

# Tasa de fertilización, desarrollo y calidad de embriones bovinos Holstein producidos *in vitro* con semen sexado y adición de IGF-I

Fertilization rate, development and quality of Holstein bovine embryos produced *in vitro* with sexed semen and addition of IGF-I

OCTAVIO MARTÍNEZ-GUERRERO<sup>1</sup>, JAVIER ANTILLÓN-RUIZ<sup>1,2</sup>, FELIPE ALONSO RODRÍGUEZ-ALMEIDA<sup>1</sup>

Recibido: Noviembre 19, 2015

Aceptado: Marzo 15, 2016

## Resumen

La adición de IGF-I a los medios de fertilización *in vitro* y cultivo de embriones ha sido propuesta como una forma de imitar las señales maternas de la gestación temprana en el útero. El objetivo del presente estudio fue evaluar la adición del factor de crecimiento similar a la insulina tipo-I (IGF-I) sobre la tasa de fertilización con semen sexado (SS) y de blastocistos bovinos producidos *in vitro*, así como la calidad embrionaria. Se utilizó SS de tres toros Holstein para la fertilización *in vitro* (FIV) de ovocitos obtenidos de ovarios recolectados en rastro, para lo cual se agregó IGF-I (100 ng/ml) en los medios de fertilización y desarrollo embrionario a diferentes tiempos: T1 (IGF-I, d 0-7; n= 393); T2 (IGF-I, d 0-3; n= 394); T3 (IGF-I, d 3-7; n= 394); y T4 (sin IGF-I o grupo control; n= 394). Se evaluó el porcentaje de fertilización al día tres de incubación y el día siete se evaluó la calidad y estadio de los blastocistos. Los datos se analizaron con el procedimiento CATMOD de SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC), ajustando un modelo que incluyó el efecto de tratamiento (con y sin IGF-I, para tasa de fertilización; y T1, T2, T3 y T4 para otras variables). La adición de IGF-I al medio afectó la tasa de fertilización (34 vs 42%;  $P < 0.05$ ) y no hubo efecto ( $P > 0.05$ ) de tratamiento para la tasa de blastocistos/ovocitos fertilizados, ni para calidad de los blastocistos. Se concluye que bajo las condiciones del presente estudio, la adición de IGF-I a los medios de fertilización y cultivo *in vitro* no tiene un efecto benéfico para la producción de embriones, pero sí afecta la fertilidad del semen sexado.

**Palabras clave:** IGF-I, embriones, fertilización *in vitro*, semen sexado.

## Abstract

The addition of IGF-I to the *in vitro* fertilization and embryo culture media has been suggested as a means to imitate maternal signals during early gestation in the uterus. The aim of the present study was to evaluate the addition of insulin-like growth factor I (IGF-I) on the fertilization rate with sexed semen (SS) and bovine blastocysts produced *in vitro* as well as the embryo quality. Semen used was from three Holstein bulls for *in vitro* fertilization and oocytes were obtained from ovaries collected on a slaughterhouse. For which IGF-I (100 ng/ml) was added in the means of fertilization and embryo development at different times: T1 (IGF-I, d 0-7; n= 393); T2 (IGF-I, d 0-3; n= 394); T3 (IGF-I, d 3-7; n= 394); and T4 (without IGF-I or control group; n= 394). Fertilization rate was evaluated at day 3 of incubation, and at day 7, blastocysts quality and stage were assessed. Data were analyzed with CATMOD of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC), adjusting a model including the effect of treatment (with and without IGF-I, for fertilization rate; and T1, T2, T3 and T4, for other variables). The addition of IGF-I to the media affected the fertilization rate (34 vs 42%;  $P < 0.05$ ) and there was not effect ( $P > 0.05$ ) of treatment for the rate blastocysts/fertilized oocytes fertilized or for the quality of blastocysts. It is concluded that under the conditions of this study, with the use of sexed semen, the addition of IGF-I to the media of fertilization and culture *in vitro* does not have a beneficial effect on the production of embryos, but it does affect the fertility of the sexed semen.

**Keywords:** IGF-I, embryo, *in vitro* fertilization, sexed semen.

<sup>1</sup> Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua. Periférico Francisco R. Almada, Km 1 de la Carretera Chihuahua-Cuauhtémoc. Chihuahua, Chih., México, 31031. Tel (614) 434-0303.

<sup>2</sup> Dirección electrónica del autor de correspondencia: jantillon@uach.mx.

## Introducción

**E**n los establos lecheros, la obtención de crías hembras es prioridad respecto a los machos, dado el objetivo de la producción de leche. El uso de semen sexado (SS) es una alternativa disponible para tal fin; sin embargo, la fertilidad de dicho semen es menor (20 - 40%) al no sexado cuando se utiliza mediante inseminación artificial (IA); Seidel Jr. *et al.*, 1999). Afortunadamente, la producción in vitro (PIV) de embriones es una forma eficiente de utilizar el SS para lograr más embriones hembra (Rasmussen *et al.*, 2013).

En diversos estudios (Tonello *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2009) se reportan tasas de blastocistos producidos *in vitro* mediante el uso de SS superiores al 30%. No obstante, la calidad de dichos embriones es inferior a la de los embriones producidos *in vivo*, en términos de morfología, metabolismo, expresión génica y criotolerancia (Rizos *et al.*, 2008). Mediante la PIV, alrededor de 90% de los ovocitos maduran, mientras que 80% logra la fertilización y segmentación; sin embargo, únicamente 30 a 40% de los ovocitos inmaduros se convierten en blastocistos a los 7 a 8 d pos-fertilización (Lonergan, 2007). Así mismo, cuando la PIV de embriones se hace con SS (Cran *et al.*, 1993), la tasa de éxito es menor que cuando se usa semen convencional (Xu *et al.*, 2009). Además, hay reportes que indican que los embriones PIV con SS disminuyen su competencia para lograr una gestación debido a alteraciones tanto ultraestructurales (Palma *et al.*, 2008) como del RNAm en genes importantes para su desarrollo, como los que intervienen en la glucólisis (Morton *et al.*, 2007); aunque previamente Xu *et al.* (2006) indicaron que no había diferencia en la tasa de gestación obtenida con embriones PIV con SS y semen no sexado.

Una forma de optimizar la PIV de embriones es imitando las señales maternas de la gestación a través del medio de cultivo embrionario (Gopichandran y Leese, 2006; Vajta *et al.*, 2008). Esto puede lograrse a través de factores como IGF-I (Lima *et al.*, 2006; Loureiro *et al.*, 2009), cuya expresión se ha observado en útero, oviducto y en el mismo embrión (Velázquez *et al.*, 2008). Bonilla *et al.* (2011a)

demonstraron que su adición en la PIV de embriones incrementa la tasa de ovocitos que se convierten en blastocistos, lo cual se atribuye a sus propiedades anti-estrés (Jousan y Hansen, 2007) y antioxidantes (Bonilla *et al.*, 2011b). Sin embargo, se desconoce su efecto en embriones generados con SS, por lo que, el objetivo del presente estudio fue evaluar las tasas de fertilización de ovocitos, porcentaje de blastocistos y calidad de embriones de bovino PIV utilizando SS y agregando IGF-I a los medios de cultivo.

## Materiales y métodos

### *Producción de embriones in vitro*

#### *Preparación del IGF-I.*

Se preparó la solución stock para IGF-I recombinante humano (Sigma, I1271) con 1 mg/ml añadiendo 10 mM de HCL (ácido clorhídrico). Se almacenó a -20 °C en alícuotas de 10 µl. La concentración de IGF-I adicionada en los medios de fertilización y desarrollo embrionario (100 ng/ml) se basó de los valores encontrados en sangre de vacas lecheras (Falkenberg *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010) y estudios *in vitro* realizados por Bonilla *et al.* (2011a).

#### *Colección y maduración de ovocitos.*

Se usaron ovarios de vacas Holstein colectados de un rastro tipo inspección federal (TIF), los cuales fueron transportados al laboratorio en solución salina estéril (0.15 M) a temperatura ambiente. Los complejos *ovocito-cúmulus* (COCs) fueron aspirados de folículos antrales de 2 a 8 mm de diámetro; se seleccionaron ovocitos con más de tres capas

de células cumulares compactas y citoplasma homogéneamente granuloso. Los COCs se lavaron en medio químicamente definido (CDM, por sus siglas en inglés), amortiguado con Hepes y luego con medio de maduración (CDM-M; De la Torre-Sánchez *et al.*, 2006). Cincuenta COCs fueron madurados en platos de cuatro pocillos (Nunclon, Roskilde, Denmark), conteniendo 1 ml de CDM-M con 0.5% FAF-BSA (Sigma, A-6003), 15 ng/ml de FSH (NIH-FSH-S17; NIH, Bethesda, MD), 2 µg/ml de estradiol-17β (Sigma, E-2257), 50 ng/ml EGF (Sigma, E-9644) y 0.1 mM cisteamina. Finalmente, estos fueron incubados a 38.5 °C con 5% de CO<sub>2</sub> en aire por 23 h.

#### *Preparación del semen sexado.*

Se utilizó semen de 3 sementales Holstein para este estudio. Las pajillas (0.25 ml) contenían ~2 x 10<sup>6</sup> de células espermáticas y se descongelaron en baño maría a 35 °C por 30 s. Posteriormente, se vertió en la parte superior de un gradiente de Percoll (P-1644, Sigma) con 2 ml al 90% y 2 ml al 45% en medio Sperm-TALP (Tryode's modificado; Parrish *et al.*, 1989), para ser centrifugado por 20 min a 1300 rpm. El pellet espermático (50 µl de SS) resultante fue lavado con 4.5 ml de medio para fertilización (F-CDM; De La Torre-Sánchez *et al.*, 2006) suplementado con 0.5% BSA, 5 mM cafeína (C-0750, Sigma) y 2 µg/ml de heparina (H-3125, Sigma). La muestra fue centrifugada nuevamente por 5 min a 1300 rpm y el sobrenadante fue descartado, quedando aproximadamente 50 µl de SS; se tomó una muestra de 2 µl para determinar la concentración espermática con la cámara de Neubauer. La concentración final fue de 4x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml.

#### *Fertilización in vitro.*

El total de COCs madurados se dividió en dos tratamientos (IGF-1 y control). Posteriormente, en grupos de 30, los COCs fueron adicionados en microgotas de 55 ml con medio F-CDM o F-CDM/IGF-1 (100 ng/ml de IGF-I) y cubiertas con aceite mineral en una caja de petri. Después, se adicionaron 20 ml de la

suspensión espermática, con una concentración final de 4 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml. Los gametos fueron co-incubados durante la noche (18 ± 1 h) a 38.5 °C con 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Posteriormente, los COCs fueron vigorosamente agitados en un volumen de 100 ml de medio por 1 min para remover las células cumulares.

#### *Cultivo in vitro de embriones.*

Los presuntos cigotos fueron enjuagados en H-CDM-1 (Hepes CDM + Aminoácidos no esenciales, 10 mM EDTA, 0.5% FAF – BSA, 0.5 mM fructosa) y cultivados en CDM-1 ó CDM-1/IGF-1 (100 ng/ml de IGF-1) por 56 h en 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> a 38.5 °C. Después de 56 a 60 h, los embriones de más de ocho células se enjuagaron en H-CDM-2 (Hepes CDM-1 sin EDTA pero con aminoácidos esenciales y no esenciales y 2 mM de fructosa). Finalmente, se cultivaron en CDM-2 o CDM-2/IGF-1 (100 ng/ml de IGF-1) por 4 d.

#### *Evaluación de embriones.*

Al día tres, solo embriones de ocho o más células se siguieron cultivando, los demás se descartaron. Para blastocistos, el día siete se evaluó la calidad y estadio embrionario en base al código de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, 1998).

#### *Diseño experimental.*

Se realizaron 8 corridas (repeticiones) de PIV de embriones en las que se evaluó el efecto de la adición del IGF-I sobre la tasa de FIV con SS, la producción de blastocistos y su calidad. Para las variables de producción de blastocistos y su calidad, se tuvieron cuatro tratamientos de acuerdo al día de desarrollo embrionario en que se adicionó el IGF-I: T1 (IGF-I, 0-7 d; n= 393); T2 (IGF-I, 0-3 d; n= 394); T3 (IGF-I, 3-7 d; n=394) y T4 (sin IGF-I o grupo control; n= 394). Para este estudio se utilizaron un total de 1,575 ovocitos distribuidos entre los cuatro tratamientos descritos con anterioridad.

#### *Análisis estadístico.*

Los datos para porcentaje de fertilización, blastocistos y calidad de los mismos, fueron

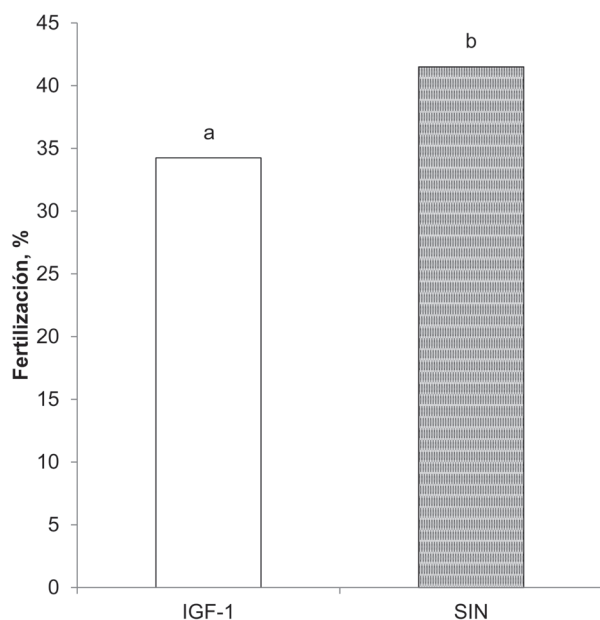
analizados mediante técnicas de análisis de datos categóricos con el procedimiento CATMOD de SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). El modelo ajustado incluyó los factores de tratamiento (con y sin IGF-I, para tasa de fertilización; y T1, T2, T3 y T4, para las otras variables). El efecto de semental no fue evaluado debido a la poca disponibilidad de semen que impidió se usaran los tres toros para la fertilización in vitro en cada corrida.

## Resultados y discusión

### *Producción de embriones in vitro.*

**Evaluación de la tasa de fertilización.** De acuerdo al análisis realizado, el tratamiento con IGF-I (34.3%) afectó la tasa de fertilización ( $P < 0.05$ ) en comparación con el grupo sin IGF-I (41.5%) al momento de la FIV (Figura 1).

**Figura 1.** Tasa de fertilización por tratamiento (IGF-1, adicionado con 100 ng/ml; SIN, grupo control).



<sup>a,b</sup> Literales diferentes entre tratamientos denotan diferencia estadística ( $P < 0.05$ ).

La concentración del IGF-I en plasma seminal bovino es de 116 a 144 ng/ml (Henricks *et al.*, 1998; Hoeflich *et al.*, 1999). La baja calidad seminal encontrada en toros con

deficiente desempeño reproductivo es asociada con niveles significativamente anormales ( $194 \pm 26$  ng/ml) (Hoeflich *et al.*, 1999). Estos hallazgos sugieren que el IGF-I puede regular la función del espermatozoide al momento de la fertilización (Selvaraju *et al.*, 2009). Sin embargo, su funcionalidad depende de la presencia del receptor (IGF-IR) en el acrosoma y de proteínas de enlace (IGFBPs), las cuales no están disponibles en los sistemas *in vitro*, con lo cual se estima que la ausencia de dichas proteínas limitó la capacidad fertilizante de los espermatozoides al momento de la fecundación, ya que en condiciones *in vivo* los eventos de pre-fertilización en el aparato reproductivo de la hembra están regulados por una interacción entre IGF-I oviductual y los receptores del IGF-I en el acrosoma del espermatozoide (Suarez, 1997). Así lo indicaron Mahmoud y Parrish (1996), quienes reportaron que los factores solubles oviductuales mejoran la capacitación del espermatozoide bovino; por lo tanto, el IGF-I en el aparato reproductivo de la hembra interviene en el desempeño espermático al momento de fertilizar el ovocito y en lograr la fertilización.

Existen diversas diferencias entre toros sobre la habilidad de los espermatozoides para fertilizar ovocitos a través de FIV (Shi *et al.*, 1990; Lonergan, 1994). Como se discutió anteriormente, toros con baja fertilidad tienen niveles elevados de IGF-I en plasma seminal; sin embargo, en condiciones *in vitro*, Dahli *et al.* (2009) llevaron a cabo un experimento utilizando IGF-I en semen de toros con alto y bajo rango de fertilidad; los resultados obtenidos mostraron que cuando el nivel de IGF-I es estandarizado en 100 ng/ml, el porcentaje de fecundación de los sementales con baja fertilidad es similar al de los toros con alta fertilidad (67.7 vs 66.4%, respectivamente), logrando así demostrar que el IGF-I mejora el desempeño de los espermatozoides con sementales de baja fertilidad. Aunque, estos resultados difieren de los encontrados en nuestro estudio, ya que cuando se utilizó IGF-I al momento de la fertilización se perjudicó la fertilización.



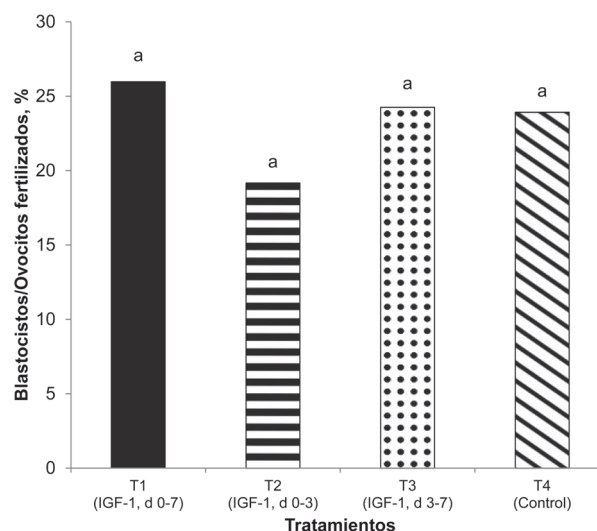
Dicho hallazgo podría deberse también a que el IGF-I alteró la funcionalidad del ovocito, ya que Hashizume *et al.* (2000) y Stevenson y Whates (1996) afirman que los receptores para IGF-I son detectados en células de la granulosa en el ovario, en epitelio secretor del oviducto y en glándulas endometriales del útero de hembras no gestantes. Lo que hace suponer que el IGF-I mantiene un efecto regulador en la fertilización del ovocito; aunque por otra parte, Sirisathien *et al.* (2003) afirman que el IGF-I no tiene efecto sobre la fertilización o en estadios tempranos del embrión.

El uso de SS en programas de FIV es asociado a una alta variabilidad de los resultados, dependientes en gran medida del semental (Barceló-Fimbres y Seidel Jr, 2007), así como del desarrollo embrionario posterior (Ward *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en este estudio para la tasa de fertilización con SS son similares a lo alcanzado por Tonello *et al.* (2005), pero inferiores a los reportados por Cebrian-Serrano *et al.* (2013) y Rasmussen *et al.* (2013); posiblemente, esto sea debido a que ellos utilizaron ovocitos aspirados *in vivo* a través de punción ovárica (OPU por sus siglas en inglés), los cuales tienen mayor competencia en lograr la fertilización que ovocitos provenientes de vacas enviadas a rastro (Dahli *et al.*, 2009), pues dichos animales presentan un sin número de problemas reproductivos, razón por la cual se determina el fin de su vida productiva.

**Evaluación de la tasa de blastocistos.** No se encontró diferencia ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos para la tasa de ovocitos fertilizados que alcanzaron el estadio de blastocisto con SS. Estos resultados se presentan en la Figura 2; El porcentaje de ovocitos que llegaron al estadio de blastocisto, contrasta con lo reportado por Sirisathien *et al.* (2003), quienes mostraron que el IGF-I a 10 y 50 ng/ml mejoraba la proporción de embriones con 4 células que alcanzaban el estadio de blastocisto cuando eran comparados con el grupo control (54.4, 64.2 y 39.3%, respectivamente). Aunado a esto, Bonilla *et al.* (2011a) obtuvieron una mayor tasa de blastocistos (~30%) cuando adicionaban IGF-I

(100 ng/ml) el día 3 pos-fertilización, aunque en el presente estudio se utilizó SS, el cual tiene menor tasa de fertilidad. Estos mismos autores afirman que este efecto favorable en el desarrollo embrionario es debido a la activación de rutas proteicas, tales como la proteína MAPK, cuya función está mediada por IGF-I y participa en eventos claves como proliferación celular y bloqueo de la apoptosis (Jousan y Hansen, 2007), incluyendo disminución del estrés, tanto calórico (Jousan *et al.*, 2008) como oxidativo (Bonilla *et al.*, 2011b).

**Figura 2.** Tasa de blastocistos/ ovocitos fertilizados de acuerdo al día de adición de IGF-I al medio de cultivo embrionario.



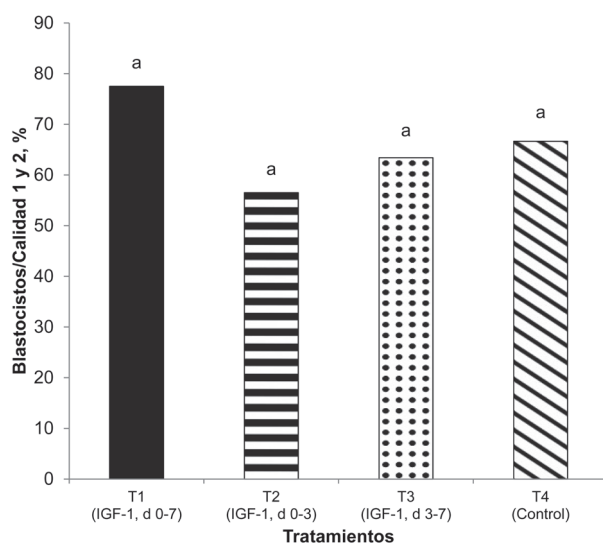
<sup>a</sup> Literal similar entre tratamientos denota que no hubo diferencia estadística ( $P > 0.05$ ).

El IGF-I aumenta la tasa de blastocistos debido a que regula eventos claves asociados con el genoma embrionario (Bonilla *et al.*, 2011a), por lo tanto, la falta de desarrollo embrionario en etapas tempranas (primeros 3 días pos-fertilización) puede ser atribuida a que el embrión aún no tiene formado ni activado su propio genoma (Memili y First, 2000) y se encuentra regulando sus procesos vitales a través del genoma materno; aunque en nuestro análisis para ovocitos que se convierten en blastocistos no existió diferencia significativa entre tratamientos, hubo una tendencia

numérica negativa en el T2 (IGF-I, 0-3d), de tal manera que el retiro del IGF-I para etapas posteriores del desarrollo embrionario tendió a limitar la capacidad del embrión para convertirse en blastocisto.

**Evaluación de la calidad embrionaria.** Los resultados obtenidos para calidad embrionaria de acuerdo a los embriones que alcanzaron la calidad 1 y 2 (IETS; 1998) (Figura. 3) muestran que no hubo diferencia entre tratamientos ( $P > 0.05$ ).

**Figura 3.** Tasa de blastocistos con calidad 1 y 2 por tratamiento.



<sup>a</sup> Literal igual entre tratamientos denota que no hubo diferencia estadística ( $P > 0.05$ ).

Loureiro *et al.* (2009) reportaron una tasa de blastocistos viables para transferencia del 18%, cuando estos fueron desarrollados con IGF-I y fertilizados con SS; estos resultados no coinciden con los alcanzados en este estudio (6.1%); tampoco concuerdan con la tasa de 11.7% obtenida por Cebrian-Serrano *et al.* (2013), ni con el 13% de Rasmussen *et al.* (2013); sin embargo, estos últimos no utilizaron IGF-I en sus medios de cultivo embrionario. En este sentido, Block y Hansen (2007) lograron una tasa de blastocistos transferibles fertilizados con semen convencional del 14.7% cuando utilizaban IGF-I en el medio de cultivo.


## Conclusión

Bajo las condiciones del presente estudio, se concluye que la adición de IGF-I a los medios de fertilización y cultivo *in vitro* no tiene un efecto benéfico para la producción de embriones, pero sí afecta la fertilidad del semen sexado.

## Literatura citada

- BARCELÓ-FIMBRES, M. and G. E. Seidel Jr. 2007. Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 74:1406-1418.
- BLOCK, J., M. Drost, R. L. Monson, J. J. Rutledge, R. M. Rivera, F. F. Paula-Lopes, O. M. Ocon, C. E. Krininger III, J. Liu, and P. J. Hansen. 2003. Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of *in vitro*-produced embryos to heat-stressed, lactating cows. *J. Anim. Sci.* 81:1590-1602.
- BLOCK, J. and P. J. Hansen. 2007. Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of *in vitro* produced embryos following transfer to lactating dairy cows. *Theriogenology* 67:1518-1529.
- BONILLA, A. Q. S., M. Ozawa, and P. J. Hansen. 2011a. Timing and dependence upon mitogen-activated protein kinase signaling for pro-developmental actions of insulin-like growth factor 1 on the preimplantation bovine embryo. *Growth. Horm. IGF. Res.* 21:107-111.
- BONILLA, A. Q. S., L. J. Oliveira, M. Ozawa, E. M. Newsom, M. C. Lucy, and P. J. Hansen. 2011b. Developmental changes in thermoprotective actions of insulin-like growth factor-1 on the preimplantation bovine embryo. *Mol. Cell. Endocrinol.* 332:170-179.
- BREUKELMAN, S. P., Z. Perényi, M. A. M. Taverne, H. Jonker, G. C. van der Weijden, P. L. A. M. Vos, L. de Ruigh, S. J. Dieleman, J. F. Beckers, and O. Szenci. 2012. Characterisation of pregnancy losses after embryo transfer by measuring plasma progesterone and bovine pregnancy-associated glycoprotein-1 concentrations. *Vet. J.* 194:71-76.
- CEBRIAN-SERRANO, A., M. A. Silvestre, S. Ruiz, and D. Rath. 2013. Effect of sex-sorted sperm on development and quality of *in vitro*-produced bovine embryos derived from ovum pick up oocytes. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 31 (Suppl. 2):111-122.
- CRAN, D. G., L. A. Johnson, N. G. A. Miller, D. Cochrane, and C. Polge. 1993. Production of calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and *in vitro* fertilization. *Vet. Rec.* 132:40-41.
- DAHLI, A., V. M. Anchamparuthy, S. P. Butler, R. E. Pearson, and F. C. Gwazdauskas. 2009. *In vitro* development of bovine embryos cultured with stem cell factor or insulin-like growth factor-I following IVF with semen of two bulls having different field fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 116:188-195.
- DE LA TORRE-SÁNCHEZ, J. F., K. M. Preis, and G. E. Seidel Jr. 2006. Metabolic regulation of *in vitro* produced bovine embryos. I. Effects of metabolic regulators at different glucose concentrations with embryos produced by semen of different bulls. *Reprod. Fertil. Dev.* 18:585-596.
- FALKENBERG, U., J. Haertel, K. Rotter, M. Iwersen, G. Arndt, and W. Heuwieser. 2008. Relationships between the concentration of insulin-like growth factor-1 in serum in dairy cows in early lactation and reproductive performance and milk yield. *J. Dairy. Sci.* 91:3862-3868.

- FATEHI, A. N., M. M. Bevers, E. Schoevers, B. A. Roelen, B. Colenbrander, and B. M. Gadella. 2005: DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J. Androl.* 27:176-188.
- GOPICHANDRAN, N. and H. J. Leese. 2006. The effect of paracrine/autocrine interactions on the *in vitro* culture of bovine implantation embryos. *Reproduction* 131:269-77.
- HASHIZUME, T., K. Ohtsuky, and N. Matsumoto. 2000. Plasma insulin-like growth factor-I concentrations increase during the estrous phase in goats. *Domest. Anim. Endocrinol.* 18:253-263.
- HENRICKS, D. M., A. J. Kouba, B. R. Lackey, W. R. Boone, and S. L. Gray. 1998. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. *Biol. Reprod.* 59:330-337.
- HOEFELICH, A., H. D. Reichenbach, J. Schwartz, T. Grupp, M. M. Weber, J. Foll, and E. Wolf. 1999. Insulin-like growth factors and IGF-binding proteins in bovine seminal plasma. *Domest. Anim. Endocrinol.* 17:39-51.
- INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY (IETS). 1998. Manual of the International Embryo Transfer Society. Third Edition. Savory, Illinois, E.U.A.
- JOUSAN, F. D., L. J. Oliveira, and P. J. Hansen. 2008. Short-Term culture of *in vitro* produced bovine preimplantation embryos with insulin-like growth factor-I prevents heat shock-induced apoptosis through activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway. *Mol. Reprod. Dev.* 75:681-688.
- JOUSAN, F. D. and P. J. Hansen. 2007. Insulin-like growth factor-I promotes resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock through actions independent of its anti-apoptotic actions requiring PI3K signaling. *Mol. Reprod. Dev.* 74:189-196.
- KHURANA, N. K. and H. Niemann. 2000. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology* 54:741-756.
- LIMA, P. F., M. A. Oliveira, M. H. Santos, H. D. Reichenbach, M. Weppert, F. F. Paula-Lopes, C. C. Neto, and P. B. Goncalves. 2006. Effect of retinoids and growth factor on *in vitro* bovine embryos produced under chemically defined conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 95:184-192.
- LONERGAN, P. 1994. The application of *in vitro* fertilization techniques to the prediction of bull fertility. *Reprod. Dom. Anim.* 29:12-21.
- LONERGAN, P. 2007. State of the art embryo technologies in cattle. Reproduction in Domestic Ruminants VI. Nottingham University Press. Nottingham, U.K. 315-325.
- LONERGAN, P., T. Fair, D. Corcoran, and A. C. Evans. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65:137-152.
- LOUREIRO, B., L. Bonilla, J. Block, J. M. Fear, A. Q. Bonilla, and P. J. Hansen. 2009. Colony-stimulating factor 2 (CSF-2) improves development and posttransfer survival of bovine embryos produced *in vitro*. *Endocrinology* 150:5046-5054.
- MAHMOUD, A. I. and J. J. Parrish. 1996. Oviduct fluid and heparin induce similar surface changes in bovine sperm during capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* 43:554-560.
- MEMILI, E. and N. L. First. 2000. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 8:87-96.
- MOORE, K., J. M. Kramer, C. J. Rodriguez-Sallaberry, J. V. Yelich, and M. Drost. 2007. Insulin-like growth factor (IGF) family genes are aberrantly expressed in bovine conceptuses produced *in vitro* or by nuclear transfer. *Theriogenology* 68:717-727.
- MOORE, K. and W. W. Thatcher. 2006. Major Advances Associated with Reproduction in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 89:1254-1266.
- MORTON, K. M., D. Herrmann, B. Sieg, C. Struckmann, W. M. Maxwell, D. Rath, G. Evans, A. Lucas-Hahn, H. Niemann, and C. Wrenzycki. 2007. Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilisation *in vitro* using flow-cytometrically sex-sorted sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 74:931-940.
- PALMA, G. A., N. Olivier, Ch. Neumüller, and F. Sinowatz. 2008. Effects of Sex-sorted Spermatozoa on the Efficiency of *in vitro* Fertilization and Ultrastructure of *in vitro* Produced Bovine Blastocysts. *Anat. Histol. Embryol.* 37:67-73.
- PARRISH, J. J., J. L. Susko-Parrish, M. L. Leibfried-Rutledge, E. S. Critser, and W. H. Eyestone. 1986: Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25:591-600.
- RASMUSSEN, S., J. Block, G. E. Seidel Jr, Z. Brink, K. McSweeney, P. W. Farin, L. Bonilla, and P. J. Hansen. 2013. Pregnancy rates of lactating cows after transfer of *in vitro* produced embryos using X-sorted sperm. *Theriogenology* 79:453-461.
- RIZOS, D., M. Clemente, P. Bermejo-Alvarez, J. de La Fuente, P. Lonergan, and A. Gutierrez-Adan. 2008. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reprod. Domest. Anim.* 43 (Suppl. 4):44-50.
- RIZOS, D., F. Ward, P. Duffy, M. Boland, and P. Lonergan. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* 61:234-248.
- SAGIRKAYA, H., M. Misirlioglu, A. Kaya, N. L. First, J. J. Parrish, and E. Memili. 2006. Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. *Reproduction* 131:895-904.
- SARTORI, R., A. H. Souza, J. N. Guenther, D. Z. Caraviello, L. N. Geiger, J. L. Schenk, and M. C. Wiltbank. 2004. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Anim. Reprod.* 1:86-90.
- SAS. Institute. 2002. SAS. User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- SEIDEL JR, G. E., J. L. Schenk, L. A. Herickhoff, S. P. Doyle, Z. Brink, R. D. Green, and D. G. Cran. 1999. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 52:1407-1420.
- SELVARAJU, S., I. J. Reddy, S. Nandi, S. B. N. Rao, and J. P. Ravindra. 2009. Influence of IGF-I on buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation and fructose uptake *in vitro*. *Ani. Reprod. Sci.* 113:60-70.
- SHI, D. S., K. H. Lu, and I. Gordon. 1990. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development *in vitro*. *Theriogenology* 33:324.
- SIRISATHIEN, S., H. J. Hernandez-Fonseca, and B. G. Brackett. 2003. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 77:21-32.
- STEVENSON, K. and D. Whates. 1996. Insulin-like growth factors and their binding proteins in the ovine oviduct during the oestrus cycle. *J. Reprod. Fert.* 108:31-40.
- SUAREZ, S. S. 1997. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. *Biol. Reprod.* 58:1105-1107.
- TONELLO, T. T. M., M. F. Accorsi, M. F. Ferraz, M. R. Waranabe, F. D. P. Meirelles, F. V. Meirelles, and Y. F. Watanabe. 2005. Produção *in vitro* de embriões bovinos a partir de sêmen sexado. *Acta Sci. Vet.* 33 (Suppl. 1).
- VAJTA, G., T. Krosi, Y. Du, K. Nakata, S. Leda, M. Kuwayama, and Z. P. Nagy. 2008. The well of the well system: an efficient approach to improve embryo development. *Reproductive BioMedicine Online* 17:73-81.

- VELÁZQUEZ, M. A., L. J. Spicer, and D. C. Wathes. 2008. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Domest. Anim. Endocrinol.* 35:325-242.
- WARD, F., D. Rizos, M. P. Boland, and P. Lonergan. 2003. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. *Theriogenology* 59:1575-1584.
- WU, M., J. Hall, R. M. Akers, and H. Jiang. 2010. Effect of feeding level on serum insulin-like growth factor I (IGF-I) response to growth hormone injection. *J. Endocrinol.* 206:37-45.
- XU, J., S. A. Chaubal, and F. Du. 2009. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. *Theriogenology* 71:39-47.
- XU, J., Z. Guo, L. Su, T. L. Nedambale, J. Zhang, and J. Schenk. 2006. Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized *in vitro* with sex-sorted sperm. *J. Dairy Sci.* 89:2510-2518.
- YANG, X., S. Jiang, and R. H. Foote. 1993. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. *Mol Reprod Dev.* 34:94-100.
- YOSHIZAWA, M., H. Konno, S. Zhu, S. Kageyama, E. Fukui, S. Muramatsu, S. Kim, and Y. Araki. 1999. Chromosomal diagnosis in each individual blastomere of 5 to 10-cell bovine embryos derived from *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 51:1239-1250. 

---

Este artículo es citado así:

Martínez-Guerrero, O. J. Antillón-Ruiz, F. A. Rodríguez-Almeida. 2015. Tasa de fertilización, desarrollo y calidad de embriones bovinos Holstein producidos in vitro con semen sexado y adición de IGF-I. *TECNOCIENCIA Chihuahua* 9(3): 140-147.

## Resumen curricular del autor y coautores

**OCTAVIO MARTÍNEZ GUERRERO.** Obtuvo el título de Médico Veterinario Zootecnista en 2011 por la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Zacatecas. En 2015 logra el título de Maestro en Ciencias en el área de Reproducción y Genética Animal por la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Desde 2015 a la fecha, labora en el Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria de Zacatecas como Profesional Zoon sanitario (Supervisor Distrital).

**JAVIER ANTILLÓN RUIZ.** Obtuvo el título de Ingeniero Zootecnista en Sistemas de Producción en el 2008 y el grado de Maestría en Ciencias en el área de Reproducción y Genética Animal en el 2012 en la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Desde el 2010 labora en esta Facultad y su área de especialización es la producción in vitro de embriones. Es autor y coautor de tres artículos científicos y dos ponencias en congreso. Del año 2015 a la fecha, colabora como asesor del centro de biotecnologías reproductivas de la Unión Ganadera Regional de Chihuahua.

**FELIPE ALONSO RODRÍGUEZ ALMEIDA.** Es Ingeniero Zootecnista (1988) y Maestro en Ciencias en Producción Animal, con área mayor en Reproducción y Genética (1990), por la Universidad Autónoma de Chihuahua. Obtuvo su doctorado en la Universidad de Nebraska-Lincoln (1994) en el área de Mejoramiento Animal, para lo cual realizó su disertación enfocada al desarrollo de modelos para la evaluación genética de bovinos carne en poblaciones multirraciales. Su trabajo de investigación en México lo ha enfocado principalmente al desarrollo de evaluaciones genéticas nacionales, el mantenimiento de la integridad de la membrana espermática en semen criopreservado de ovino, la evaluación de cruza para la producción de carne de ovino y bovino, con énfasis especial en la eficiencia biológica y los factores que influyen en la misma, y la incorporación de la genética molecular y la genómica en los programas de mejora genética de ovinos en México. Es autor y coautor de más de 40 artículos en revistas indizadas y arbitradas, tres capítulos en libro, y más de 60 trabajos presentados en congresos nacionales e internacionales. Se ha desempeñado como académico en la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua desde 1990 y ha sido Miembro del Sistema Nacional de Investigadores desde 1993 (Candidato 1993-1996, Nivel I 1996-2002, 2008-2018).