

## Efecto del suplemento Insulina-Transferrina-Selenio (ITS) sobre la tasa de desarrollo y calidad de embriones bovinos *in vitro*

Effect of Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) supplementation on development rate and quality of bovine embryos *in vitro*

Mariano Eliécer Acosta Lobo<sup>1\*</sup>, Pablo Andrés Robledo Salgado<sup>2</sup>, Luis Fernando Londoño Franco<sup>3</sup>, Viviana Torres Osorio<sup>4</sup>, Neil A. Vásquez Araque<sup>5</sup>

### RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del suplemento Insulina-Transferrina-Selenio (ITS) en el cultivo embrionario sobre la tasa de blastocistos y calidad embrionaria. Los cigotos de bovino obtenidos por maduración (MIV) y fertilización *in vitro* (FIV) fueron transferidos a medio Evolve en 4 grupos (T1: Sin suplemento ITS; T2: ITS las primeras 48 h de cultivo (CIV1); T3: ITS después del día 2 de cultivo (CIV2), T4: ITS todo el tiempo de cultivo (CIV1 + CIV2). Todos los procedimientos se realizaron a 38.5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa. Las tasas de clivaje y de blastocistos se determinaron a las 48 h y día 8 de cultivo, respectivamente. El número de células totales y la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en los blastocistos expandidos fueron determinados por tinción del núcleo con Hoechst y la oxidación de la sonda

<sup>1</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Grupo de Investigación en Ciencias Agropecuarias – GISCA, Institución Universitaria Visión de las Américas, Universidad Autónoma de las Américas, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, Palmira, Colombia

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación en Sistemas Agrarios Sostenibles – SAS, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Medellín, Colombia

<sup>4</sup> Universidad CES, Grupo de Investigación Biología-CES, Medellín, Colombia

<sup>5</sup> Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias, Grupo de Investigación en Biotecnología Animal, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Medellín, Colombia

\* E-mail: [mariano.acosta@uam.edu.co](mailto:mariano.acosta@uam.edu.co)

Recibido: 17 de mayo de 2023

Aceptado para publicación: 19 de enero de 2024

Publicado: 29 de febrero de 2024

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

fluorescente diacetato diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA). Los embriones cultivados de T4 presentaron la mayor tasa de blastocistos (32.6%) y número de células totales (145.6) comparada al grupo control sin ITS (26.2% y 98.6, respectivamente;  $p < 0.05$ ). Asimismo, la producción de EROs en los blastocistos de T4 fue menor ( $p < 0.05$ ) que la obtenida en los demás grupos de estudio. Los resultados demuestran que la adición del suplemento ITS durante todo el tiempo de cultivo embrionario tiene efectos benéficos sobre el porcentaje de blastocistos y calidad embrionaria, valorada por el número de células totales y la producción de EROs.

**Palabras clave:** estructuras embrionarias, insulina, transferrina, selenito de sodio, especies reactivas de oxígeno

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) supplementation in embryo culture on the blastocyst rate and embryo quality. The bovine zygotes obtained by *in vitro* maturation (MIV) and fertilization (IVF) were transferred to Evolve medium in 4 groups (T1: Without ITS supplement; T2: ITS the first 48 h of culture (CIV1); T3: ITS after day 2 of culture (CIV2), T4: ITS during all culture time (CIV1 + CIV2). All procedures were performed at 38.5 °C, 5% CO<sub>2</sub> and 90% relative humidity. The cleavage and blastocyst rates were determined at 48 h and day 8 of culture. The total cell number and the production of reactive oxygen species (ROS) in the expanded blastocysts were determined by staining the nucleus with Hoechst and the oxidation of the fluorescent probe dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA). The T4 cultured embryos presented the highest rate of blastocysts (32.6%) and total cell number (145.6) compared to the control group without STI (26.2% and 98.6, respectively;  $p < 0.05$ ). Likewise, the production of ROS in T4 blastocysts was lower ( $p < 0.05$ ) than that obtained in the other study groups. The results show that the addition of the ITS supplement throughout the embryo culture time has beneficial effects on the percentage of blastocysts and embryo quality, assessed by the number of total cells and the production of ROS.

**Key words:** oocytes, embryonic structures, insulin, transferrin, sodium selenite, reactive oxygen species

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han logrado progresos considerables en la maduración (MIV), fertilización (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV), y aunque los sistemas de producción *in vitro* de embriones (PIVE) son aptos para la generación de embriones bovinos sigue sin resolverse el problema de la baja cantidad y calidad de desarrollo y supervivencia de los embriones (Camargo *et al.*, 2006). Se ha

demostrado un retraso o freno en el desarrollo de embriones cultivados *in vitro* cuando se compara con los embriones desarrollados *in vivo* (Rizos *et al.*, 2002), siendo la concentración de oxígeno uno de los factores ambientales que puede contribuir a esta diferencia, debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), lo cual genera un estrés oxidativo al embrión (Favetta *et al.*, 2007; Takahashi, 2012). Además, la activación metabólica del embrión requiere moléculas energéticas tales como glucosa, piruvato

y lactato (Khurana y Niemann, 2000), lo cual a su vez contribuye a la generación de EROs (Dalvit *et al.*, 2005).

Con la finalidad de mejorar las tasas de producción y la calidad de los embriones se han estudiado estrategias en diferentes campos de investigación, como es el diseño de plataformas de cultivo de embriones (Swain y Smith, 2011; Smith *et al.*, 2012), el control de la producción de EROs con el uso de antioxidantes como el ácido ascórbico (Córdova *et al.*, 2010) y el  $\alpha$ -tocoferol (Olson y Seidel, 2000), o mediante cambios en los componentes del medio de incubación, entre ellos los suplementos energéticos como piruvato, lactato, acetoacetato, hidroxibutirato (Gómez *et al.*, 2002), glucosa y fructosa (Barceló-Fimbres y Seidel, 2007), fuentes de proteína como suero o albúmina (Mucci *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2007), hormonas como la hormona del crecimiento (Moreira *et al.*, 2002) e insulina (Augustin *et al.*, 2003) y factores de crecimiento (Mtango *et al.*, 2003).

El suplemento de insulina, transferrina y selenito de sodio (ITS) ha resultado exitoso en el desarrollo de diversos tipos de células (Van der Valk *et al.*, 2010), incluyendo sistemas de PIVE en porcinos (Jeong *et al.*, 2008; Quan *et al.*, 2008) y en bovinos (Córdova *et al.*, 2010). Esta combinación se considera de gran utilidad en el sistema de PIVE, ya que la insulina suple la deficiencia de factores moduladores del metabolismo energético del embrión. Algunos estudios han demostrado que la suplementación del medio con insulina o con factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I) aumenta la captación de glucosa (Riley y Moley, 2006), la síntesis de RNA y proteínas (Santos *et al.*, 2008) y genera una respuesta mitogénica y anti-apoptótica que mejora la tasa de desarrollo embrionario (Augustin *et al.*, 2003).

La transferrina media la disponibilidad de hierro al interior de la célula para la síntesis de citocromos, enzimas y proteínas como la mioglobina y la hemoglobina, y gracias a

su capacidad quelante disminuye la toxicidad de los iones  $Fe^{+3}$ , pero los mantiene disponibles para la célula. Además, cumple funciones antioxidantes al restringir el hierro catalítico para las reacciones generadoras de radicales libres (Kell, 2009). El último componente del suplemento, el selenito de sodio ( $Na_2SeO_3$ ) es un compuesto que hace parte de varias moléculas biológicas con funciones antioxidantes, como las proteínas tiorredoxinas y glutatión peroxidasa (GPxs), las cuales tienen actividad reductora sobre peróxidos (Battin y Brumaghim, 2009). Ante esto, El objetivo del artículo fue evaluar el efecto del suplemento Insulina-Transferrina-Selenio (ITS) sobre el porcentaje de blastocistos y la calidad embrionaria determinado por el número de células totales y producción de EROs.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Consideraciones Éticas

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, mediante Oficio CEMED 019 del 14 de mayo de 2012.

### Sitio de Estudio

Los complejos oocito cúmulo (COCs) se obtuvieron de ovarios de bovinos sacrificadas en la planta de beneficio de Envigado ENVICárnicos (Envigado, Antioquia), mientras que las técnicas relacionadas con la producción y evaluación de embriones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Genética de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL), sede Medellín.

### Recuperación de Oocitos y Maduración *in vitro* (MIV)

Los ovarios colectados se depositaron en solución tampón fosfato salino (PBS) es-

téril a 35 °C y trasladados durante unos 30 min al laboratorio para su procesamiento. Allí se procedió al lavado de los ovarios por tres veces consecutivas con PBS a 35 °C. Luego, utilizando una aguja N.º 18 en jeringa de 5 mL se aspiraron los folículos que presentaban un diámetro de 3 a 6 mm. El líquido folicular se depositó en tubos cónicos de 15 mL en un baño seco a 37 °C, donde el líquido folicular fue decantado por gravedad por 15 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 mL de medio de lavado (TCM-199 con sales de Hank suplementado con 275 µg/mL de ácido pirúvico, 29.2 µg/mL de glutamina, 1X de la solución de antibióticos) (Sigma A5955) (Tsafiriri *et al.*, 1996), depositándose en una caja de Petri estéril de 60 x 15 mm.

Se seleccionaron los complejos oocitocúmulo (COCs) de buena calidad, utilizando un estereomicroscopio, siguiendo los criterios de De Wit *et al.* (2000); es decir, aquellos con citoplasmas claros y homogéneos y al menos con tres capas compactas de células de la granulosa. Se procedió al lavado por tres veces de los COCs seleccionados en medio TCM-199 suplementado con sales de Hank. Grupos de 12 COCs fueron cultivados a 38.5 °C en gotas de 50 µl de medio de maduración suplementado de acuerdo con el grupo de estudio, cubiertas con aceite mineral en plato de cultivo de 4 pozos.

El medio de maduración (TCM-199) fue suplementado con 275 µg/mL de ácido pirúvico, 29.2 µg/mL de glutamina, 1X de la solución de antibióticos, 1 µg/mL de estradiol, 6 mg/mL de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (*Bovine Serum Albumin – Fatty Acid Free*, BSA-FAF) 3% de suero bovino fetal (SBF) y gonadotropinas (1 µg/mL de FSH porcina [Calder *et al.*, 2003] y 10 UI/mL de LH recombinante humana [Anderiesz *et al.*, 2000]). El cultivo se realizó a 38.5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa.

### **Fertilización *in vitro* (FIV) y cultivo de embriones (CIV)**

Cumplidas las 24 horas de maduración *in vitro*, las unidades de cada grupo fueron retiradas del medio de cultivo y pasadas sucesivamente por tres gotas de 50 µl de medio TALP-Hepes. Luego, las unidades fueron transferidas a gotas de 50 µl de medio de fertilización (TALP suplementado con 10 µg/mL de heparina, 1mM de hipotaurina, 250 mM de Epinefrina, 2 mM de penicilamina, 1X de la solución de antibióticos) (Dode *et al.*, 2002).

Se utilizó semen proveniente de un toro de la planta de procesamiento San Pablo de la UNAL, descongelado a 37 °C por 30 s. Se seleccionaron los espermatozoides viables y móviles mediante gradiente de AllGradient® (45 y 90%) a 400 g por 7 min. El sobrenadante fue descartado y el botón celular de espermatozoides se lavó con 1 mL de medio de fertilización sin heparina y fue centrifugado a 200 g por 4 min. La concentración de espermatozoides fue ajustada a 2 x 10<sup>6</sup>/mL de espermatozoides en el medio de fertilización (Dode *et al.*, 2002). Las gotas de fertilización fueron cubiertas totalmente con aceite mineral y se incubaron durante 18 h a 38.5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa. Al término de la incubación los presuntos cigotos fueron transferidos a medio de desarrollo.

Los presuntos cigotos luego de 18 h de la inseminación (hpi) fueron desnudados de las células del cúmulo y cultivados durante 48 h en gotas de 50 µl de medio de cultivo Evolve suplementado con 6 mg/mL de albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos (BSA-FAF), 1X de la solución de antibióticos y 3% de suero fetal bovino. Las primeras 48 horas de cultivo se definieron como cultivo 1 (CIV1). Luego de este tiempo se realizó un recambio del 60% del medio de cultivo y se mantuvo así por 144 h adicionales (día 8 de cultivo), definido como cultivo 2 (CIV2). Las condiciones de cultivo fueron 38.5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa.

En este trabajo se evaluó el complejo ITS en una combinación de 5 µg/mL de insulina, 2.74 µg/mL de transferrina y 3.34 ng/mL de selenio (Gibco 41400, Life Technologies Corporation, USA), suplemento usado en los medios de desarrollo 1 (CIV1) y 2 (CIV2) *in vitro*, los cuales se denominaron CIV1-ITS y CIV2-ITS, respectivamente.

### **Efecto del Suplemento ITS sobre el Desarrollo Embrionario**

La determinación de la tasa de clivaje sobre el total de oocitos inseminados se realizó mediante visualización en estereoscopio a las 48 h de iniciar el cultivo de los presuntos cigotos, contando el número de embriones con dos o más células. El porcentaje de blastocistos se determinó a los 8 días de cultivo (210 hpi) identificando los embriones en estadio de blastocistos por visualización en microscopio invertido de contraste de fase (Carl Zeiss Microscopy, España). Esta evaluación morfológica se realizó desde el día 6 hasta el día 8 de cultivo para corroborar el avance de embriones en diferentes estadios, con base al número de oocitos fertilizados. Por último, para determinar la competencia para el desarrollo, se tuvo en cuenta el número de blastocistos sobre el total de embriones clivados.

### **Número de Células Totales**

Para determinar el número de células por embrión se realizó tinción de los núcleos de los blastocistos expandidos obtenidos de los tratamientos entre la 162 hpi (día 6 de cultivo) y las 210 hpi (día 8 de cultivo), incubando cada embrión en solución Hoechst 33324 (Sigma® B2261) a una concentración de 10 µg/mL durante 5 min en la oscuridad a 38 °C, lavado posteriormente en PBS y transferidos individualmente a un portaobjetos. El conteo celular se realizó sobre una fotografía digital obtenida en microscopio de epifluorescencia (Nikon eclipse 80i) con filtros UV2E con una longitud de emisión a 352 nm y de excitación a 455 nm (Uhm *et al.*, 2009).

### **Producción de EROs**

La producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (EROs) en los embriones se determinó por la oxidación de la sonda fluorescente diacetato 2',7'-dichloro-dihydrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA). Cada embrión individual fue incubado por 30 min con 10 µM del fluorocromo en la oscuridad. Luego fueron lavados buffer fosfato salino Dulbecco (DPBS) (Invitrogen Corporation). La fluorescencia se observó en gotas de 10 µl con un microscopio de epifluorescencia (Nikon eclipse 80i) con filtros UV de 460 nm. Las imágenes fluorescentes se guardaron como archivos TIFF. La intensidad de fluorescencia de los embriones fue evaluada con el software ImageJ (v. 1.41; National Institutes of Health, Bethesda, USA) y normalizada con la media de fluorescencia de los embriones control o tratamiento 1 (You *et al.*, 2010; Kwak *et al.*, 2012).

### **Análisis Estadístico**

Para las variables porcentaje de clivaje, blastocistos y competencia para el desarrollo se realizaron seis réplicas por tratamiento, mientras que para la determinación de la celularidad se utilizaron como unidades experimentales cada uno de los blastocistos expandidos de cada tratamiento y sometidos a tinción. Para la determinación de la producción de EROs se utilizó cada blastocisto expandido de cada tratamiento para su tinción con H<sub>2</sub>DCFDA. Los datos se normalizaron como una proporción del promedio de intensidad de fluorescencia del tratamiento control, siendo por lo tanto igual a 1 para el promedio del mismo control. Los datos de cada variable fueron sometidos al test de Brown-Forsythe para homogeneidad de varianzas y se evaluaron mediante análisis de varianza de una vía. Las medias de los tratamientos en cada variable fueron comparadas a través de la prueba de Tukey. Se utilizó el programa STATISTICA 10.0 (StatSoft, USA) en todas las pruebas estadísticas.

Cuadro 1. Porcentaje de embriones bovinos cultivados con el suplemento Insulina-Transferrina-Selenio (ITS) en el clivaje (48 horas p.i) y en blastocistos (día 8)

Tratamiento	Suplemento ITS CIV1/CIV2*	<i>n</i>	Clivaje <i>n</i> (%)	Blastocistos / oocitos (%)	Blastocistos / clivados (%)
1	-/-	145	121 (83.5±2.3) <sup>a</sup>	38 (26.2±6.5) <sup>a</sup>	31.4 <sup>a</sup>
2	+/-	159	137 (86.1±5.4) <sup>a</sup>	50 (31.5±3.9) <sup>ab</sup>	36.5 <sup>ab</sup>
3	-/+	135	113 (83.7±12.2) <sup>a</sup>	40 (29.6±2.7) <sup>ab</sup>	35.4 <sup>ab</sup>
4	+/+	178	136 (76.4±7.9) <sup>a</sup>	58 (32.6±4.7) <sup>b</sup>	42.7 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) Cada experimento fue repetido 6 veces. Los datos representan promedio  $\pm$  DE

<sup>1</sup> CIV1: Primeras 48 horas de cultivo *in vitro*; CIV2: Después de las 48 horas de iniciar el cultivo *in vitro*

## RESULTADOS

### *Efecto del suplemento ITS sobre la producción in vitro de embriones bovinos*

Se evaluaron tres parámetros: el porcentaje de embriones en etapa de clivaje sobre el número de oocitos inseminados determinado a las 48 h de cultivo, el porcentaje de blastocistos sobre el número de oocitos inseminados, y la capacidad o competencia de los embriones clivados para alcanzar la etapa de blastocisto. Se tuvieron 6 repeticiones por tratamiento, 617 oocitos y 186 blastocistos (Cuadro 1).

No se encontró diferencia estadística en el porcentaje de clivaje entre los grupos de estudio ( $p > 0.05$ ) (Cuadro 1). Por otro lado, en la producción de blastocistos se observó que el tratamiento 4 (suplementado con ITS en CIV1 y CIV2) presentó el valor más alto (32.6%) comparado con el control (T1, sin suplemento ITS) (26.2%); sin embargo, no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los porcentajes de blastocistos de T2 (31.5%) y T3 (29.6%) (Cuadro 1). La competencia para el desarrollo (porcentaje de embriones clivados que se desarrollaron hasta blastocisto) mostró un comportamiento muy similar; obteniendo el mayor porcentaje en T4

(42.7%), significativamente superior ( $p < 0.05$ ) al control (31.4%), sin diferir en T2 y T3 (36.5 y 35.4%, respectivamente).

### *Cantidad de células totales de embriones cultivados con o sin ITS*

Los embriones en etapa de blastocisto expandido fueron teñidos para evaluar el efecto del suplemento ITS sobre la celularidad. Se revisaron los registros fotográficos 18-28 embriones en estadio de blastocisto expandido por tratamiento (Cuadro 2), haciendo un total de 88 embriones. T4 presentó la mayor celularidad (145.6) en relación con los demás tratamientos ( $p < 0.05$ ), mientras que la celularidad de los otros grupos experimentales fue estadísticamente similar (Cuadro 2).

### *Producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en embriones cultivados con o sin ITS*

Se evaluaron 10 embriones en estadio de blastocisto expandido por tratamiento (total: 40 embriones) incubados con sonda fluorescente de H<sub>2</sub>DCFDA. Solo T4 (con suplemento ITS en CIV1 y CIV2) presentó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la producción de EROs (0.78) cuando se compara con el control (sin ITS), mientras que los demás tratamientos no presentaron diferencias ( $p > 0.05$ ) con el grupo control 1 (Figura 1).

Cuadro 2. Número de células totales de blastocistos expandidos de bovino cultivados *in vitro* con el suplemento Insulina-Transferrina-Selenio (ITS)

Tratamiento	Suplemento ITS CIV1/CIV2*	n	Número de células totales por blastocisto	
			n	DE
1	-/-	22	98.6 <sup>a</sup>	20.7
2	+/-	20	119.6 <sup>a</sup>	24.8
3	-/+	28	105.4 <sup>a</sup>	9.6
4	+/+	18	145.6 <sup>b</sup>	21.1

<sup>a,b</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ )  
Los datos representan promedio  $\pm$  DE

<sup>1</sup> CIV1: Primeras 48 horas de cultivo *in vitro*; CIV2: Después de las 48 horas de iniciar el cultivo *in vitro*

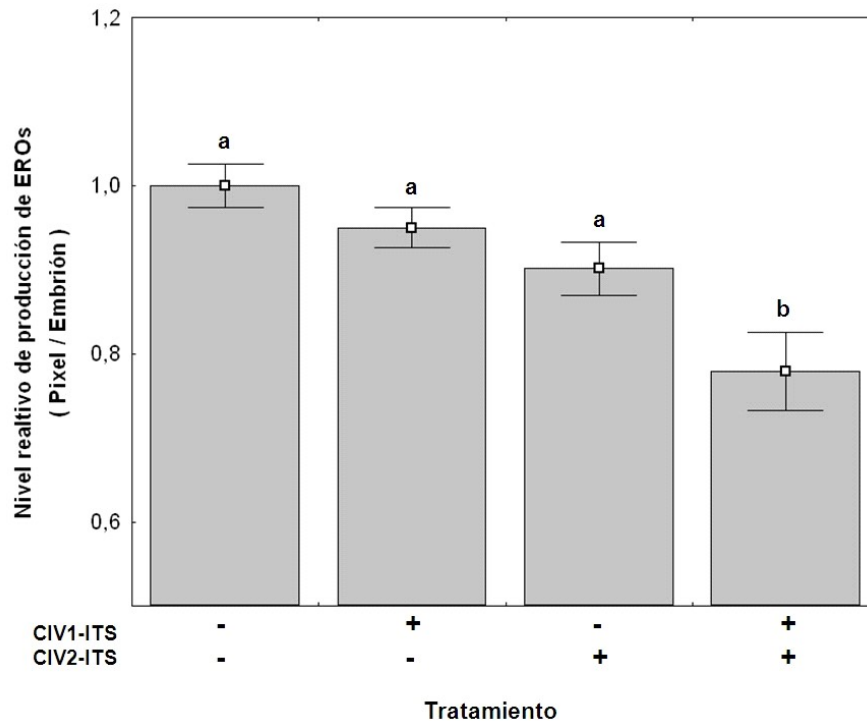


Figura 1. Efecto del suplemento Insulina-Transferrina-Selenio (ITS) sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs) intracelulares en embriones de bovino producidos *in vitro*. Embriones cultivados con (+) o sin (-) ITS. CIV1 (primeras 48 horas de cultivo) y CIV2 (48 horas después de iniciar el cultivo). Los datos representan promedio  $\pm$  EE. Columnas con letras diferentes (a, b) indican presentan diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

## DISCUSIÓN

Las técnicas de reproducción asistida tienen una baja tasa de producción de blastocistos (Rizos *et al.*, 2002), debido a factores que pueden disminuir la eficiencia y calidad de embriones producidos *in vitro*, entre ellos el estrés oxidativo generado por la concentración de oxígeno, la exposición a la luz y el medio de cultivo (Du Plessis *et al.*, 2008). Si bien la calidad intrínseca del oocito es fundamental su desarrollo a mórula o blastocisto en los procesos PIVE, el ambiente del cultivo *in vitro* durante el desarrollo embrionario influye significativamente sobre la calidad del blastocisto (Sirard, 2001).

En este trabajo se evaluó el suplemento ITS sobre varios parámetros de calidad embrionaria, encontrando un porcentaje de clivaje entre 76.4 y 86.1% durante dos momentos del proceso (cultivo 1 o cultivo 2) (Cuadro 1), siendo resultados similares al 69.6 y 77.7 descritos por Makaverich y Markkula (2002) y al 81 y 85% reportado por Augustin *et al.* (2003), respectivamente. Sin embargo, en este estudio no se encontró efecto del suplemento ITS sobre la tasa de embriones en etapa de clivaje (Cuadro 1), tal como lo señala Makaverich y Markkula (2002) al suplementar con factor de crecimiento insulinoide tipo I, aunque Augustin *et al.* (2003) han reportado un efecto positivo sobre la tasa de clivaje al suplementar con insulina.

La mejor respuesta porcentual de blastocistos con el suplemento ITS en T4 ha sido reportada tanto en embriones bovinos producidos *in vitro* (Solovera *et al.*, 2003), en embriones murinos (Ta-Chin *et al.*, 2003) y partenogénicos porcinos (Quan *et al.*, 2007). Esta respuesta puede explicarse por las propiedades mitogénicas que presenta la insulina (Ta-Chin *et al.*, 2003) y la activación del metabolismo de la glucosa y lípidos (Tsuji *et al.*, 2002). Adicionalmente, la insulina favorecería el metabolismo de la glucosa que compromete el desarrollo de los embriones

de sexo hembra en bovinos, debido a que se ha demostrado que la no compensación de dosis para la expresión de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) ligada al cromosoma X en embriones producidos *in vitro* genera un desbalance en el metabolismo de la glucosa en embriones hembra (Wrenzycki *et al.*, 2002).

La celularidad es considerada como uno de los indicadores más importantes de calidad embrionaria (Ushijima *et al.*, 2009). En este estudio se encontró el mayor número de células ( $p < 0.05$ ) por embrión en T4 (145.6) en comparación con los demás grupos experimentales (Cuadro 2). Este efecto benéfico del suplemento sobre la celularidad también ha sido reportado en otros trabajos con insulina (Augustin *et al.*, 2003) e IGF-I (Ta-Chin *et al.*, 2003).

La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) está asociada al estrés oxidativo (Martín-Romero *et al.*, 2008), al envejecimiento del oocito (Goud *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2010). En el presente estudio se encontró que las estructuras en T4 presentaron los niveles más bajos ( $p < 0.05$ ) de fluorescencia, lo cual refleja una baja producción de EROs (Figura 1), tal y como fue informado por Jinyoung *et al.* (2010) al suplementar el medio de cultivo con moléculas antioxidantes antocianinas.

Los resultados obtenidos con el suplemento ITS en el desarrollo embrionario son efectos sumatorios de los componentes (insulina – transferrina – selenio). Así, el componente insulina mejora los parámetros de celularidad e índice apoptótico (Augustin *et al.*, 2003), e inhibe la acumulación de triacilgliceroles (Tsuji *et al.*, 2002), aumenta el transporte de glucosa al interior de la célula a través del estímulo para la translocación de los transportadores de glucosa inducibles por la insulina GLUT8 (Carayannopoulos *et al.*, 2000) y GLUT12 (Zhou *et al.*, 2004) y aumenta la oxidación de la glucosa (Foufelle y Ferre, 2002). Además, los efectos sumatorios de la transferrina, que debido a su pro-



piedad de unión al hierro (Kell, 2009) disminuye la probabilidad de que el ion participe en la generación de radicales libres a través de la reacción de Fenton, en la cual se forma el radical hidroxilo (Guérin *et al.*, 2001), y por el efecto del selenio, que hace parte de varias moléculas con funciones antioxidantes como las glutatión peroxidadas, participando en la disminución del estrés oxidativo del embrión (Du Plessis *et al.*, 2008; Jeong *et al.*, 2008).

Bajo las condiciones experimentales del presente estudio se demostró que el suplemento ITS en una combinación de 5 µg/mL de insulina, 2.74 µg/mL de transferrina y 3.34 ng/mL de selenio administrado durante toda la fase de cultivo aumenta la producción de blastocistos, promueve el desarrollo desde el clivaje hasta el estadio de blastocisto y mejora parámetros de calidad del embrión reflejado en el número de células en blastocistos expandidos y disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno. Los resultados sugieren que la suplementación de ITS durante el cultivo (CIV1 y CIV2) favorece la producción y la calidad de embriones bovinos producidos *in vitro*.

### Agradecimientos

Se agradece al Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid y a la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del Proyecto Código 2061090146, y a la Institución Universitaria Visión de las Américas por la cofinanciación del proyecto.

### LITERATURA CITADA

1. **Anderiesz C, Ferraretti AP, Magli C, Fiorentino A, Fortini D, Gianaroli L, Jones GM, et al. 2000.** Effect of recombinant human gonadotrophins on human bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development *in vitro*. Hum Reprod 15: 1140-1148. doi: 10.1093/humrep/15.5.1140
2. **Augustin R, Pocar P, Wrenzycki C, Niemann H, Fischer B. 2003.** Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. Reproduction 126: 91-99. doi: 10.1530/rep.0.1260091
3. **Barceló-Fimbres, Seidel GE. 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. doi: 10.1002/mrd.20700
4. **Battin E, Brumaghim J. 2009.** Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metalbinding antioxidant mechanisms cell. Cell Biochem Biophys 55:1-23. doi: 10.1007/s12013-009-9054-7
5. **Calder MD, Caveney AN, Smith LC, Watson AJ. 2003.** Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*. Reprod Biol Endocrin 1: 14. doi: 10.1186/1477-7827-1-14
6. **Camargo L, Viana J, Sá W, Ferreira A, Ramos A, Filho V. 2006.** Factors influencing *in vitro* embryo production. Anim Reprod 3: 19-28.
7. **Carayannopoulos M, Chi M, Cui Y, Pingsterhaus J, McKnight R, Mueckler M, Devaskar S, et al. 2000.** GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. P Natl Acad Sci USA 97: 7313-7318. doi: 10.1073/pnas.97.13.7313
8. **Córdova B, Morató R, Izquierdo D, Paramio T, Mogas T. 2010.** Effect of the addition of Insulin-Transferrin-Selenium and/or L-Ascorbic acid to the *in vitro* maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. Theriogenology 74: 1341-1348. doi: 10.1016/j.theriogenology.-2010.06.003

9. **Dalvit GC, Cetica PD, Pintos LN, Beconi MT. 2005.** Reactive oxygen species in bovine embryo *in vitro* production. *Biocell* 29: 209-212.
10. **De Wit A, Wurth Y, Kruip A. 2000.** Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J Anim Sci* 78: 1277-1283. doi: 10.2527/2000.7851277x
11. **Dode MAN, Rodovalho NC, Ueno VG, Fernandes CE. 2002.** The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *Bos indicus* oocytes. *Anim Reprod Sci* 69: 15-23. doi: 10.1016/s0378-4320(01)-00148-8
12. **Du Plessis S, Makker K, Desai N, Agarwal A. 2008.** Impact of oxidative stress on IVF. *Expert Rev Obstet Gynecol* 3:539-554. doi: 10.1586/17474108.3.4.539
13. **Favetta LA, John EJ St, King WA, Betts DH. 2007.** High levels of p66shc and intracellular ROS in permanently arrested early embryos. *Free Radical Bio Med* 42: 1201-1210. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.018
14. **Foufelle F, Ferre P. 2002.** New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J* 366: 377-391. doi: 10.1042/BJ20020430.
15. **Gómez E, Duque P, Díaz E, Facal N, Antolín I, Hidalgo C, Díez C. 2002.** Effects of acetoacetate and D-β-hydroxybutyrate on bovine *in vitro* embryo development in serum free medium. *Theriogenology* 57: 1551-1562. doi: 10.1016/s0093-691x(02)00660-x
16. **Goud A, Goud P, Diamond M, Gonik B, Abu-Soud H. 2008.** Reactive oxygen species and oocyte aging: role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Bio Med* 44: 1295-1304. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.014
17. **Guérin P, Mouatassim S, Ménézo Y. 2001.** Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 7: 175-189. doi: 10.1093/humupd/7.2.175
18. **Gupta S, Sekhon L, Kim Y, Agarwal A. 2010.** The role of oxidative stress and antioxidants in assisted reproduction. *Curr Wom Health Rev* 6: 227-238.
19. **Jeong YW, Hossein MS, Bhandari DP, Kim YW, Kim JH, Park SW, Jeong YI, et al. 2008.** Effects of insulin-transferrin-selenium in defined and porcine follicular fluid supplemented IVM media on porcine IVF and SCNT embryo production. *Anim Reprod Sci* 106: 13-24. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.-03.021
20. **Jinyoung Y, Jinyoung K, Jeongmook L, Eunsong L. 2007.** Anthocyanin stimulates *in vitro* development of cloned pig embryos by increasing the intracellular glutathione level and inhibiting reactive oxygen species. *Theriogenology* 74: 777-785. doi: 10.1016/j.anireprosci.-2007.-03.021
21. **Kell DB. 2009.** Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the etiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Med Genomics* 2: 1-79. doi:10.1186/1755-8794-2-2
22. **Khurana NK, Niemann H. 2000.** Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. *Biol Reprod* 62: 847-856. doi: 10.1095/biolreprod62.4.847
23. **Kwak SS, Cheong SA, Jeon Y, Lee E, Choi KC, Jeung EB, Hyun SH. 2012.** The effects of resveratrol on porcine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 78: 86-101. doi: 10.1016/j.theriogenology.-2012.01.-024

24. **Lim KT, Jang G, Ko KH, Lee WW, Park HJ, Kim JJ, Lee SH, Hwang WS, Lee BC, Kang SK. 2007.** Improved *in vitro* bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology* 67: 293-302. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.07.011
25. **Makarevich A, Markkula M. 2002.** Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during *in vitro* maturation and culture. *Biol Reprod* 66: 386-392. doi: 10.1095/biolreprod66.2.386
26. **Martin-Romero F, Miguel-Lasobras E, Domínguez J, González E, Álvarez I. 2008.** Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. *Reprod Biomed Online* 17: 652-661. doi: 10.1016/S1472-6483-(10)60312-4
27. **Moreira F, Paula-Lopez FF, Hansen PJ, Badinga L, Thatcher WW. 2002.** Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology* 57: 895-907. doi: 10.1016/S00-93691X(01)00694-X
28. **Mtango NR, Varisanga MD, Dong YJ, Rajamahendran R, Suzuki T. 2003.** Growth factors and growth hormone enhance *in vitro* embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts. *Theriogenology* 59: 1393-1402. doi: 10.1016/S0093-691X(02)-01163-9
29. **Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH. 2006.** Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 65: 1551-1562. doi: 10.1016/j.theriogenology.-2005.08.020
30. **Olson S, Seidel Jr G. 2000.** Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. *Biol Reprod* 62: 248-252. doi: 10.1095/biolreprod62.2.248
31. **Quan YS, Naruse K, Kim BC, Kim HR, Han RX, Choi SM et al. 2008.** Effects of insulin, transferrin and selenium (ITS) on *in vitro* development of porcine parthenogenetic and nuclear transfer embryos. *Reprod Dev Biol* 31: 261-265.
32. **Riley JK, Moley KH. 2006.** Glucose utilization and the PI3-K pathway: mechanisms for cell survival in preimplantation embryos. *Reproduction* 131: 823-835. doi: 10.1530/rep.1.00645
33. **Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. 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. doi: 10.1002/mrd.115
34. **Santos AN, Ramin N, Tonack S, Fischer B. 2008.** Cell lineage-specific signalling of insulin and insulin like growth factor I in rabbit blastocysts. *Endocrinology* 149: 515-524. doi: 10.1210/en.-2007-0821
35. **Sirard M. 2001.** Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 55: 1241-1254. doi: 10.1016/S0093-691X(01)-00480-0
36. **Smith GD, Takayama S, Swain JE. 2012.** Rethinking *in vitro* embryo culture: new developments in culture platforms and potential to improve assisted reproductive technologies. *Biol Reprod* 86: 62. doi: 10.1095/biolreprod.-111.095778
37. **Solovera M, Stuardo J, Barros C. 2003.** Efecto del medio de cultivo sobre el desarrollo embrionario bovino *in vitro*. *Vet México* 34: 389-395.
38. **Swain JE, Smith GD. 2011.** Advances in embryo culture platforms: novel approaches to improve preimplantation embryo development through modifications of the microenvironment. *Hum Reprod Update* 17: 541-557. doi: 10.1093/humupd/dmr006

39. **Ta-Chin L, Jui-Mei Y, Kun-Bing G, Teng-Tsao H, Lih-Ren C. 2003.** IGF-1/IGFBP-1 increases blastocyst formation and total blastocyst cell number in mouse embryo culture and facilitates the establishment of a stem-cell line. *BMC Cell Biol* 4: 14-19. doi: 10.1186/1471-2121-4-14
40. **Takahashi M. 2012.** Oxidative stress and redox on *in vitro* development of mammalian embryos. *J Reprod Develop* 58: 1-9. doi: 10.1262/jrd.11-138n
41. **Tsafiriri A, Chun SY, Zhang R, Hsueh AJW, Conti M. 1996.** Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cell: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Dev Biol* 178: 392-402. doi: 10.1006/dbio.1996.0226
42. **Tsujii H, Nakamura Y, Hamano K. 2002.** *In vitro* effects of insulin on glucose and lipid metabolism in rat embryos. *Anim Sci J* 73: 185-189. doi: 10.1046/j.1344-3941.2002.00026.x
43. **Uhm SJ, Gupta MK, Chung HJ, Kim JH, Park C, Lee HT. 2009.** Relationship between developmental ability and cell number of day 2 porcine embryos produced by parthenogenesis or somatic cell nuclear transfer. *Asian Austral J Anim* 22: 483-491. doi: 10.5713/ajas.2009.80362
44. **Ushijima H, Akiyama K, Tajima T. 2009.** Transition of cleavage divisions during *in vitro* development of bovine embryos. *J Mamm Ova Res* 26: 42-47. doi: 10.1274/jmor.26.42
45. **Van der Valk J, Brunner D, De Smet K, Fex Svenningsen A, Honegger P, Knudsen LE, Lindl T, et al. 2010.** Optimization of chemically defined cell culture media – replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicol In Vitro* 24: 1053-1063. doi: 10.1016/j.tiv.2010.03.016
46. **Wrenzycki C, Lucas-Hahn A, Herrmann D, Lemme E, Korsawe K, Niemann H. 2002.** *In vitro* production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. *Biol Reprod* 66: 127-134. doi: 10.1095/biolreprod-66.1.127
47. **You J, Kima J, Lim J, Lee E. 2010.** Anthocyanin stimulates *in vitro* development of cloned pig embryos by increasing the intracellular glutathione level and inhibiting reactive oxygen species. *Theriogenology* 74: 777-785. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.04.002
48. **Zhou Y, Kaye P, Pantaleon M. 2004.** Identification of the facilitative glucose transporter 12 gene *Glut12* in mouse preimplantation embryos. *Biol Reprod* 4: 621-631. doi: 10.1016/j.modgep.2004.04.010