

EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A INSULINA TIPO 1 Y SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS

Expression of the Insulin-Like Growth Factor-1 and its Relationship with the In Vitro Bovine Embryo Production

Adriana Fernández^{*1}, Pedro Cabrera^{*}, Thais Díaz^{*} y Ana Z. Ruíz^{**}

^{*1}Instituto de Reproducción Animal, ^{**}Cátedra de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Apartado 4563, Maracay 2101, estado Aragua, Venezuela.

Correo-E:adrianafernandez@hotmail.com

Recibido: 05/03/20 - Aprobado: 09/11/20

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar la expresión del factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF-1) y su receptor, en ovario y líquido folicular (LF) de vacas mestizas Cebú y su relación con la producción *in vitro* de embriones. Los complejos cúmulo ovocito (COC) recolectados a través del tasaje de los ovarios, fueron seleccionados, contados y separados por grupo en: hembras vacías (ovarios sin o con cuerpo lúteo [CL]) y hembras gestantes (ovarios sin o con CL). Sólo se utilizaron los COC clasificados como tipo I y II. Se evaluó la expresión de IGF-I y su receptor en ovario y LF mediante Western blot, evidenciándose una mayor expresión de ambos, tanto en tejido ovárico como LF, provenientes de ovarios de vacas vacías y vacas gestantes con CL. Al relacionar estos resultados con la tasa de embriones divididos y la tasa de producción de blastocitos, se presentan similitudes respecto a los ovocitos provenientes de ovarios de vacas vacías con presencia de CL, obteniendo una mayor tasa de división embrionaria, lo que sugeriría que el IGF-1 juega un papel muy importante en el desarrollo del CL durante el inicio de la fase luteal. De este trabajo se puede concluir que, para incrementar la

ABSTRACT

The aim of the present work was to determine the expression of the insulin-like growth factor type 1 (IGF-1) and its receptor, in ovary and follicular fluid (FL) of crossbreed Cebu cows and its relationship with *in vitro* bovine embryo production. Cumulus oocytes complexes (COCs) were selected, counted and separated depending on the donor status: pregnant (P) cows with or without a corpus luteum (CL) and non pregnant (NP) cows with (CL) or without (NoCL) a CL. We evaluated the expression of IGF-I and its receptor in ovary and LF by Western blot. There is a greater expression of IGF-1 and its receptor, both in ovarian tissue and FL, from ovaries of non-pregnant and pregnant cows with CL. When these results are related to the rate of divided embryos and the rate of blastocyst production, there are similarities with oocytes from ovaries of non-pregnant cows with a CL, obtaining a higher rate of embryonic division, which would suggest that the IGF-1 plays a very important role in the development of CL during the beginning of the luteal phase. These results show that the reproductive status of a cow should be taken into account for oocyte selection, in order to improve embryo production.

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

producción *in vitro* de embriones bovinos, deberán establecerse nuevos criterios para la selección de los ovarios y ovocitos, según el estatus ovárico de hembras bovinas *Bos indicus* y sus cruces.

(Palabras clave: IGF-1; receptor del IGF-1; embriones bovinos *in vitro*)

(Key words: IGF-1; IGF-1 receptor; *in vitro* embryo production; Crossbred Zebu cows; reproductive status)

INTRODUCCIÓN

En la fisiología del desarrollo folicular en bovinos existen factores metabólicos como la insulina, hormona de crecimiento (GH) y un sistema de factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) que juegan un papel crítico en el proceso del desarrollo y crecimiento folicular. Estos factores no sólo están asociados con el desarrollo folicular, sino también, con la función de las células foliculares [1].

El IGFs, está conformado por los factores de crecimiento similares a la insulina 1 y 2 (IGF-1 e IGF-2, por sus siglas en inglés), también llamados somatomedina; dos receptores (tipo 1 y tipo 2), seis proteínas de unión para IGFs (IGFBP-1, 2, 3, 4, 5 y 6), proteasas específicas que degradan las IGFBPs y varias proteínas de unión de menor afinidad (IGFBP-7 a IGFBP-10) [2,3].

Ambos factores de crecimiento están involucrados en la proliferación celular, mitogénesis y angiogénesis, además de proteger diferentes tipos celulares contra la apoptosis, incluyendo las células ováricas [4-7].

Una mejor comprensión del papel de la angiogénesis durante el crecimiento folicular y la formación y función del cuerpo lúteo tiene importantes implicaciones para la regulación de la fertilidad en los mamíferos [6].

El IGFs juega un papel muy importante en la sensibilización de las células de la granulosa del folículo ovárico, permitiendo la acción de la FSH durante el crecimiento folicular. La concentración de IGFBP-2 e IGFBP-4 en el líquido folicular disminuye considerablemente durante el crecimiento folicular, conduciendo a un incremento en la biodisponibilidad del IGF-1. Sin embargo, durante la atresia folicular ocurre un incremento de los niveles de IGFBP-2 e IGFBP-4, lo que conlleva a un descenso de la biodisponibilidad de IGF-1 [8].

En el caso del desarrollo folicular, el IGF-1 está involucrado en el mecanismo intra e interovárico para la regulación del crecimiento del folículo [9]. Este factor interactúa sólo o sinérgicamente con la FSH y la LH, regulando la proliferación y diferenciación de las células de la teca interna y de la granulosa, con la contribución de factores endocrinos, paracrinós y autocrinos.

Asimismo, la hormona de crecimiento (GH), actúa principalmente vía IGF-1 e IGF-2, ejerciendo además el efecto a través de su propio receptor (GH-R) [10].

Los IGFs funcionan como moduladores de la acción de las gonadotropinas a nivel celular. En el caso de los folículos ováricos estimulan la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa y de la teca, mostrando distintos patrones de especificidad para su expresión en el tejido folicular de diferentes especies [11]. Las actividades autocrinas-paracrinós de IGF-1 y -2 incluyen estimulación del crecimiento celular, incremento de la producción de progesterona (P4) y estrógeno (E2), además de aumentar la sensibilidad de las células de la granulosa al estímulo de la FSH, en bovinos [8,12].

En el caso de las hembras bovinas, Armstrong *et al.* [13] demostraron que el ARNm que codifica al receptor de IGF-1, está presente tanto en las células de la granulosa como de la teca interna, mientras que el IGF-2, el principal ligando intrafolicular en ruminantes, es producido solamente por las células de la teca. Las proteínas de unión IGFBP-2 y -4, son producidas tanto por las células de la granulosa como de la teca de folículos antrales, respectivamente, regulando la biodisponibilidad intrafolicular de IGF durante el desarrollo folicular [5, 7, 14].

En el cuerpo lúteo, el IGF-1, se encuentra exclusivamente en células luteales grandes y pequeñas y en número limitado en las células endoteliales,

mientras que el IGF-2, no ha podido ser identificado en dichas células, localizándose en los fibroblastos perivasculares de grandes vasos sanguíneos y en los capilares, así como en el tejido conectivo interlobular [10].

Asimismo, IGF-1 e IGF-2 muestran una regulación diferente durante el ciclo estral y la gestación en el ovario de hembras bovinas para la expresión del ARNm del GH-r [15, 16].

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue identificar la diferencia en expresión de proteínas (IGF-1 e IGF-1R) en el ovario y líquido folicular de hembras bovinas mestizas Cebú, según el estatus fisiológico y su relación con la tasa de recuperación de ovocitos, tasa de división embrionaria y tasa de producción de blastocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de proteína total de ovarios y líquido folicular

El protocolo para la determinación de la expresión de proteínas en el ovario fue realizado siguiendo procedimientos reportados por Ruíz y Kittok [17].

Al igual como se procedió en el trabajo de investigación realizado por (Fernández *et al.* [18], se utilizaron los ovarios y líquido folicular (LF) de hembras gestantes (ovarios con o sin CL [Gest-CL o noGest-CL, respectivamente]) y hembras vacías (ovarios con o sin CL [Va-CL o Va-noCL, respectivamente]).

Todos los procedimientos de laboratorio se llevaron a cabo a 4°C. Para el caso de los ovarios, se tomó una muestra de cada tratamiento y se seccionaron con un bisturí para disminuir su tamaño, usando una relación de 0,5 g de tejido por cada 2 mL del buffer de extracción; luego la muestra fue homogeneizada (Polytron Homogenizer, Kinematica GmbH, Switzerland). El buffer para homogenización estuvo compuesto de: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 500 mM KCl, 2 mM ditiotreitól (DTT), y 0,05% de coctel inhibidor de las proteasas (4-2-aminoetilbenzenesulfonilfluoride, pepstatin A, trans-epoxysuccinil-leucilamido-guanidino butano, bestatin, leupeptin y aprotinin; Sigma, EUA). El homogeneizado resultante, fue centrifugado a 26.890 xg durante 15 min a 4°C. Este procedimiento fue repetido tres veces. Posteriormente, el sobrenadante fue almacenado a -80°C hasta la subsiguiente

cuantificación de la proteína total.

En el caso del LF, cada muestra, de cada uno de los tratamientos, fue diluida individualmente con buffer de extracción, a razón de 1:100. El LF fue centrifugado a 26.890g durante 15 min a 4°C. El filtrado se transfirió a un microtubo de 1,5 mL para ser centrifugado tres veces bajo las condiciones previas. Posteriormente, el sobrenadante fue almacenado a -80°C hasta la subsiguiente cuantificación de la proteína total.

Cuantificación de la proteína: tejido ovárico y LF

Se determinó la concentración de proteína total de cada muestra, mediante métodos colorimétricos (BCA Protein Assay kit; Pierce, EUA).

Una vez preparadas las soluciones para la cuantificación de proteína total, se procedió de acuerdo al protocolo "BCATM Protein Assay Kit", para microplacas de 96 pozos. Se cuantificó individualmente la proteína total en las muestras de ovario, de cada uno de los tratamientos, haciendo dilución de la muestra de 1:10. Para el caso del LF se utilizó una dilución de 1:100.

Se colocó 25 µL de cada estándar y muestra por triplicado en los pozos de la microplaca; posteriormente, se agregó 200 µL de la mezcla de reactivos patrones en cada pozo mezclando adecuadamente la placa, la cual se cubrió y se incubó a 37°C por 30 min. Al culminar el tiempo estipulado, se midió la absorbancia con una longitud de onda de 562 nm en el lector de ELISA (Thermo, EUA).

Determinación de la expresión de IGF-1 y su receptor en ovarios y líquido folicular mediante la técnica de Western blot

Se preparó un gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico del tipo discontinuo (SDS-PAGE), con 10 y 5% de bis-poliacrilamida en la porción de anclaje y en la porción de resolución, respectivamente. Se depositó en el gel SDS-PAGE, el estándar de marcador de peso molecular pre-marcado con color azul (Pierce®; EUA) y una muestra control de tejido adiposo de ovejo (100 µg, como control positivo).

Para el caso de los ovarios, se dispensaron en el gel SDS-PAGE, los cuatro tratamientos (proteína total aproximadamente 150 µg): ovarios de hembras gestantes (Gest-noCL o Gest-CL) y hembras vacías (Va-noCL o Va-CL). Asimismo, se cargó las cuatro

muestras de proteína total de LF (200 μ g). Las bandas proteicas fueron separadas mediante un sistema de electroforesis vertical (GIBCO BRL, Life Technologies, EUA). Este procedimiento se realizó con la finalidad de determinar la concentración óptima de proteína requerida para reaccionar con el primer anticuerpo y producir una banda proteica bien definida.

Se realizó la electroforesis del gel aplicando 150 voltios, a 4°C durante 4 h o hasta que las proteínas recorrieron el gel en casi su totalidad. Las bandas proteicas fueron transferidas desde el gel hacia una membrana de nitrocelulosa (45 μ m; Bio-Rad Laboratories, EUA), mediante un equipo de transferencia semi-seco (Owl Separation System, EUA). Para este procedimiento, se aplicaron 10 voltios durante aproximadamente 2 h a 4°C. Se verificó la transferencia de bandas proteicas del gel a la membrana de nitrocelulosa, mediante la coloración de Ponceau (Bio-Rad Laboratories, EUA). Posteriormente, el gel fue coloreado con Azul de Coomassie (Bio-Rad, EUA) con el fin de evidenciar que se realizó una adecuada transferencia.

Posteriormente, se bloquearon las membranas con solución buffer Tris-Tween (2,42 g de Base Tris + 29,24 g de NaCl + 0,5 mL Tween-20/1L de H₂O destilada; TBST, pH 7,5) el cual contenía 5% de leche deshidratada y descremada. Este procedimiento se realizó durante 1 h a 4°C. La membrana se incubó con el primer anticuerpo para IGF-1 de humano producido en cabra (sc-1422; Santa Cruz Biotechnology, EUA) a una dilución de 1:200. Aunque el anticuerpo usado es específico para IGF-1 humano producido en cabra, debido a que el IGF-1 es altamente homólogo entre especies filogenéticamente distantes, se asume que este anticuerpo debería ser capaz de reconocer el IGF-1 bovino [19, 20].

Culminado el tiempo de incubación, se lavó la membrana tres veces con TBST, durante 5 min, con movimientos suaves para retirar los restos del primer anticuerpo. Posteriormente, se incubó la membrana con un segundo anticuerpo IgG de conejo anti-cabra conjugado con la enzima peroxidasa a una dilución de 1:1000 (A-5420; Sigma, EUA). La dilución del segundo anticuerpo se realizó en TBST más 5% de leche descremada, incubándose junto con la membrana en agitación, durante 1 a 3 h. Culminado el tiempo, se lavó la membrana con TBST, 3 veces por 15 min cada vez, en agitación, para luego lavarse

2 veces por 15 min cada una con TBS, en agitación.

Las bandas proteicas inmuno-reactivas se visualizaron mediante una reacción de quimioluminiscencia (Signal West Pico; Pierce, EUA). Finalmente, la membrana se expuso a películas de rayos X en una pantalla intensificadora (Kodak Biomax, EUA) durante 5 a 15 min, dependiendo de la intensidad de la quimioluminiscencia, para visualizar las bandas proteicas respectivas.

Este mismo procedimiento descrito, fue utilizado para la determinación de la expresión del receptor de IGF-1. En este caso, se utilizó la misma membrana siguiendo el protocolo anteriormente descrito; pero antes de re-incubar la membrana, se lavó en un recipiente con TBST, tres veces durante 2 min en la plataforma rotatoria. Para el receptor de IGF-1, se utilizó un anticuerpo de humano producido en cabra (IGF-IsR I-7151; Sigma, EUA) a una dilución de 1:500 durante 16 a 20 h. Aunque el anticuerpo usado es específico para IGF-1R humano producido en cabra, debido a que el receptor es altamente homólogo entre especies filogenéticamente distantes, se asume que este anticuerpo debería ser capaz de reconocer el IGF-1 del bovino.

Se diluyó en TBST más 5% de leche descremada, incubándose la membrana con un segundo anticuerpo, IgG de conejo anti-cabra conjugado con la enzima peroxidasa a una dilución de 1:1000 (A-5420; Sigma, EUA). La dilución del segundo anticuerpo se realizó en TBST más 5% de leche descremada, incubándose junto con la membrana en agitación, durante 1 a 3 h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las hormonas metabólicas son claves en el comportamiento reproductivo, afectando diferentes aspectos de la fisiología de la vaca. El IGFs está asociado con las hormonas reproductivas, interactuando sobre la actividad ovárica, desde la fase inicial del crecimiento y desarrollo folicular, que conlleva al proceso de selección del folículo dominante, como también, en el desarrollo final y ovulación [21].

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el IGF-1 y su receptor, se expresan en el tejido ovárico y líquido folicular, coincidiendo con estudios realizados por Armstrong y Webb [11], Scham set al. [15, 16], Lucy [22], Neuvians

et al. [10], Mongety Martin [23], Velázquez *et al.* [24], Silva *et al.* [25], quienes reportaron que el IGF-1 y -2, están involucrados en la proliferación celular, mitogénesis y angiogénesis ovárica. En ese mismo orden de ideas, en el tejido luteal, estos mismos ligandos tienen efectos estimulatorios sobre la secreción de P4, encontrándose el IGF-1 en las células luteales grandes y pequeñas.

Asimismo, los resultados sugieren que la expresión del IGF-1 y su receptor parece ser regulada de manera diferente durante el ciclo estral y gestación en el ovario de la hembra bovina, confirmado por otros trabajos realizados [15,16].

Expresión de IGF-1 en tejido ovárico y LF

Para la expresión de IGF-1 en el tejido ovárico y LF, se utilizó 150 µg de proteína total ovárica y 200 µg de fluido folicular, como la cantidad óptima de proteína para todos los grupos de tratamiento establecidos, permitiendo visualizar e identificar la banda proteica de IGF-1, por debajo de la última banda (18,3 kDa) del marcador de peso molecular utilizado. La masa molecular de la banda de IGF-1 coincide con la reportada por la casa comercial productora del anticuerpo para detectar el IGF-1 para ratones y con la banda para IGF-1 reportado por Ruíz *et al.* [26] para bovinos.

Con base a lo anteriormente señalado, la expresión de IGF-1 en las muestras de tejido ovárico y LF, parece ser mayor en las vacas vacías con presencia de CL (Figura 1), evidenciándose las bandas proteicas más intensas y mejor definidas, que en el caso de las hembras gestantes. Asimismo, la expresión de IGF-1 se aprecia muy débil en el caso de tejido ovárico y LF de ovarios de vacas gestantes sin CL.

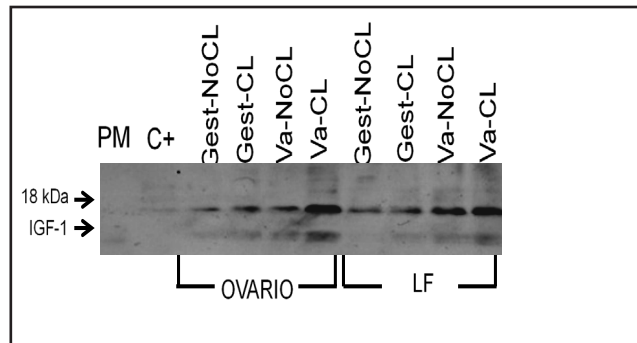


Figura 1. Muestra representativa de un gel teñido con coloración azul de Coomassie para determinar la expresión de IGF-1 en el ovario y LF de hembras gestantes (en ausencia [Gest-noCL] y presencia de CL [Gest-CL]) y hembras vacías (en ausencia [Va-noCL] y presencia de CL [Va-CL])

Resultados similares han reportado que las concentraciones de IGF-1 en el tejido luteal de hembras bovinas, varían durante el ciclo estral, detectando entre los días del 1 al 5, valores más bajos de IGF-1 que los obtenidos durante los días 6 a 11 del ciclo [27]. El máximo valor, fue mostrado durante la fase luteal entre los días 12 a 17, seguido de un rápido descenso de los valores después de la luteólisis, entre los días 18 y 21 del ciclo estral. Asimismo, los valores de IGF-1, descienden significativamente durante la gestación.

Por el contrario, la expresión más alta del ARNm para IGF-1, fue observada durante la fase luteal temprana (días 1 a 4), seguido por un descenso y nuevamente un incremento durante fase luteal media y tardía [15, 16], confirmando que los valores de la expresión del ARNm para IGF-1 en el CL de la hembra bovina gestante, se encuentra en valores bajos, similares a los detectados durante la fase de mantenimiento en plateau del CL. Dicho trabajo confirma, que el sistema IGF juega un papel muy importante en el desarrollo inicial del CL, por sus acciones sobre la luteinización de las células de la granulosa que dan origen a las células luteales grandes y estimulación a la producción de oxitocina y P4.

Con relación a la expresión de IGF-1 en LF, existen reportes que indican que la expresión de este factor de crecimiento en las células de la granulosa depende del estatus folicular de la hembra bovina, incrementándose los valores de la expresión del ARNm del IGF-1, desde la fase temprana a media, de dominancia folicular, reportando también, incremento del IGF-1 en el LF en folículos dominantes y preovulatorios [1, 8, 16].

Esta elevación de la expresión del ARNm para el IGF-1 en las células de la granulosa, precede al incremento del número de receptores para la enzima aromatasa y LH, pudiendo correlacionarse con el momento de reclutamiento de una onda folicular y sobre regulación de los receptores para las gonadotropinas.

Asimismo, la expresión constantemente elevada del ARNm de IGF-1 y -2, en las células de la teca interna de los folículos [1, 8], sugiere que estos ligandos ejercen efectos fisiológicos antes de la fase de reclutamiento folicular, y sobre regulación durante la fase inicial de desarrollo de folículos antrales.

Como se aprecia en la Figura 1, la expresión del IGF-1 pareciera ser menor en el LF que en

tejido ovárico en todos los tratamientos establecidos. El IGF-1 ejerce profundos efectos en las etapas finales de la foliculogénesis y esteroidogénesis, y que tanto altos o bajos niveles de la actividad de IGF-1 son probablemente deletéreos para el folículo y el ovocito [28]; por esta razón, la actividad de IGFs en el folículo, debe ser estrechamente regulada; sin embargo, el problema radica que en el LF, no existe una correlación entre la concentración total de IGF-1 y el tamaño folicular [12], debido a que la mayoría del IGF-1 presente en el LF deriva de la circulación sanguínea [29]. Por lo tanto, las concentraciones de IGF-1 en el LF, siempre se encuentran críticamente dentro del rango que pudiera estimular la proliferación y esteroidogénesis de las células de la granulosa [28].

En la Figura 2, se aprecia una muestra representativa de un Western blot para determinar la expresión de IGF-1 en ovario y LF de hembras gestantes y vacías en ausencia y presencia de CL. En el estudio, no parece haber diferencia en la expresión del IGF-1 en el tejido ovárico de las hembras gestantes y vacías en presencia o ausencia de CL. En el líquido folicular, se infiere una mayor expresión en las vacas vacías en ausencia o presencia de CL en comparación con las vacas gestantes con o sin CL.

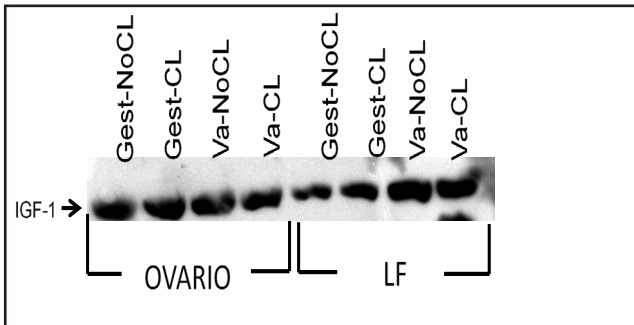


Figura 2. Muestra representativa de un Western Blot para determinar la expresión de IGF-1 en el ovario y LF de hembras gestantes (en ausencia [Gest-noCL] y presencia de CL [Gest-CL]) y hembras vacías (en ausencia [Va-noCL] y presencia de CL [Va-CL])

Expresión del receptor de IGF-1 en tejido ovárico y líquido folicular

Para la expresión del receptor de IGF-1 en el tejido ovárico y LF, al igual que para la determinación de IGF-1, se utilizó 150 μ g de proteína total ovárica y 200 μ g de fluido folicular, como la cantidad óptima de proteína para todos los grupos de tratamiento establecidos, permitiendo visualizar e identificar las

bandas proteicas del IGF-1R, de aproximadamente 130 kDa (Figura 3). La masa molecular de la banda de IGF-1 coincide con la reportada por la casa comercial productora del anticuerpo para detectar el IGF-1 para ratones, y con la banda para IGF-1 reportado por Ruíz *et al.* [26] para bovinos.

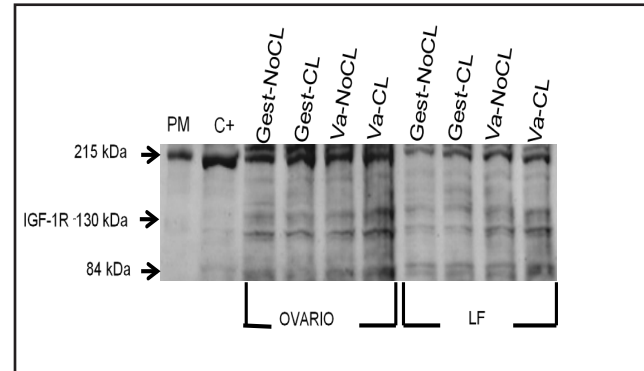


Figura 3. Muestra representativa de un gel teñido con coloración de azul de Coomassie para determinar la expresión del receptor de IGF-1 en ovario y LF de hembras gestantes (en ausencia [Gest-noCL] y presencia de CL [Gest-CL]) y hembras vacías (en ausencia [Va-noCL] y presencia de CL [Va-CL])

Para el caso del IGF-1R, se observa la expresión de una banda doble que sugiere la presencia de las dos subunidades, α y β , características de su estructura molecular.

En este orden de ideas, parece detectarse un incremento en la expresión del receptor de IGF-1 en ovario y LF, en las vacas vacías con presencia de CL, en comparación con el resto de los grupos. Asimismo, la expresión del IGF-1R en las vacas gestantes pareciera ser menor en ausencia o presencia de CL.

Resultados similares fueron reportados por Schamset *al.* [16], obteniendo una mayor expresión del ARNm que codifica al IGF-1R durante la fase luteal temprana, seguida de una disminución durante la fase luteal media y la gestación. Estos mismos autores [16] sugieren que la mayor expresión del IGF-1R al igual que su ligando, fue detectada durante los días 1 al 5 del ciclo estral. Por otra parte, dichos autores señalan que las proteínas del IGF-1 y su receptor, se encuentran principalmente localizadas en las células luteales grandes y la regulación fisiológica sobre el CL parece ser al menos en parte, de tipo autocrina.

A diferencia de lo que sucede con el IGF-1, en las células de la granulosa, la expresión del IGF-1R en dichas células, parece ser baja durante la fase de reclutamiento de la onda folicular, incrementándose

hacia la fase final de crecimiento, cuando por otro lado, disminuye la IGF-1 [16]; mientras que, para el caso de las células de la teca interna, no consiguieron diferencias en la expresión del IGF-1R entre pequeños, medianos y grandes folículos.

Igualmente, se ha demostrado la expresión del ARNm que codifica al IGF-1R en el estroma, CL y folículos ováricos de hembras vacías de la raza Holstein, siendo la expresión del IGF-1R muy baja en el estroma ovárico, mientras que fue más alta en el CL presente durante la fase folicular del ciclo estral de las vacas [30].

Estos resultados permiten sugerir que el IGF-1 y su receptor, funcionan como un modulador de la acción de las gonadotropinas a nivel ovárico. Este mediador actúa sobre el cumulus oophorus de los folículos pequeños para acelerar el ciclo celular meiótico de los ovocitos [29]. Por otra parte, Monget y Monniaux [12], reportan que la acción autocrina-paracrina de IGF-1 y -2 incluye el estímulo sobre el crecimiento celular, incrementando la producción de P4 y E2 y un aumento de la sensibilidad de las células de la granulosa al estímulo de la FSH, en bovinos [8].

Al relacionar estos resultados con la producción in vitro de embriones de vacas mestizas Cebú, se presentan similitudes respecto a los ovocitos provenientes de ovarios de vacas vacías con presencia de CL, obteniendo una mayor tasa de división embrionaria, lo que sugeriría que el IGF-1 juega un papel muy importante en el desarrollo del CL durante el inicio de la fase luteal.

La anterior aseveración, se basa en la evaluación de un total de 4658 ovocitos obtenidos de 437 ovarios, siendo significativamente mayor ($p < 0,006$), el número de ovocitos obtenidos de ovarios procedentes de vacas gestantes ($12,5 \pm 0,7$), comparado con el número de ovocitos provenientes de ovarios de hembras vacías ($9,2 \pm 0,7$); no encontrándose diferencia significativa en el número de ovocitos por ovario en ausencia ($10,2 \pm 0,9$) o presencia de CL ($8,2 \pm 0,9$), en el caso de las hembras vacías y en ausencia ($12,5 \pm 0,9$) o presencia de CL ($12,4 \pm 0,9$).

Los mejores resultados obtenidos con ovocitos recuperados durante la fase luteal temprana, pueden deberse a ovocitos recuperados durante la primera onda de crecimiento folicular, después de la ovulación, ya que durante esta etapa se va a recuperar un mayor

número de ovocitos con competencia de desarrollo.

En el caso de la tasa de división embrionaria, fue significativamente mayor ($P < 0,02$) en el grupo de hembras vacías ($64,2\%$; $n=312$) con respecto a las vacas gestantes ($35,8\%$; $n=174$), no encontrándose diferencia entre vacas vacías sin CL (Va-noCL) y vacas vacías con CL (Va-CL; $45,8\%$ [$n=143$] vs. $54,2\%$ [$n=169$], respectivamente) y vacas gestantes sin CL (Gest-noCL) y vacas gestantes con CL (Gest-CL; $56,3\%$ [$n=98$] vs. $43,7\%$ [$n=76$], respectivamente).

En cuanto a la tasa general de producción de blastocitos, hubo una tendencia ($p < 0,10$) a obtener más blastocitos a partir de ovocitos de hembras vacías ($63,8\%$; $n=30$) sin y con CL ($53,3\%$ [$n=16$] vs. $46,6\%$ [$n=14$]), comparado con el grupo gestante ($36,2\%$; $n=17$) sin y con CL (53% [$n=9$] vs. 47% [$n=8$]).

De acuerdo con lo expresado anteriormente, podemos inferir que los ovocitos recuperados durante el inicio de la fase luteal (bajos niveles de P4), es decir, durante la fase de crecimiento folicular antes de la selección del primer folículo dominante, tienen mejor capacidad de desarrollo que aquellos ovocitos recuperados en cualquier otra fase del ciclo.

CONCLUSIONES

Al evaluar la expresión de IGF-1 y su receptor en vacas mestizas Cebú, por primera vez, se evidencia una expresión más alta de IGF-1 y su receptor, tanto en tejido ovárico como en LF, proveniente de ovarios de vacas vacías y vacas gestantes con CL, indicativo éste de fase luteal. Al comparar estos resultados con la tasa de embriones divididos y la tasa de producción de blastocitos, se presentan similitudes respecto a los ovocitos provenientes de ovarios de vacas vacías con presencia de CL, obteniendo una mayor tasa de división embrionaria, lo que sugeriría, que el IGF-1 juega un papel muy importante en el desarrollo del CL durante el inicio de la fase luteal, por su acción sobre la luteinización de las células de la granulosa, que dan origen a las células luteales grandes y estimulación de la producción de oxitocina y P4.

Del mismo modo, la expresión de IGF-1 y de su receptor en las células de la granulosa, depende del estatus folicular de la hembra bovina, ya que se incrementa la expresión de IGF-1, desde la etapa inicial media de la fase de dominancia folicular, se estimula

la proliferación (mitogénesis) y la esteroidogénesis en las células ováricas, además de actuar sobre el ovario como un mecanismo de amplificación local para la acción de las gonadotrofinas, lo que facilita el desarrollo folicular.

En conclusión, este trabajo de investigación puede inferir que deberán establecerse nuevos criterios para la selección de los ovarios y ovocitos, según el estatus ovárico de hembras bovinas *Bos indicus* y sus cruces, para incrementar la producción de embriones in vitro. Por lo tanto, a través de los resultados presentados, se indica la posibilidad de predecir la competencia de desarrollo de los ovocitos, con base en el estatus reproductivo de la hembra bovina.

Por otra parte, el estudio del IGFs en bovinos, es un recurso valioso que proporciona datos de referencia importantes para estudios futuros del sistema IGF de mamíferos y ofrece nuevas perspectivas sobre las similitudes y diferencias entre el modelo animal y el ser humano.

REFERENCIAS

- [1] Shimizu T. Molecular and cellular mechanisms for the regulation of ovarian follicular function in cows. *Rep Develop.* 2016; 62:4.
- [2] Ghanipoor-Samami M, Javadmanesh A, Burns B, Thomsen D, Natrass G, Estrella, C *et al.* Atlas of tissue and developmental stage specific gene expression for the bovine insulin-like growth factor (IGF) system. 2018; PLOS ONE July 12;13(7): e0200466.
- [3] Ipsa E, Cruzat VF, Kagize JN, Yovich JL, Keane KN. Growth hormone and insulin-like growth factor action in reproductive tissues. *Frontiers in Endocrinology.* 2019;10:777.
- [4] Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafri A, Hsueh AJW. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology.* 1994; 135:1845-53.
- [5] Polat IM, Alçiğir E, Pekcan M, Vural SA, Özenç E, Canatan HE, *et al.* Characterization of transforming growth factor beta superfamily, growth factors, transcriptional factors, and lipopolysaccharide in bovine cystic ovarian follicles. *Theriogenology.* 2015; 84(6):1043-1052.
- [6] Berisha B, Schams D, Rodler D, Pfaff MW. Angiogenesis in the ovary – the most important regulatory event for follicle and corpus luteum development and function in cow – An overview. *Anat Histol Embryol.* 2016; 45(2):124-130.
- [7] Jiménez CR, de Azevedo JL, Silveira RG, Penitente-Filho J, Carrascal-Triana EL, *et al.* Effects of IGF-1 on in vitro culture of bovine preantral follicles are dose-dependent. *Reprod Domestic Anim.* 2016; 51:435-444.
- [8] Mazerbourg S, Monget P. Insulin-like growth factor binding proteins and IGFBP proteases: A dynamic system regulating the ovarian folliculogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:134.
- [9] Armstrong DG, G Baxter, C Hogg, K Woad. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. *Reproduction.* 2002; 123:789-797.
- [10] Neuvians TP, Pfaffl MW, Berisha B, Schams D. The mRNA expression of the members of the IGF-system in bovine corpus luteum during induced luteolysis. *Domestic Anim Endocrinology.* 2003; 25:359-372.
- [11] Armstrong DG, Webb R. Ovarian follicular dominance: The role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev Reproduction.* 1997; 2:139-146.
- [12] Monget P, Monniaux D. Growth factors and the control of folliculogenesis. *J Reprod Fertil.* 1995;49: 321-333.
- [13] Armstrong DG, Mc Evoy TG, Baxter G, Robinson JJ, Hogg Co, Woad KJ *et al.* Effect of energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol Reprod.* 2000;64:1624-1632.
- [14] Armstrong DG, Baxter G, Gutiérrez CG, Hogg Co, Glazyrin AL, Webb R. Insulin-like growth factor binding protein-2 and -4 mRNA expressions in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology.* 1998; 139:2146-2154.
- [15] Schams D, Berisha B, Kosmann M, Einspanier R, Amselgruber WM. Possible role of growth hormone, IGFs and IGF-binding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals. *Domestic Anim Endocrinology.* 1999;17:279-285.
- [16] Schams D, Berisha B, Kosmann M, Amselgruber WM. Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. *Domestic Anim Endocrinology.* 2002; 22:51-72.
- [17] Ruíz AZ, Kittok R. La subunidad NMDAR-1 del receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR) en el hipotálamo del ovino mediante el análisis de Western Blot. *Revista Científica, FCV-LUZ.* 2008;2:28-33.
- [18] Fernández A, Cabrera P, Díaz T, Ruíz A, Martínez G. Efecto del estatus reproductivo de vacas mestizas Cebú sobre la producción in vitro de embriones. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias UCV.* 2012; 53(2):89-96.
- [19] Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature.* 1991. 354:31-37.
- [20] Sugihara H, Moriyoshi K, Ishii T, Masu M, Nakanishi

- S. Structure and properties of seven isoforms of the NMDA receptors generated by alternative splicing. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 1992;185:826-832.
- [21] Sartori RL, Giménes L, Monteiro PL, Melo LF, Baruselli P, Bastos MR. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology*. 2016;86(1):32-40.
- [22] Lucy MC. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J Dairy Sci.*2000; 83:1635-1647.
- [23] Monget P, Martin GB. Involvement of insulin-like growth factors in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals. *Human Reprod.* 1997; 12:33-52.
- [24] Velásquez MA, Zaraza J, Oropeza A, Webband R, Niemann H. The role of IGF-1 in the *in vivo* production of bovine embryos from superovulated donors. *Reproduction Review*. 2009;137:161-180.
- [25] Silva JRV, Figueiredo JR, Van den Hurk R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*. 2003; 71:1193-1208.
- [26] Ruíz AZ, Domínguez C, Martínez N, Pinto-Santini L, Drescher K, Pérez R, *et al.* Efecto de la condición corporal y nivel de alimentación sobre la actividad ovárica, involución uterina y expresión del IGF-1 en vacas mestizas durante el postparto. *Interciencia*. 2010; 35: 752-758.
- [27] Einspanier R, Miyamoto A, Schams D, Mueller M, Brem G. Tissue concentration, mRNA expression and stimulation of IGF-I in luteal tissue during the oestrous cycle and pregnancy of cows. *J Reprod Fertility*. 1990; 90: 439-445.
- [28] Scaramuzzi RJ, Baird DT, Campbell BK, Driancourt MA, Dupont J, Fortune JE, *et al.* Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod Fertil Development*. 2011; 23: 444-467.
- [29] Mazerbourg S, Bondy CA, Zhou J, Monget P. The insulin-like growth factor system: a key determinant role in the growth and selection of ovarian follicles? A comparative species study. *Reprod Domestic Anim*. 2003; 38:247-258.
- [30] Perks CM, Peters AR, Wathes DC. Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors I and II and the type IGF-I receptor in the bovine ovary. *J Reprod Fertil*. 1999; 116:157-165.
- [31] Sakaquichi M, Dominko T, Yamauchi N, Leibfried-Rutledge ML, Nagai T, First NL. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicle oocytes by growth factor in vitro. *Reproduction*. 2002; 123: 135-142.