysts were obtained with IGF-I supplementation in the *in vitro* maturation medium.

Keywords: Apoptosis, oocyte competition, fertilized.

Introducción

En la actualidad se comprende por biotecnología de la reproducción animal a todos los procedimientos realizados en un laboratorio de manera secuencial buscando la mejoría genética ya sea en ganado para producción de carne o producción de leche para selección de los reproductores a través de su prosapia (Palma 2018). Estos pueden ser desde inseminación artificial, capacitación espermática, producción de embriones *in vitro*, como aspiración folicular, incluso, la clonación. Todo esto con el fin de eficientizar los rendimientos en reproducción con el estudio a realizar (Peña et al. 2007).

Hay mucho que explorar en este campo ya que hay interrogantes sin resolver, pero los principales propósitos de estos estudios es comprender a los mecanismos celulares y moleculares de la interacción genética, que llevan en el último paso a la fecundación y crecimiento embrionario. Cada uno de estos procesos son afectados por varios factores que deben ser controlados de manera efectiva para no obtener pérdidas a nivel de gametos masculinos en el tracto de la hembra, ya que al ingresar al tracto reproductor de la hembra pasan por una serie de cambios en la estructura del espermatozoide donde sabremos si estos están capacitados o no para realizar el recorrido final hasta la fecundación (Ambria Garcia et al. 2010).

Esto es influenciado en gran manera por la genética, puede haber rangos hereditarios que afecten estos procesos en su gran mayoría, la alimentación proporcionada al semoviente, en gran medida ha tenido una influencia durante el desarrollo folicular de la hembra y su reproducción, en esto deben verse los intervalos inter parto que van a dar efecto referente a la producción de leche y el número de terneros en el año (Roche y Diskin 2005).

Para comprender de mejor manera lo anterior se deben conocer tanto los procesos *in vitro* como *in vivo*, todo esto es mediante el desarrollo folicular que puede ser realizado con el animal en vida o *post mortem*, se deben controlar los tiempos y temperaturas para que los ovocitos se conserven en buen estado (Palma 2018). Los ovocitos se clasifican en cuatro categorías por la morfología que

presenten para luego seguir con la maduración de ovocitos, luego de esto se procede a la fertilización *in vitro*, hasta obtener éxito con el cultivo embrionario (Palma et al. 2008).

Para la maduración de ovocitos *in vivo* se deben pasar procesos como la maduración nuclear y la citoplasmática, en las cuales actúan diferentes factores de crecimiento, como el factor de crecimiento semejante a insulina tipo I (IGF-I), factor de crecimiento epidérmico (EGF) entre otros (Fernandez Hernandez 2005).

El factor de crecimiento similar a la insulina es importante en foliculogénesis, ovario, ciclo estral, gestación, periodo posparto y el estado nutricional de la hembra bovina, estando presente en todas las etapas que una hembra debe experimentar durante su vida. IGF-I e IGF-II fueron identificados en 1957 (Daughday y Salmon 1957).

El IGF-I también es secretado por el hipotálamo, epitelio secretor del oviducto, ovario y glándulas endometriales del útero, también cabe mencionar que está relacionado de manera estructural con la proinsulina (Fernandez Hernandez 2005). A medida aumenta en edad la vaca, esta va perdiendo la capacidad de generar el IGF-I y perdiendo eficiencia en la gestación, también se debe tomar en cuenta que tiene una amplia relación con el transporte del espermatozoide desde las capacidades de este por sobrevivir y lograr la fecundación (Osorio et al. 2011).

La pubertad llega y con ella el pico de la hormona luteinizante esto trae consigo el incremento de la concentración del factor IGF-I, con esto se puede afirmar que es un factor importante para el proceso de crecimiento posnatal y prepuberal, a diferencia del factor IGF-II que es de importancia para el crecimiento fetal (Rao et al. 2011).

El IGF-I tiene una función estimuladora en liberación de oxitocina y progesterona que se encuentran en altas concentraciones en los folículos de mayor diámetro, se sintetiza a través de la acción simultánea del estradiol y la hormona folículo estimulante (Hernández Martínez et al. 2020). Esto ayuda a la liberación de la hormona luteinizante (LH) estimulada por (GnRH), además sirve de mediador para que se realice la función de la hormona de crecimiento (GH) en la producción de esta en el hígado (Fernandez Hernandez 2005)

El IGF-I participa en las células de la teca interna y en las membranas de las células de la granulosa regulando sus funciones, donde se detectó una concentración creciente de RNAm, cabe aclarar que hay una mayor concentración de IGF-II dentro de las células de la granulosa, sus funciones serían en primera instancia dentro del tejido del oviducto, en teoría, incrementar la liberación de proteínas en su lumen, para crear un ambiente idóneo para la fertilización y el desarrollo embrionario inicial. El IGF-I estimula la mitogénesis y esteroidogénesis en las células ováricas (Lenz Souza et al. 2007).

El IGF-I e IGF-II como se mencionó, tiene una función reguladora en cuanto la foliculogénesis todo esto por la interacción que existe entre esteroides, FSH, factores de crecimiento, la diferencia entre ellas y la supervivencia de las células foliculares y otras hormonas que controlan el desarrollo de los folículos y su supervivencia (Granada Ybern 2006).

Cabe aclarar que la salud de los folículos toma un papel importante, mientras más sanos y sean de mayor diámetro sean los folículos tienen una relación positiva en cuanto a sus niveles séricos (Rosete Fernandez et al. 2020). En consecuencia, de esto el IGF-I crea el estímulo para la proliferación y la llamada esteroidogénesis de las células en los ovarios, actúa como un mecanismo de amplificación para la acción de gonadotrofinas para mejorar el desarrollo folicular (Lenz Souza et al. 2007).

El IGF-1 es un polipéptido conformado por 72 aminoácidos, en su mayoría cuando es medida por la sangre gran parte de este factor es sintetizado por el hígado y otros órganos de vital importancia siendo este un factor importante en los procesos reproductivos, como ser crecimiento, desarrollo y maduración folicular (Kawashima et al. 2007). El tamaño de los ovarios está debidamente relacionado con los niveles séricos de IGF-I en la sangre teniendo este parte en la función de la producción de las gonadotropinas y ayudan a realizar la síntesis de hormonas esteroideas en los órganos antes mencionados (Khalid et al. 2000).

La maduración de los ovocitos en relación con el IGF-I tiene una relación con la liberación de estrógenos y las hormonas folículo estimulantes haciendo una regulación de estos, teniendo el IGF-I

junto el IGF-II una función determinante en cuanto el crecimiento, la diferenciación y la sobrevivencia de los folículos (Lucy 2000).

Todo esto se ve reflejado cuando este factor tiene una actividad en conjunto con las gonadotropinas, no solo porque ayuda a incrementar los receptores de la FSH y LH, si no por el apoyo a los sistemas receptores de los mensajeros en segundo grado para las hormonas antes mencionadas. También cabe mencionar que las gonadotropinas incrementan el porcentaje de receptores para IGF-I llamados receptores de tipo I, lo cual ayuda a sintetizar el IGF-I en las células de la granulosa (Lenz Souza et al. 2007; Sudo et al. 2007).

Con base en lo anterior, se realizó la presente investigación, la cual tuvo como objetivos específicos: Determinar los porcentajes de maduración, fertilización y clivaje *in vitro*; Determinar el porcentaje de embriones *in vitro* (mórulas y blastocistos); Evaluar la eficiencia del proceso de producción *in vitro* (PIV) de embriones bovinos, suplementando el medio de maduración con IGF-I.

Materiales y Métodos

Ubicación Experimental

La investigación se llevó a cabo entre febrero-julio de 2022 en las instalaciones del Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, a 32 km de Tegucigalpa, con una temperatura promedio de 24 °C, y 800 msnm y una precipitación promedio anual de 1,100 mm.

Condiciones Experimentales

Se utilizaron ovarios provenientes de vacas faenadas en la planta de procesamiento Empresa Agropecuaria S.A (EMPASA), localizada a 5 km de las instalaciones del laboratorio de reproducción animal. En general, todos los materiales que entraron en contacto con los ovocitos y el semen se encontraban atemperados a 38 °C por lo menos dos horas antes de realizar cada una de las diferentes maniobras. Se utilizaron las soluciones madre suministradas por Minitube® (Alemania), los cuales se describen a continuación (Cuadro 1) cada uno con su respectiva suplementación acorde al día que se va a utilizar.

Cuadro 1

Descripción de las soluciones madre, medios base, volúmenes a utilizar y suplementación de los diferentes medios Minitube® (Alemania) a utilizar en el protocolo de PIV.

Solución madre	Referencia	Medio base	Volumen a utilizar	Suplementar el día de la maniobra	Esterilizar por filtración a 0.22µm
Medio de recolección y mantenimiento de ovocitos (MCO)	19990/0050	TL-HEPES	20 mL	BSA 120 mg	No
Medio de maduración de ovocitos (MMO)*	19990/0010	TCM 199	9 mL	OCS 1 mL FSH 100 µL solución stock LH 50 µL solución stock BSA 60 mg	Si
Medio de acondicionamiento espermático	19990/0020	TL	10 mL	Piruvato de sodio 500 µL solución stock Gentamicina 10 µL solución stock BSA 60 mg	Si
Medio de fertilización	19990/0030	TL	10 mL	Piruvato de sodio 100 µL solución stock Heparina 200 µL solución stock OCS 1 mL Aminoácidos esenciales 400 µL Aminoácidos no esenciales 100 µL Gentamicina 500 µL solución stock	Si
Medio de cultivo SOF (Fluido Sintético de Oviducto)	19990/0041	SOF	10 mL		Si

Nota. HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-etanosulfónico; BSA: Suero Albúmina Bovino; OCS: suero de vaca en celo; TCM: Tissue

Culture Medium; TL: Tyrode Lactato; FSH: Hormona Folículo Estimulante; LH: Hormona Luteinizante.

*el medio de maduración para el tratamiento de la investigación estará suplementado además con 10 µM /mL de IGF-I.

Todas las soluciones madre se conservan a 4 °C. Las soluciones de MMO, acondicionamiento espermático y fertilización se deben preparar tres horas antes de la maniobra y colocarlas a equilibrar en la incubadora a 5% de CO₂, 20% O₂ y 38.5 °C con saturación de humedad relativa. La solución madre de cultivo SOF debe ser equilibrada igualmente tres horas antes a 5% de CO₂, 5% O₂ y 38.5 °C con saturación de humedad relativa. La solución para la recolección y mantenimiento de ovocitos MCO se equilibra a 38.5 °C. Durante todo el procedimiento siempre se conservará la relación de 1 ovocito y/o cigoto/10 µL de medio. El Cuadro 2 presenta las diluciones de las soluciones stock para la suplementación de medios.

Cuadro 2

Soluciones stock para la suplementación de los medios Minitube® (Alemania).

Suplemento	Fuente de suministro	Código	Dilución
OCS (bovina)*	Elaboración propia		
FSH (bovina)*	Sioux Biochemical Inc.	715	50 UI en 10 mL de SSF NaCl estéril
LH (bovina)*	Sioux Biochemical Inc.	725	25 UI en 5 mL de SSF NaCl estéril
BSA**	SIGMA	A3311	
Piruvato de sodio*	SIGMA	P4562	11 mg en 5 mL de DPBS
Gentamicina*	SIGMA	G3632	50 mg en 1 mL de DPBS
Heparina*	SIGMA	H3149	20 mg en 10 mL de DPBS
Aminoácidos esenciales**	SIGMA	B6766	
Aminoácidos no esenciales**	SIGMA	M7145	

Nota. DPBS: Dulbeccos PBS, preparar y almacenar en alícuotas a -20°C. Descongelar a temperatura ambiente. SSF: Solución Salina

Fisiológica.

*almacenar a -20°C

**almacenar a 4°C

Metodología

Día -1: Recolección, Acondicionamiento de Ovarios y Aspiración Folicular

Para la recolección de los ovarios se utilizaron solución de transporte preparada el mismo día de la maniobra, la cual consiste en 1 litro de SSF suplementada con penicilina 500 mg/L + estreptomina 100,000 UI/L y atemperada a 38 °C. De igual manera se preparó la solución de recolección y mantenimiento de ovocitos y la solución de maduración (Cuadro 1), de la cual se prepararon las placas de maduración elaborando microgotas flotantes de 100 µL colocando 8 gotas/placa Petri de 60 mm, cubiertas con aceite mineral y equilibradas tres horas antes de iniciar la aspiración folicular. Una vez colectados los ovarios en la planta de faenado fueron llevados al laboratorio de reproducción animal en un tiempo no mayor a seis horas.

Una vez en el laboratorio se procedió a eliminar los restos de tejidos peri ováricos, grasa y restos de trompas uterinas (acondicionamiento), para luego lavarlos por tres ocasiones en SSF atemperada a 38 °C a fin de retirar los restos de sangre.

Posteriormente se inició con la etapa de aspiración folicular para lo cual se utilizaron jeringas de dos piezas de 5 mL y agujas 18 × 1½", aspirando todos los folículos ováricos entre 2-10 mm de diámetro aproximadamente. El fluido folicular fue depositado en un tubo Falcón de policarbonato de

50 mL el cual fue atemperado a 38 °C colocado en una gradilla en el baño maría. Terminado el proceso de aspiración se dejó reposar el tubo por un espacio de 15-30 minutos a fin de que los ovocitos (Complejos Cumulus-Ovocitos COC) se precipiten al fondo del tubo y de esta manera poder eliminar el sobrenadante.

Se recomienda eliminar el sobrenadante con pipeta Pasteur muy suavemente evitando crear turbulencia y pipeteando al lado de mayor volumen, dejando en el fondo entre 7-10 mL de fluido folicular con el precipitado. Luego se agregó 5 mL de MCO para rediluir el pellet y vaciar todo el contenido en una placa grid, se lavó cuatro veces el tubo falcon a fin de evitar que se quedaran ovocitos adheridos a las paredes del tubo.

Se comenzó la búsqueda en la lupa estereoscópica utilizando la pipeta Drummond de 5 µL. Preparar una placa Petri en X, colocando en los tres primeros pozos 600 µL de medio MCO y en el cuarto 1000 µL de MMO a fin de realizar tres lavados en MCO y un lavado en MMO de los ovocitos seleccionados. A medida que se buscan los ovocitos, se clasificaron y seleccionaron, utilizando solo los ovocitos categoría I y II acorde a la clasificación de Minitube (s.f.) (los ovocitos con categorías I y II deben presentar más de tres filas de células del *cumulus oophorus*, zona pelúcida íntegra y citoplasma homogéneo y oscuro).

Los ovocitos seleccionados fueron repartidos aleatoriamente en las placas de maduración, tratando de colocar la mitad en el grupo control y la otra mitad en el grupo tratamiento (medio de maduración suplementado con IGF-1: 10 µM /mL). El proceso de maduración en la incubadora a 5% de CO₂ y 20% de O₂ con 38.5 °C de temperatura duró 24 horas contadas a partir del momento que se aspiró el primer folículo ovárico.

Reconstitución: reconstituir en agua. La actividad biológica se calcula mediante la proliferación dependiente de la dosis de células murinas BALBC/3T3. ED50 corresponde a una actividad específica de al menos 1×10^5 unidades/mg.

Día 0: Fertilización *in vitro* (FIV)

Transcurridas las 24 horas, los ovocitos fueron sometidos al proceso de fertilización propiamente dicho, el cual consistió en:

Acondicionamiento del semen: cuatro horas antes de cumplirse el tiempo de maduración, se inició con la preparación de las placas de fertilización, para lo cual se utilizaron placas nunc de cuatro pozos, colocando medio de fertilización (Cuadro 1) 600 μ L en cada pozo (no cubrir con aceite mineral) y llevarlas a la incubadora a 5% de CO₂ y 20% de O₂ con 38.5 °C de temperatura; se deben preparar tantas placas acordes al número de ovocitos puestos a madurar. Preparar el medio de acondicionamiento de espermatozoides de acuerdo con el Cuadro 1. De igual manera se preparó el gradiente de Percoll 45-90% que se utilizó para el acondicionamiento del semen.

Para el gradiente de Percoll 45-90% se preparó la solución 10X SP-TL la cual se presenta en el Cuadro 3.

Cuadro 3

Metodología para preparar la solución 10X SP-TL.

Ingrediente	Cantidad
Agua ultrapura	100 mL
NaCl	4.675 g
KCl	0.23 g
NaH ₂ PO ₄ +H ₂ O	0.40 g
HEPES	2.38 g

Nota. Ajustar el pH a 7.3, esterilizar por filtración en 0.22 μ m. Almacenar a 4 °C.

Una vez preparada la solución 10X SP-TL, se procedió a la preparación de la solución Percoll 90%, la cual se presenta en el Cuadro 4.

Cuadro 4

Metodología Para La Preparación De Percoll 90%

Ingrediente	Cantidad
Solución 10X SP-TL	8 mL
Bicarbonato de sodio	0.168 g
Lactato de Sodio	180 µL
Agitar suavemente hasta que el bicarbonato se disuelva completamente. Luego agregar:	
Percoll	72 mL
MgCl ₂	316 µL
CaCl ₂	156 µL

Nota. Mezclar suavemente, ajustar pH a 7.3-7.45. Esterilizar por filtración en 0.45 µm.

Colocar a equilibrar en la incubadora a 5% CO₂, 20% O₂ con 38 °C un tubo con la tapa suelta, de 14 mL de policarbonato, con 2 mL de Percoll 90%. Simultáneamente diluir en otro tubo de 14 mL, 1 mL de Percoll 90% + 1 mL de medio de acondicionamiento de espermatozoides formando con ello el Percoll 45% y colocarlo a equilibrar con la tapa suelta en la misma incubadora por un espacio mínimo de 2 horas.

Cumplido el tiempo de equilibrio, se preparó por sotoposición el gradiente de Percoll, colocando en el fondo del tubo que contiene el Percoll 45%, de forma muy lenta, los 2 mL de Percoll 90% de tal manera que se formen dos fases que se pueden distinguir a simple vista y colocarlo nuevamente en la incubadora.

Una vez se ha cumplido las 24 horas de maduración, se procedió a retirar de la incubadora las placas de maduración, y se procedió a seleccionar los ovocitos madurados (presentan expansión de las células del *cumulus oophorus*, citoplasma oscuro homogéneo, ausencia de vesículas picnóticas), los cuales fueron lavados tres veces en una placa Petri X con medio de fertilización, depositados en grupos de 60 ovocitos madurados/pozo y llevados nuevamente a la incubadora.

Finalizado el proceso anterior, se procedió a la descongelación del semen, para lo cual se utilizaron dos pajuelas de semen congelado del mismo toro (Brahman), se colocaron en agua a 35 °C durante 45 segundos, se procedió luego a secarlas y posteriormente muy lentamente el semen fue depositado sobre el gradiente de Percoll 45-90% (para ello las pajuelas son montadas en la pistola de inseminación facilitando así la deposición del semen); se llevaron a la centrifuga atemperada a 38 °C

durante 10 minutos a 1000 g; terminado el tiempo de centrifugación, se extrajo el pellet del fondo del tubo y se colocó en el tubo que contiene el medio de acondicionamiento para volverlo a centrifugar a 200 g durante 10 minutos, tiempo al cual se extrajo el pellet y este es diluido en 1000 µL de medio de fertilización.

Para el cálculo de la concentración se tomaron 2 µL de semen y se adicionaron 198 µL de agua destilada agitando suavemente, luego se tomaron 10 µL los cuales se colocaron entre el cubreobjetos y la cámara de conteo de la placa de Neubauer. Se cuentan todos los espermatozoides en los cuatro cuadrados de los bordes de las cámaras de conteo y se calculó el valor medio. Utilizando la fórmula 1, que se indica a continuación, se determinó el volumen de espermatozoides por 400 µL de medio de fertilización para alcanzar una concentración final de 400,000 espermatozoides por pozo.

$$\mu\text{L de solución de espermatozoides/pozo} = 400,000 / (\text{Media de espermatozoides/cuadrado}) \times 1000 \quad [1]$$

Una vez realizado el cálculo se procedió a realizar la fertilización de cada pozo con la cantidad calculada y se colocó nuevamente las placas en la incubadora a 5% CO₂, 20% de O₂ y 38 °C de temperatura con humedad relativa a saturación durante 18 horas.

Día 1: Cultivo *in vitro* (CIV)

Para esta maniobra se prepararon las placas de cultivo tres horas antes de cumplirse las 18 horas del tiempo de fertilización. En las placas de cultivo se colocaron microgotas flotantes de 250 µL de medio de cultivo SOF (Cuadro 1) en cada pozo de la placa nunc y fueron cubiertas con aceite mineral, para luego ser equilibradas en la incubadora a 5% de CO₂, 5% de O₂ y 38 °C de temperatura con saturación de humedad relativa.

Cumplido el tiempo de fertilización, se realizó el proceso denominado desempaque en el cual los presuntos cigotos fueron colocados en un tubo Eppendorf de 1.5 mL el cual contiene 100 µL de Hialuronidasa + 900 µL de SOF y llevados durante cinco minutos a la incubadora, tiempo al cual fue retirado muy suavemente con pipeta Pasteur un volumen de 700 µL y llevado al vortex durante cinco minutos, a fin de eliminar las células del *cumulus oophorus*.

Al finalizar el proceso del vortex, el contenido del tubo Eppendorf fue depositado en una placa Petri de 100 mm, practicando cinco lavados al tubo Eppendorf con medio SOF a fin de evitar que algunos presuntos cigotos queden adheridos a la pared del tubo. Se procedió a ubicar los presuntos cigotos y pasarlos por tres gotas de lavado con medio SOF y luego depositados en las placas de cultivo con medio SOF en proporción de 25 cigotos/pozo y se llevaron a la incubadora a 5% de CO₂ y 5% de O₂ y 38 °C de temperatura durante siete días.

Al cabo de 72 horas de cultivo se evaluó la tasa de división celular (clivaje) y se realizó la suplementación con 10% de Suero Fetal Bovino (25 µL/gota de 250 µL). Al día siete se realizó la evaluación de la tasa de producción de mórulas y blastocistos utilizando la fórmula 2:

$$\frac{\text{\# embriones segmentados}}{\text{\# embriones colocados inicialmente}} \times 100 \quad [2]$$

Tratamientos

Se desarrollaron dos tratamientos:

Medio de Maduración *in vitro* suplementado con IGF-1 (10 µM /mL).

Medio de Maduración *in vitro* sin suplementar (control).

Variables para Analizar

Las siguientes variables fueron analizadas:

Porcentaje de maduración y fertilización *in vitro*

Porcentaje de clivaje (división celular) y apoptosis (muerte celular)

Porcentaje de embriones obtenidos (mórulas-blastocistos)

Eficiencia general

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con dos tratamientos (MIV + IGF-I y MIV control) y 183 y 172 ovocitos para MIV + IGF-I y MIV control respectivamente. Para el análisis de los datos se utilizaron pruebas de distribución de frecuencias Chi-Cuadrado (χ^2) con la ayuda del programa estadístico Statistical Analysis Systems (SAS® 2014 versión 9.4), con un nivel de significancia exigido de $P \leq 0.05$.

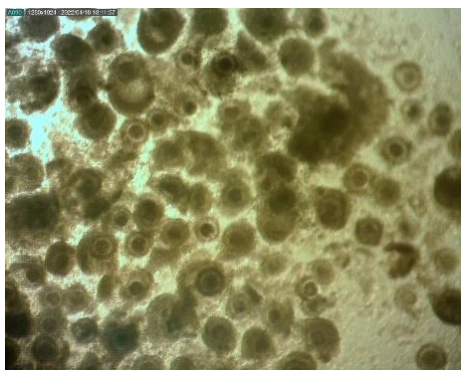
Resultados y Discusión

Recolección de Ovocitos

Mediante la técnica de punción de los folículos ováricos se procesaron en total 41 ovarios de vacas *post mortem*, consiguiendo un total de 413 ovocitos aspirados, resultando un promedio de 10.09 ovocitos aspirados por ovario, y un promedio de 8.6 ovocitos viables/ovario y 1.4 ovocitos degenerados/ovario. Para el tratamiento MIV +IGF-I se aspiraron 21 ovarios de los que se obtuvo un total de 203 ovocitos aspirados, obteniendo un promedio de 183 (90.15%) viables dejando 20 (9.85%) ovocitos degenerados, un promedio de 8.71 ovocitos viables por ovario y un para el tratamiento control, se aspiraron 20 ovarios, de los cuales obtuvo un total de 210 ovocitos aspirados, con un promedio de 10.5 ovocitos por ovario, de los cuales se obtuvo un total de 172 (81.90%) ovocitos viables dejando 38 (18.1%) ovocitos degenerados, dando un promedio de 8.6 ovocitos degenerados por ovario (Figura 1). En un estudio realizado por (Alvarado Ulloa 2017), sobre la calidad de ovocitos provenientes de vacas de matadero y criollas, obtuvo una tasa de recuperación de 67.2% mediante la aspiración folicular y 55.7% por medio de la técnica OPU, dichos valores son menores a los obtenidos en el presente estudio. Estas diferencias coinciden con lo expuesto por Mucci (2016) quien concluye que la cantidad de ovocitos recuperados de ovarios de vacas faenadas es mayor al que se recupera cuando se utiliza la técnica OPU.

Figura 1

Día -1: ovocitos aspirados.



Porcentaje de Maduración (MIV)

Para que la maduración de los ovocitos sea exitosa deben presentar el citoplasma homogéneo y un mínimo de tres capas de células del *cumulus oophorus*. Las diferencias encontradas fueron significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos siendo el MIV + IGF-I el que tuvo el mayor porcentaje de ovocitos madurados superando en un 10.61% al tratamiento control (Cuadro 5, Figura 2). Estos resultados son similares a los encontrados por Yang et al. (2022) quienes suplementando el medio de maduración con FSH+ IGF-I obtuvieron un 2.28% más de ovocitos madurados en comparación con el tratamiento control. .

Según Lenis et al. (2010), la adquisición de la competencia nuclear y citoplásmica ocurre durante dos fases del desarrollo del ovocito en la etapa de maduración. La primera es de crecimiento, donde ocurren arreglos moleculares y reorganización de organelos en el ooplasma. La segunda fase de crecimiento, donde ocurre el reinicio de la meiosis para lograr finalmente el número haploide de cromosomas que se complementarán con los paternos para el desarrollo del nuevo individuo.

De acuerdo con Ortega Torres y Ariza Botero (2012) el desarrollo del ovocito consta de las fases de crecimiento, capacitación durante la dominancia folicular y maduración final, que juega un papel clave en la adquisición de la competencia total para el desarrollo. Se comprobó mediante un estudio realizado por Sirotkin et al. (2003) que el IGF-I y la oxitocina están correlacionadas en el proceso de desarrollo del tamaño folicular entre otras hormonas.

Camargo et al. (2006) establecen que algunos de los factores que afectan la producción *in vitro* de embriones se encuentran en los folículos y la competencia ovocitaria, la cual aumenta en ovocitos aspirados de folículos de mayor tamaño. Los folículos de menor tamaño pueden ser menos competentes porque aún no alcanzan la competencia citoplasmática o porque ya están en un estado avanzado de atresia; Khalid et al. (2000) determinaron que los folículos de mayor diámetro tienen una función sinérgica entre la FSH y el estradiol esto a pesar del rol progesterónico de las células granulosas.

Durante la MIV de ovocitos bovinos, se ha comprobado que el tratamiento con EGF y IGF-I estimula la expansión del *cumulus oophorus* (Figura 2), el metabolismo oxidativo y la maduración nuclear (Rieger et al. 1998) . Por otro lado, también aceleran el proceso de meiosis de los ovocitos al aumentar la actividad de la ribonucleasa H1 y MAP cinasa (Sakaguchi et al. 2002).

Cuadro 5

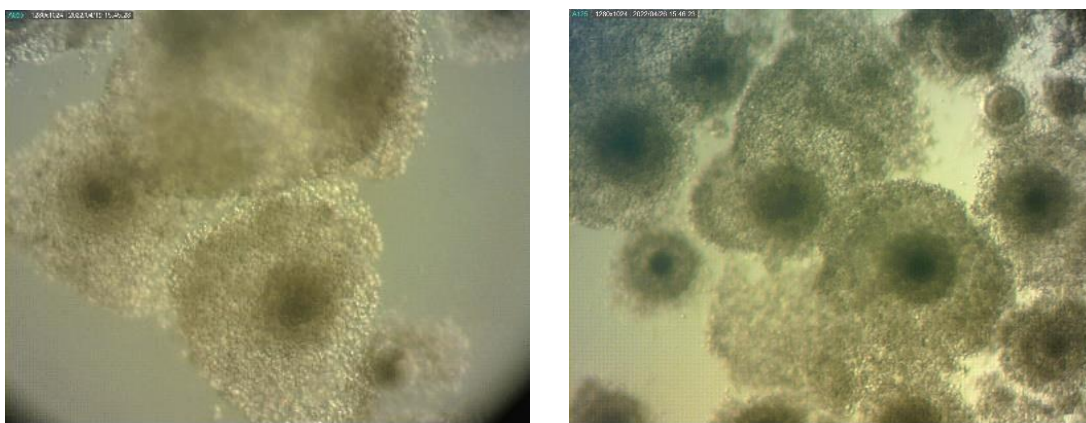
Valores porcentuales de ovocitos madurados para MIV+ IGF-I y MIV control.

Tratamiento	Ovocitos madurados (%)
MIV + IGF-I	88.52
MIV Control	77.91
CV	8.8058
Probabilidad	0.0072

Nota. CV: Coeficiente de variación; IGF-I: factor de crecimiento similar a la insulina I

Figura 2

Izquierda: ovocitos madurados con IGF-I. Derecha: ovocitos madurados control.



Porcentaje de Fertilización *in vitro* (FIV)

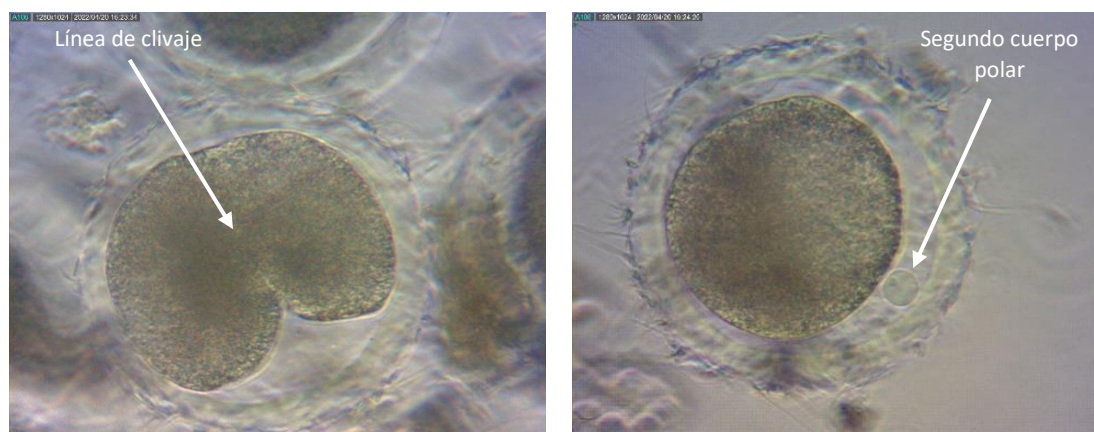
Las diferencias fueron significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 6), siendo el tratamiento con IGF-I el que obtuvo el mayor porcentaje de fertilización superando al tratamiento control en 14.81%. Estos resultados superan los reportados por Palma et al. (1997) quienes obtuvieron 71% de fertilización utilizando IGF-I en una concentración de 100 ng/mL , mientras que para el control 60%. Sin embargo, de acuerdo con McEvoy et al. (2000), el alcanzar la etapa de blastocisto no garantiza que el embrión resulte apto para desarrollarse, por lo que es esencial, que los embriones que alcancen

la etapa de blastocisto sean de la mejor calidad posible para asegurar óptimos porcentajes de gestación después de su transferencia (Lonergan et al. 2003).

Para que se tome en cuenta si un ovocito fue fertilizado el espermatozoide tuvo que penetrar el *cumulus oophorus* del ovocito, así llegando a la zona pelúcida y desencadenar la reacción acrosómica, llevando a cabo la formación de una célula diploide llamada cigoto y la expulsión del segundo cuerpo polar (el primero desaparece en la maduración en metafase II, pero no se alcanza a ver debido a que está lleno de células del *cumulus*) para luego empezarse a dividir (Figura 3).

Figura 3

Ovocitos fecundados a las 18 horas. Izquierda: Línea de clivaje. Derecha: segundo cuerpo polar.



Porcentaje de Clivaje y Apoptosis

La división celular embrionaria (clivaje) que se obtuvo fue significativa ($P \leq 0.05$) entre el tratamiento con IGF-I y el control, superando el tratamiento con IGF-I en 11.76% al control (Figura 4). Estos resultados son similares a los obtenidos por Palma et al. (1997) quienes obtuvieron 81.7% de clivaje para el tratamiento del medio de maduración + IGF-I y para el control un clivaje de 77%.

Se calcula que en promedio los laboratorios pierden entre el 60 y el 70% de los ovocitos maduros *in vitro*, debido a que posterior a la fertilización el cigoto es incapaz de sobrellevar el clivaje exitosamente y se bloquea antes de alcanzar el estadio de blastocisto, lo que se conoce como pérdida de la competencia ovocitaria (Lenis et al. 2010)

De acuerdo con Zamora et al. (2005) la apoptosis es un mecanismo fisiológico de muerte celular asociada a ciertos cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares que requieren una regulación coordinada de genes específicos. Su función principal es mantener tejidos y órganos de una muerte celular controlada para así lograr un adecuado balance entre la muerte y la proliferación celular.

En cuanto a la apoptosis, las diferencias encontradas fueron significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos siendo el MIV + IGF-I el que presentó un menor porcentaje (11.76%) de muerte celular programada (apoptosis) en comparación con el control. Algunos trabajos han comprobado que la adición de IGF-I, al medio de cultivo, disminuye significativamente la apoptosis en los embriones tratados con inductores de apoptosis (Fabian et al. 2004). Normalmente la apoptosis sucede por una mala reprogramación del genoma, cuando inicia la división, esto confirmó el efecto protector que se venía señalando para el IGF-I frente a la apoptosis causada por el cultivo *in vitro* (Kurzawa et al. 2001)

Cuadro 6

Valores porcentuales de ovocitos fertilizados, en clivaje y apoptosis al tercer día para MIV+ IGF-I y MIV control.

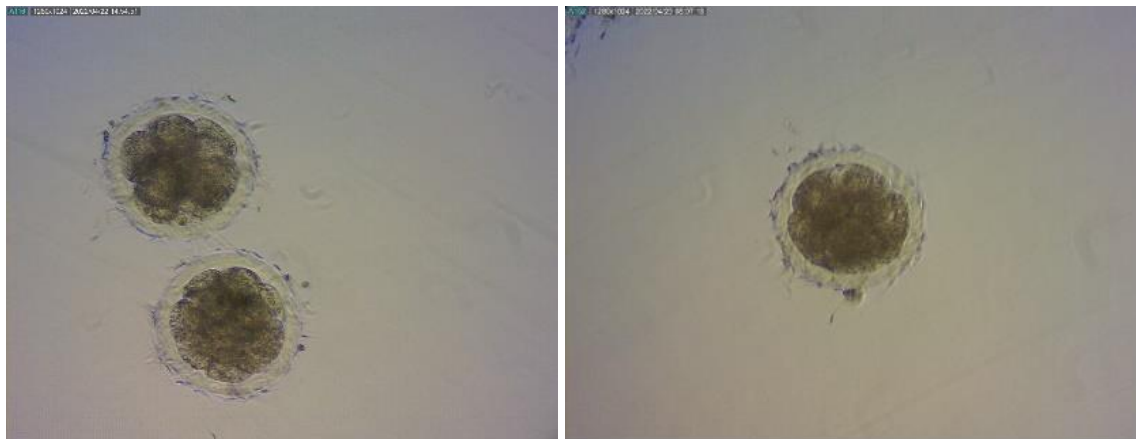
Tratamiento	Ovocitos Fertilizados (%)	Ovocitos	
		Clivaje (%)	Apoptosis al día 3 (%)
MIV + IGF-I	82.72	82.09	17.91
MIV Control	67.91	70.33	29.67
CV	11.6267	9.2388	19.413
Probabilidad	0.003		0.0387

Nota. CV: Coeficiente de variación; IGF-I: factor de crecimiento similar a la insulina I

Figura 4

Ovocitos en proceso de clivaje a las 72 horas de cultivo in vitro. Izquierda: tratamiento con IGF-I.

Derecha: Tratamiento control.

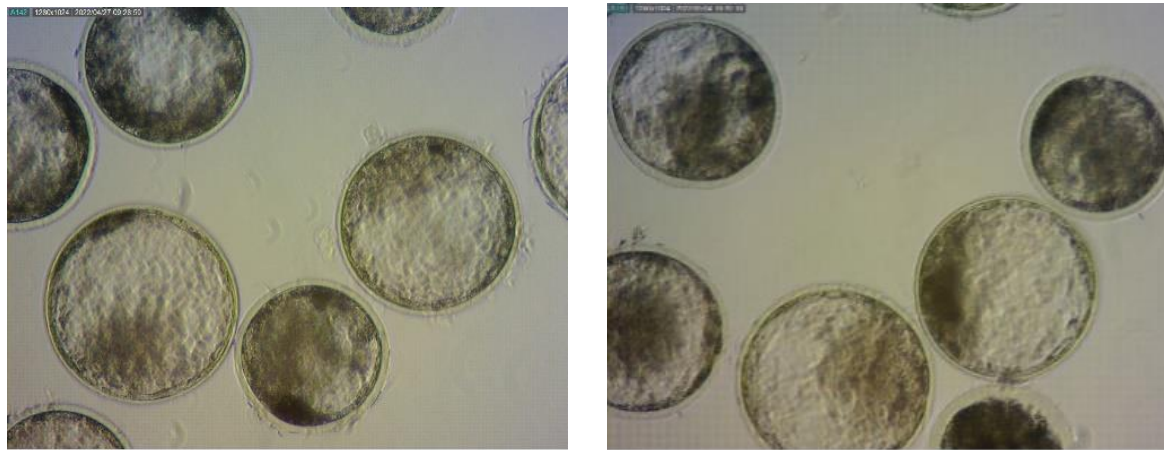
**Porcentaje de Mórulas y Blastocistos**

Las diferencias encontradas fueron significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos; el menor porcentaje de mórulas fue obtenido con el MIV + IGF-I (Cuadro 7), de igual manera el mayor porcentaje de blastocistos se obtuvo con el MIV + IGF-I superando al control en 20.51% (Figura 5 y 6).

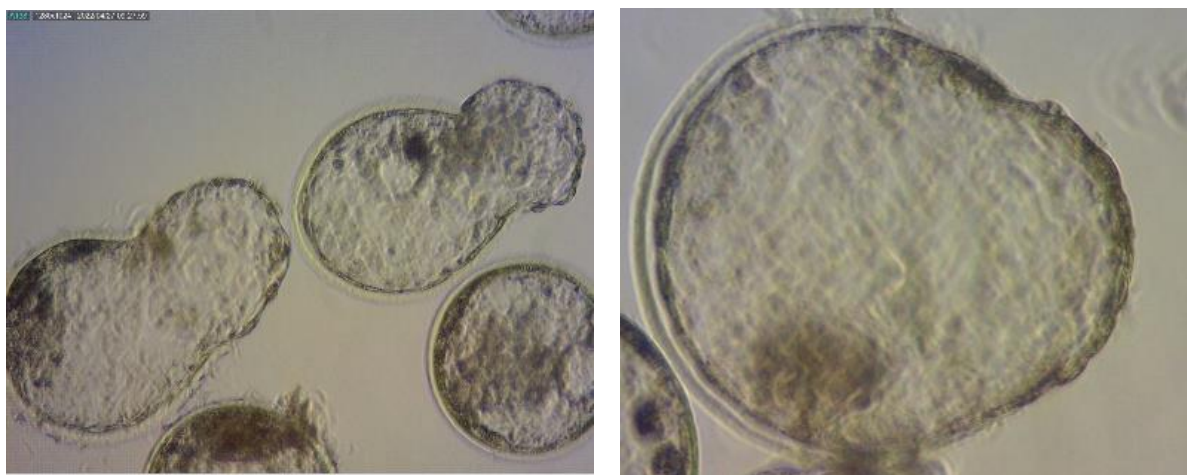
Este aspecto es de suma importancia, ya que de acuerdo a Cutini et al. (2000) los mejores resultados en tasas de preñez se obtienen utilizando blastocistos expandidos. Este mismo autor reporta porcentajes de preñez para embriones frescos producidos *in vivo* y transferidos en estadio de mórula entre 48% y 70%. Mientras que cuando los que se transfirieron fueron blastocistos, los porcentajes de preñez fueron del 65-70%.

Figura 5

Derecha: MIV + IGF-I Blastocistos expandidos al día 7. Izquierda: MIV Control Blastocistos expandidos al día 7.

**Figura 6**

Blastocistos protruyendo al día 9.



Porcentaje de Embriones

Las diferencias encontradas fueron significativas ($P \leq 0.05$) siendo el tratamiento MIV + IGF-I el que obtuvo el mayor porcentaje de producción de embriones superando al tratamiento control en 17.92% (Cuadro 7). De acuerdo con Velazquez et al. (2008) se ha demostrado que el IGF-I puede ejercer un efecto positivo en la pre-implantación y desarrollo de los embriones en la especie bovina. Por otra parte, Armstrong et al. (1991) concluye que la IGF-I actúa como un potente agente mitógeno celular, además juega un papel importante en la regulación de los mecanismos ováricos de

diferenciación y proliferación celular en el periodo preovulatorio y en los procesos de reiniciación meiótica del ovocito.

Por tanto, el IGF-I secretado por las células de la granulosa, potencia los efectos de la FSH en la aromatización y estimulación de la síntesis de andrógenos tecales. Además, la secreción de IGF-I ovárica se estimula con niveles crecientes de gonadotropinas (FSH y LH), pudiéndose así ampliar las acciones de estas hormonas a nivel local (Armstrong et al. 1991).

Cuadro 7

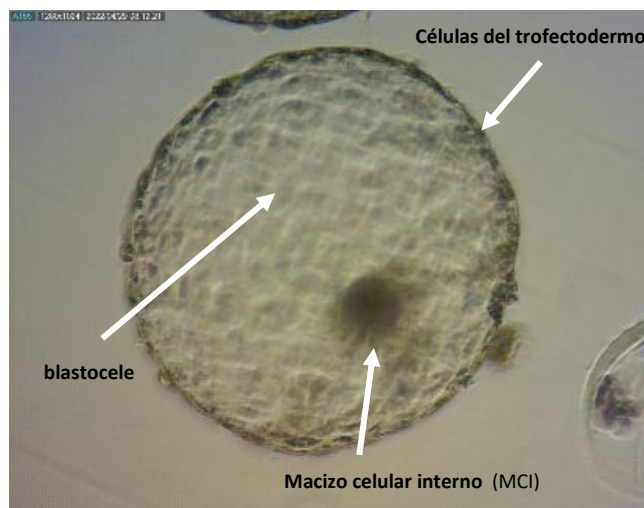
Valores porcentuales de embriones y su categoría para MIV y MIV+ IGF-I.

Tratamiento	Embriones (%)	Mórulas (%)	Blastocistos (%)
MIV + IGF-I	66.36	24.66	75.35
MIV Control	48.44	45.16	54.84
CV	14.9705	24.4512	16.2997
Probabilidad	0.0201		0.0382

Nota. CV: Coeficiente de variación; IGF-I: factor de crecimiento similar a la insulina I

Figura 7

Composición del blastocisto protruido.



Eficiencia General

Las diferencias encontradas fueron significativas ($P \leq 0.05$) para las relaciones entre el número de embriones producidos de acuerdo con los ovocitos viables siendo el MIV + IGF-I el que obtuvo el mayor porcentaje superando al control con un 21.87% (Cuadro 8), también en la relación de

embriones producidos por ovocitos madurados, fertilizados y clivaje se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$), siendo el MIV + IGF-I el que obtuvo los mayores valores superando al control con un 21.93%, 20.41%, 17,92% respectivamente en cada etapa del procedimiento de producción *in vitro* (PIV).

Cuadro 8

Eficiencia del procedimiento de PIV, relacionando los embriones producidos con los ovocitos viables, madurados, fertilizados y clivaje para MIV y MIV+ IGF-I

Tratamiento	Embriones/ ovocitos viables	Embriones/ ovocitos madurados	Embriones/ ovocitos fertilizados	Embriones/ ovocitos en clivaje
MIV + IGF-I	39.89	45.06	54.48	66.36
MIV Control	18.02	23.13	34.07	48.44
CV	30.9042	26.7607	20.1387	14.9705
Probabilidad	<0.0001	<0.0001	0.0026	0.0201

Nota. CV: Coeficiente de variación; IGF-I: factor de crecimiento similar a la insulina I

Conclusiones

Bajo las condiciones de este estudio los mayores porcentajes de maduración y fertilización *in vitro*, clivaje y blastocistos se obtuvieron con la suplementación de IGF-I en el medio de maduración *in vitro*.

El menor porcentaje de apoptosis y de mórulas se obtuvo con la suplementación de IGF-I en el medio de maduración *in vitro*.

La mejor eficiencia del proceso de producción *in vitro* (PIV) al relacionar el número de embriones producidos con el número de ovocitos viables, ovocitos madurados, ovocitos fertilizados y ovocitos en clivaje se obtuvo con la suplementación de IGF-I en el medio de maduración *in vitro*.

Recomendaciones

Realizar futuras investigaciones usando otros factores de crecimiento en el medio de maduración en asociación con el IGF-I.

Evaluar tasas de preñez en receptoras en *Bos taurus* como en *Bos indicus* transfiriendo los embriones producidos con medio de maduración suplementado con IGF-I.

Evaluar distintas concentraciones para la suplementación de IGF-I en el MIV.

Referencias

- Alvarado Ulloa JM. 2017. Evaluación de la calidad de ovocitos provenientes de vaconas criollas y ovarios de matadero. [sin lugar]: [sin editorial]. https://www.lareferencia.info/vufind/record/ec_785f6743c2ff87c5bcce04f43ca0a807.
- Ambria Garcia D, Arenas Rios E, Cambron Ruiz A, Rodriguez Tobon A, Rosado Garcia A, Zuñiga Rubio PJP. 2010. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. [sin lugar]: [sin editorial]. 5 p. (vol. 78). https://www.researchgate.net/profile/ahiezer-rodriguez-tobon/publication/272887428_bases_fisiologicas_de_la_capacitacion_y_de_la_reaccion_acrosomal_del_espermatozoide.
- Armstrong DT, Zhang X, Vanderhyden BC, KHAMSI F. 1991. Hormonal actions during oocyte maturation influence fertilization and early embryonic development. *Ann NY Acad Sci.* 626(1 Frontiers in):137–158. eng. doi:10.1111/j.1749-6632.1991.tb37908.x.
- Camargo L, Viana J, Sa W, Ferreira A, Ramos A, Vale V. 2006. Factors influencing *in vitro* embryo production. *Anim. Reprod*; [consultado el 31 de ene. de 2022]. 3(1):19–28. eng. <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a607cf7783717068b47b6/pdf/animreprod-3-1-19.pdf>.
- Cutini A, Teruel M, Cabodevila J. 2000. Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos.
- Daughday WH, Salmon WD. 1957. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. *J Lab Clin Med.* 49(6):825–836. eng. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13429201/>.
- Fabian D, Il'ková G, Reháč P, Czikková S, Baran V, Koppel J. 2004. Inhibitory effect of IGF-I on induced apoptosis in mouse preimplantation embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology.* 61(4):745–755. doi:10.1016/S0093-691X(03)00254-1.
- Fernandez Hernandez RH. 2005. Inmunolocalización del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) y su receptor (IGF-Ir) en el tracto reproductor del verraco. Zamorano, Honduras: Escuela Agrícola Panamericana Zamorano.
- Granada Ybern ML. 2006. Factor de crecimiento similar a la insulina y sus proteínas de transporte. *Endocrinología y Nutrición.* 53(7):467–475. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1575092206711330>. doi:10.1016/S1575-0922(06)71133-0.
- Hernández Martínez IY, Pacheco López JJ, Castro Santos AP, Souza Sales JN de. 2020. Factores endocrinos involucrados en la divergencia y la dominancia folicular en bovinos. 1. 16(2):1–16. es. <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/view/3970>. doi:10.16925/2382-4247.2020.02.01.
- Kawashima C, Sudo N, Amaya Montoya C, Kaneko E, Matsui M, Matsunaga N, Tetsuka M, Shimizu T, Kida K, Miyake Y-I, et al. 2007. 252 The role of insulin-like growth factor 1 (igf-1) in development of an estrogen-active dominant follicle during the first follicular wave postpartum in dairy cows. *Reprod. Fertil. Dev.* 19(1):242. doi:10.1071/RDv19n1Ab252.
- Khalid M, Haresign W, Luck M. 2000. Secretion of IGF-1 by ovine granulosa cells: effects of growth hormone and follicle stimulating hormone. *Anim Reprod Sci.* 58(3-4):261–272. doi:10.1016/S0378-4320(99)00075-5.

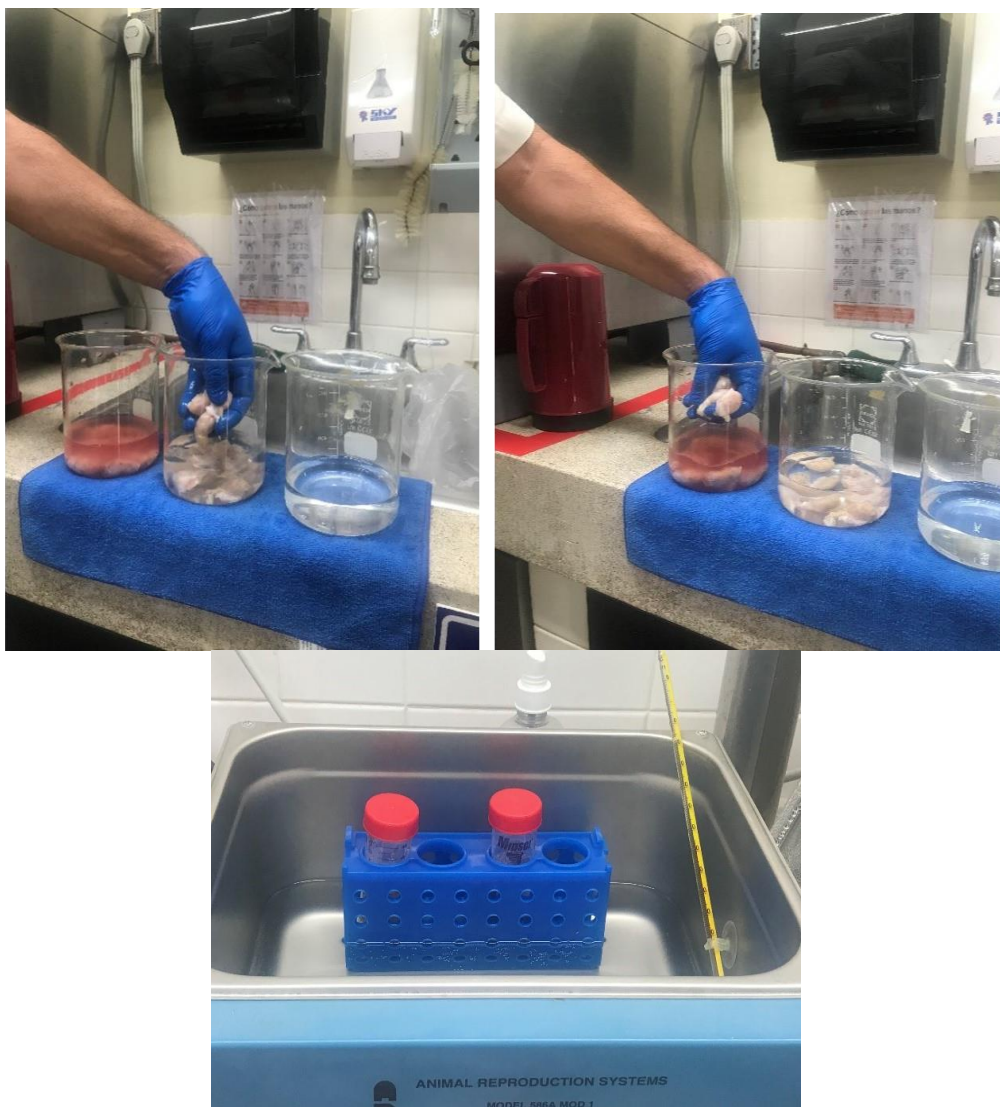
- Kurzawa R, Głabowski W, Wenda-Rózewicka L. 2001. Evaluation of mouse preimplantation embryos cultured in media enriched with insulin-like growth factors I and II, epidermal growth factor and tumor necrosis factor alpha. *Folia Histochem Cytobiol.* 39(3):245–251. eng.
- Lenis YY, Olivera-Angel M, Tarazona AM. 2010. Rol de la mitocondria y el estrés oxidativo en el bloqueo del desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Arch. med. vet.* 42(3). en. doi:10.4067/s0301-732x2010000300003.
- Lenz Souza MI, Ramírez Benavides GF, Uribe-Velásquez LF. 2007. Papel del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1_ en la regulación de la función ovárica. [sin lugar]: [sin editorial]. 149 p. (vol. 6). https://www.researchgate.net/profile/maria-souza-32/publication/275520581_papel_del_factor_de_crecimiento_semejante_a_la_insulina_igf-1_en_la_regulacion_de_la_funcion_ovarica.
- Lonergan P, Rizos D, Kanka J, Nemcova L, Mbaye AM, Kingston M, Wade M, Duffy P, Boland MP. 2003. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction.* 126(3):337–346. eng. doi:10.1530/rep.0.1260337.
- Lucy MC. 2000. Regulation of Ovarian Follicular Growth by Somatotropin and Insulin-Like Growth Factors in Cattle. *Journal of Dairy Science.* 83(7):1635–1647. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)75032-6.
- McEvoy TG, Sinclair KD, Young LE, Wilmut I, Robinson JJ. 2000. Large offspring syndrome and other consequences of ruminant embryo culture *in vitro*: relevance to blastocyst culture in human ART. *Hum Fertil (Camb).* 3(4):238–246. eng. doi:10.1080/1464727002000199061.
- Mucci N. 2016. Producción *in vitro* y criopreservación de embriones bovinos. Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce: [sin editorial].
- Ortega Torres J, Ariza Botero MF. 2012. O mecanismo de morte celular programada e sua importância no processo de maturação da carne bovina. *Revista de Medicina Veterinária.* (23):83–96. pt.
- Osorio JH, Ruiz Arboleda JL, Uribe Velásquez LF. 2011. Factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1 (IGF-1) en la reproducción de la hembra bovina. 1. 5(2):68–81. es. <https://revistasoj.s.ualdas.edu.co/index.php/vetzootec/article/view/4456>.
- Palma G, editor. 2018. Biotecnología de la Reproducción. [sin lugar]: [sin editorial]. ISBN: 987-43-3779-6.
- Palma GA. 2018. Producción *in vitro* de embriones bovinos. En: Palma G, editor. Biotecnología de la Reproducción. [sin lugar]: [sin editorial]. p. 225. https://www.researchgate.net/profile/gustavo-palma-2/publication/329567703_produccion_in_vitro_de_embryones_bovinos.
- Palma GA, M. Müller, G. Brem. 1997. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction.* 110(2):347–353. en_US. https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/110/2/jrf_110_2_019.xml. doi:10.1530/jrf.0.1100347.
- Palma GA, Olivier NS, Neumüller C, Sinowatz F. 2008. Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of *in vitro* fertilization and ultrastructure of *in vitro* produced bovine blastocysts. *Anatomia, Histologia, Embryologia.* 37(1):67–73. eng. doi:10.1111/j.1439-0264.2007.00795.x.
- Peña J M, Gongora O A, Estrada L J. 2007. Factores de crecimiento en el desarrollo folicular, embrionario temprano e implantación. Implicaciones en la producción de embriones bovinos. [sin

- lugar]: [sin editorial]. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0122-02682007000100010.
- Rao JU, Shah KB, Puttaiah J, Rudraiah M. 2011. Gene expression profiling of preovulatory follicle in the buffalo cow: effects of increased IGF-I concentration on periovulatory events. *PLoS One*. 6(6):e20754. eng. doi:10.1371/journal.pone.0020754.
- Rieger D, Luciano AM, Modina S, Pocar P, Lauria A, Gandolfi F. 1998. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil*. 112(1):123–130. eng. doi:10.1530/jrf.0.1120123.
- Roche J, Diskin M. 2005. Efecto de la nutrición sobre la eficiencia reproductiva de los bovinos. [sin lugar]: [sin editorial]. https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/333/jb2005_21-26.pdf?sequence=1&isallowed=y.
- Rosete Fernandez JV, Alvarez Gallardo H, Urban Duarte D, Frogoso Islas A, Aspron Pelayo MA, Rios Utera A, Perez Reynoso S, De La Torre Sanchez JF. 2020. Relación de los niveles séricos de la hormona anti-Mülleriana y la reserva ovárica en donadoras de oocitos de raza Brahman. [sin lugar]: [sin editorial]. https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_agrociencias/19/.
- Sakaguchi M, Dominko T, Yamauchi N, Leibfried-Rutledge ML, Nagai T, First NL. 2002. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors *in vitro*. *Reproduction*. 135–142. doi:10.1530/rep.0.1230135.
- Sirotkin AV, Florkovicova I, Makarevich AV, Schaeffer H-J, Kotwica J, Marnet P-G, Sanislo P. 2003. Oxytocin mediates some effects of insulin-like growth factor-I on porcine ovarian follicles. *J Reprod Dev*. 49(2):141–149. eng. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/49/2/49_2_141/_article/-char/ja/. doi:10.1262/jrd.49.141.
- Sudo N, Shimizu T, Kawashima C, Kaneko E, Tetsuka M, Miyamoto A. 2007. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) system during follicle development in the bovine ovary: relationship among IGF-I, type 1 IGF receptor (IGFR-1) and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A). *Mol Cell Endocrinol*. 264(1-2):197–203. eng. doi:10.1016/j.mce.2006.10.011.
- Velazquez MA, Spicer LJ, Wathes DC. 2008. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Domestic Animal Endocrinology*. 35(4):325–342. eng. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0739724008000775>. doi:10.1016/j.domaniend.2008.07.002.
- Yang S, Yang Y, Hao H, Du W, Pang Y, Zhao S, Zou H, Zhu H, Zhang P, Zhao X. 2022. Supplementation of EGF, IGF-1, and Connexin 37 in IVM Medium Significantly Improved the Maturation of Bovine Oocytes and Vitrification of Their IVF Blastocysts. *Genes (Basel)*. 13(5). eng. doi:10.3390/genes13050805.
- Zamora S JD, Otárola A IC, Brenes G O. 2005. La apoptosis y su relación con diversos nutrientes. *Rev. chil. nutr.* 32(3). en. doi:10.4067/s0717-75182005000300002.

Anexos

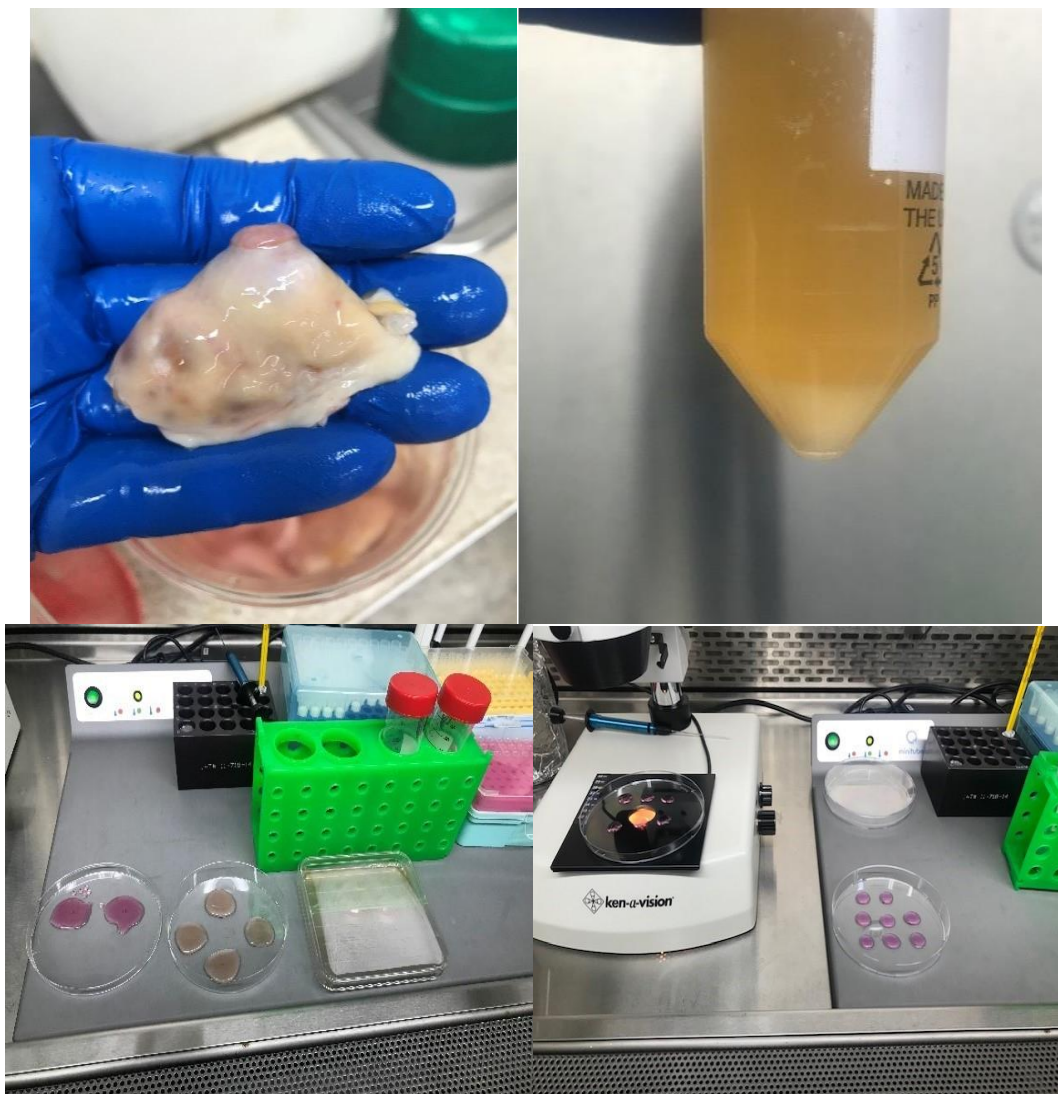
Anexo A

Acondicionamiento de ovarios.



Anexo B

Aspiración folicular y preparación de gotas de lavado de colección y maduración.



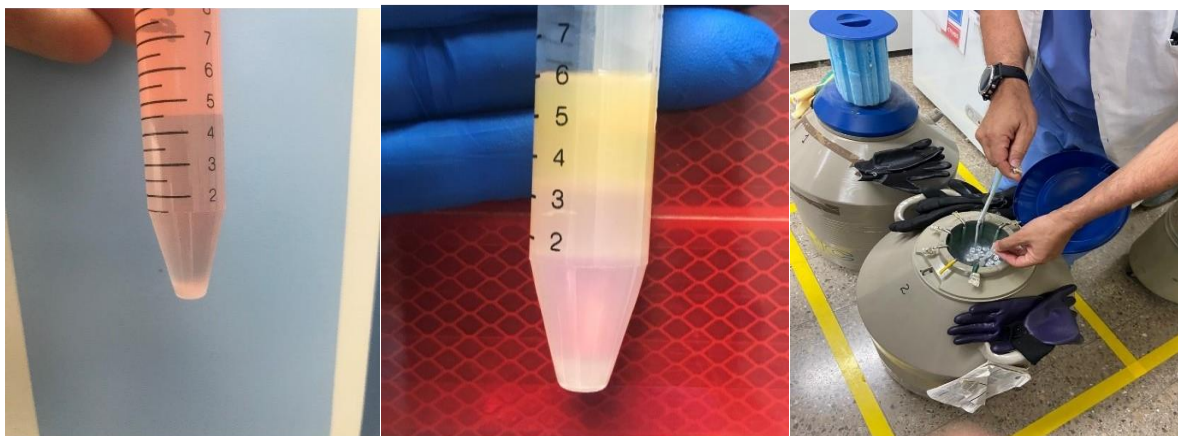
Anexo C

Microgotas flotantes para maduración in vitro.



Anexo D

Descongelación de semen, medio para capacitación con semen y percoll 90%-45% luego de primera centrifugación y medio de acondicionamiento de semen luego se la segunda centrifugación.



Anexo E

Ovocitos madurados transferidos a placas nunc de fertilización.

