

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES *IGF1* E *IGF2*
EN EL DESARROLLO TEMPRANO DE LA
GESTACIÓN EN OVEJAS DE RAZA SUFFOLK**

EMMA ANAYANTZIN SANTILLÁN GÓMEZ

**T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2020

La presente tesis titulada: **Identificación de los genes *IGF1* e *IGF2* en el desarrollo temprano de la gestación en ovejas de raza Suffolk**, realizada por la alumna: **Emma Anayantzin Santillán Gómez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA


CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. César Cortéz Romero

ASESOR



Dr. José Ricardo Bárcena Gama

ASESOR



Dr. David Hernández Sánchez

ASESOR



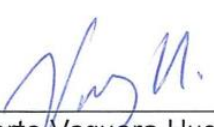
Dr. Sergio Segundo González Muñoz

ASESOR



Dr. Glafiro Torres Hernández

ASESOR



Dr. Humberto Vaquera Huerta

Montecillo, Texcoco, Estado de México, diciembre de 2020

DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES *IGF2* E *IGF1* EN EL DESARROLLO TEMPRANO DE LA GESTACIÓN EN OVEJAS DE RAZA SUFFOLK

Emma Anayantzin Santillán Gómez, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2020

RESUMEN

En la reproducción ovina se estima de 20 a 40 % de muertes embrionarias durante la gestación y de éstas, dos terceras partes ocurren durante la implantación. La nutrición es un factor que influye en la eficiencia reproductiva de ovinos, los Factores de Crecimiento similar a la insulina tipo 1 y 2 (*IGF1* e *IGF2*) están relacionados con su estado metabólico y su eficiencia reproductiva. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación doctoral tiene tres capítulos: 1) el objetivo del capítulo 1 fue analizar mediante métodos bibliométricos la información disponible en la metabase Scopus, de la relación de los IGF en la reproducción de ovinos; 2) el objetivo del capítulo 2 fue evaluar la condición corporal (CC) en respuesta al desarrollo folicular (DF), estro, gestación, fecundidad, prolificidad, niveles de progesterona (P4) y regulación génica de los exones 5 y 10 del *IGF2* en ovejas Suffolk durante la época reproductiva: 3) el objetivo del capítulo 3 fue evaluar la influencia de la restricción alimenticia en la medición de niveles plasmáticos de IGF1 e insulina, en la regulación del exón 3 del gen *IGF1*, en la incidencia de estro, en el retorno a estro y en la gestación en ovejas Suffolk. Los resultados muestran que las ovejas con CC alta (3.0 a 4.0: CCA) tuvieron mayor número de folículos >6 mm, a las 12 h después del retiro de CIDR ($p \leq 0.05$) y menor porcentaje de retorno al día 34 post-IAI, sin cambios en la secuencia de ADN del exón 5 y 10 del gen *IGF2*. La restricción nutricional en ovejas Suffolk tuvo efectos negativos en el porcentaje de gestación y niveles plasmáticos de *IGF1* e insulina, sin cambios en la secuencia del gen *IGF1* exón 3.

Palabras clave: VOSviewer, SCOPUS®, fertilidad, mutaciones, PCR

DETERMINATION OF POLYMORPHISMS IN IGF2 AND IGF1 GENES IN THE EARLY DEVELOPMENT OF PREGNANCY IN SUFFOLK BREED SHEEP

Emma Anayantzin Santillán Gómez, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2020

ABSTRACT

In ovine reproduction, it is estimated 20 to 40% of embryonic deaths during gestation and out of this, two thirds occur during implantation. Nutrition is a factor that influences the reproductive efficiency of sheep, and Growth Factors similar to insulin type 1 and 2 (*IGF1* and *IGF2*) are related to its metabolic state and reproductive efficiency. Therefore, the objective of this doctoral research has three chapters: 1) the objective of Chapter 1 was to analyze the information available in the Scopus metabase, using bibliometric methods, on the relationship of *IGFs* in sheep reproduction; 2) the objective of chapter 2 was to evaluate body condition (CC) in response to follicular development (DF), estrus, pregnancy, fertility, prolificacy, progesterone levels (P4) and gene regulation of exons 5 and 10 of *IGF2* in Suffolk sheep during the reproductive season: 3) the objective of Chapter 3 was to evaluate the influence of dietary restriction on the measurement of plasma levels of *IGF1* and insulin, on the regulation of exon 3 of the *IGF1* gene, on the incidence of estrus, in return to estrus and pregnancy in Suffolk ewes. The results show that ewes with high CC (3.0 to 4.0: CCA) had a greater number of follicles >6 mm, at 12 h after CIDR removal ($p \leq 0.05$) and a lower percentage of return on day 34 post-IAI, with no changes in the DNA sequence of exon 5 and 10 of the *IGF2* gene. Nutritional restriction in Suffolk ewes had negative effects on the percentage of pregnancy and plasma levels of *IGF1* and insulin, without changes in the sequence of the *IGF1* exon 3 gene.

Key words: VOSviewer, SCOPUS®, fertility, mutations, PCR

DEDICATORIA

CON MUCHO AMOR PARA MI FAMILIA Y AMIGOS QUE SIEMPRE ESTUVIERON

A MI LADO

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados campus Montecillo y campus San Luis Potosí, en especial al Programa de Recursos Genéticos y Productividad – Ganadería por contribuir en mi desarrollo profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca que financio toda mi estancia durante la realización de la presente tesis de grado doctoral.

Al Dr. Cesar Cortez por todos los conocimientos compartidos, dedicación, paciencia, compromiso, consejos, confianza y gran amistad brindada, gracias por ser parte de mi desarrollo como persona y como investigador.

A mi Consejo Particular: Dr. Ricardo Bárcena, Dr. David Hernández, Dr. Sergio González, Dr. Glafiro Torres y Dr. Huberto Vaquera, por todos los conocimientos compartidos, ayuda y paciencia que me brindaron.

A la Dra. María Crosby y la Ing. Margarita Crosby, por los consejos y porque siempre que necesitaba ayuda se hicieron presentes, son unas excelentes personas.

A la Dra. Martha Hernández y el Dr. Rigoberto, sin su ayuda y consejos me hubiera costado muchísimo trabajo terminar y gracias por su amistad es algo que valoró mucho.

Al Laboratorio de Producción de Semillas del Colegio de Postgraduados campus Montecillo, en especial a la Sra. Martha Sánchez, gracias por la ayuda brindada.

Al M.C. German Alarcón de la Universidad Autónoma Chapingo y el Dr. Said Cadena por su amistad y por la confianza brindada.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
CONTENIDO.....	vii
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
Objetivos.....	2
Hipótesis.....	3
Referencias.....	4
CAPÍTULO I. ESTUDIO BIBLIOMÉTRICO DE FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A LA INSULINA EN LA REPRODUCCIÓN DE BOVINOS Y OVINOS	6
1.1. RESUMEN	6
1.2. ABSTRACT.....	7
1.3. INTRODUCCIÓN.....	8
1.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
Crecimiento de la literatura.....	12
Publicaciones más citadas.....	13
Países de publicación o Cooperación entre los países.....	23
Revistas de publicación	26
Identificación de las temáticas de investigación	28
1.6. CONCLUSIONES.....	31
1.7. REFERENCIAS.....	32
CAPÍTULO II. INFLUENCIA DE LA CONDICIÓN CORPORAL EN LA RESPUESTA REPRODUCTIVA Y LA REGULACIÓN GÉNICA DEL <i>IGF2</i> EN OVEJAS SUFFOLK.....	38

2.1. RESUMEN	38
2.2. ABSTRACT	39
2.3. INTRODUCCIÓN	40
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS	41
Ubicación, ovejas y alimentación	41
Presincronización y sincronización del estro	42
Evaluación del desarrollo folicular	42
Inseminación artificial intrauterina (IAI), estro y retorno a estro	42
Gestación, fecundidad y prolificidad	42
Análisis de progesterona	43
Análisis de la regulación del gen <i>IGF2</i>	43
Amplificación del gen <i>IGF2</i>	44
Secuenciación y análisis bioestadístico de secuencias	45
Análisis estadístico	45
2.5. RESULTADOS	46
Desarrollo folicular	46
Incidencia y tiempo al inicio del estro	47
Retorno a estro	48
Prolificidad y fecundidad	49
Niveles de progesterona y ovulación	49
Identificación de los exones 5 y 10 del gen <i>IGF2</i> y sus polimorfismos	50
2.6. DISCUSIÓN	51
2.7. CONCLUSIONES	55
2.8. AGRADECIMIENTOS	56
2.9. REFERENCIAS	56
CAPÍTULO III. INFLUENCIA DE LA RESTRICCIÓN ALIMENTICIA EN LA REGULACIÓN DE <i>IGF1</i> Y FERTILIDAD DE OVEJAS SUFFOLK	61
3.1. RESUMEN	61
3.2. ABSTRACT	62
3.3. INTRODUCCIÓN	63
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS	64

Ubicación, ovejas y alimentación	64
Presincronización y sincronización del estro	66
Análisis de la regulación génica del exón 3 del IGF1.....	67
Amplificación del gen IGF1	68
Secuenciación y análisis de secuencias	69
Análisis estadístico	69
3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	70
Incidencia y tiempo al inicio de estro	70
Retorno a estro	72
Porcentaje de gestación	73
Niveles de insulina	73
Niveles de IGF1	74
3.6. CONCLUSIONES.....	77
3.7. AGRADECIMIENTOS	77
3.8. REFERENCIAS.....	78
CONCLUSIONES GENERALES	82

LISTA DE CUADROS

CAPITULO I

- Cuadro 1.** Indicadores bibliométricos unidimensionales y multidimensionales usados para identificar la investigación sobre IGF en bovinos y ovinos indizada en Scopus (1996-2020)..... 11
- Cuadro 2.** Publicaciones más citadas sobre los IGF en la reproducción de bovinos y ovinos..... 15
- Cuadro 3.** Los principales 15 países con mayor número de publicaciones sobre los IGF en la reproducción de bovinos y ovinos 23
- Cuadro 4.** Principales diez instituciones que más han publicado sobre la relación entre IGF y la reproducción de bovinos y ovinos..... 25
- Cuadro 5.** Análisis con CiteScore de las revistas con mayor número de publicaciones de IGF y reproducción en bovinos y ovinos..... 27
- Cuadro 6.** Las 15 palabras utilizadas con mayor frecuencia en los artículos relacionados con IGF y la reproducción de bovinos y ovinos..... 28

CAPITULO II

- Cuadro 1.** Porcentajes de retorno a estro y gestación..... 49
- Cuadro 2.** Promedio de niveles séricos de progesterona en las ovejas Suffolk 49

CAPITULO III

- Cuadro 1.** Nutrientes contenidos en el ensilado de maíz y alimento concentrado ofrecido durante la fase experimental a ovejas Suffolk. 65
- Cuadro 2.** Promedio del consumo individual de nutrientes en ovejas Suffolk, alimentadas con ensilado de maíz y concentrado comercial..... 65
- Cuadro 3.** Incidencia y tiempo al inicio de estro en ovejas Suffolk. 70
- Cuadro 4.** Porcentajes de retorno a estro y gestación en ovejas Suffolk. 73

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

- Figura 1.** Distribución de publicaciones registradas en Scopus de IGF y el comportamiento reproductivo en bovinos y ovinos de 1996 a 2020. 13
- Figura 2.** Visualización de los países con mayor número de publicaciones relacionados a los IGF y la reproducción de bovinos y ovinos y su relación de colaboración, con el uso del programa VOSviewer®.....24
- Figura 3.** Mapa de red de las temáticas para IGF y la reproducción de bovinos y ovinos, agrupadas en clústeres..... 31

CAPITULO II

- Figura 1.** Esquema de la fase de adaptación, sincronización del estro y toma de muestras sanguíneas para determinar niveles de P4 e *IGF2*. (Psincr.= Presincronización; DE= detección de estros; IAI= inseminación artificial intrauterina; M= muestreos análisis moleculares; M*= muestreos análisis progesterona)..... 43
- Figura 2.** Promedio de folículos pequeños, medianos y grandes. Barras por columna con diferente literal son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$). 47
- Figura 3.** Curva de supervivencia para el inicio del estro en ovejas Suffolk con CCA y CCB. Long Rank ($p=0.3417$). 48
- Figura 4.** Amplificación del exón 5 (a; 290 pb), carril MM (1): marcador molecular, carriles 2 al 14: muestras amplificadas (290 pb) y carril neg (15)= testigo negativo, y exón 10 (b; 576 pb), carril MM (1): marcador molecular, carriles 2 al 14: muestras amplificadas (576 pb) y carril neg (15)= testigo negativo del gen *IGF2*. 50
- Figura 5.** Alineación de secuencias de los exones 5 y 10 del gen *IGF2* (tamaño del producto; a: 290pb y b: 576 pb). 51

CAPITULO III

Figura 1. Esquema de muestreos realizados para el análisis de regulación génica para el exón 3 del IGF1.....	67
Figura 2. Curva de supervivencia para el inicio del estro en ovejas Suffolk de los tratamientos R100 y r-30. Prueba de Tukey. Long Rank (p=0.3675). ..	70
Figura 3. Amplificación del exón 3 en el gen <i>IGF1</i> en ovejas Suffolk sincronizadas; carril MM (1): marcador molecular, carriles 2 al 14: muestras amplificadas (171 pb) y carril neg (15)= testigo negativo.....	75
Figura 4. Alineación de secuencias del exón 3 en el gen <i>IGF1</i> (tamaño del producto 171pb).	76

INTRODUCCIÓN GENERAL

Ovis orientalis musimon es la especie de la cual desciende la *O. aries*, cuyo cariotipo es de 54 cromosomas y es una de las especies pecuarias con mayor importancia (Hiendleder *et al.*, 2001). Las razas del género *O. aries* más utilizadas en México son Suffolk, Hampshire, Pelibuey, Dorper, Katahdin, Criollo de lana (Medrano, 2000). Las ovejas de raza Suffolk se utilizan con frecuencia para la producción de carne, en especial en cruces con las razas Dorper o Katahdin.

En México, la producción de carne ovina ocupa el cuarto lugar de la producción total de carne de especies pecuarias, con 64,030.64 ton en el 2019 (SIAP, 2019). Esta producción no satisface la demanda del consumo nacional aparente, la cual es 76,300 t por año, por lo que se importa carne de otros países, de manera principal desde Australia, Estados Unidos y Nueva Zelanda (SNIIM, 2019). Por tanto se busca incrementar la producción ovina, mediante la implementación de estrategias nutricionales y técnicas en el manejo reproductivo, orientadas a disminuir el fotoperiodo, reducir el intervalo entre partos y brindar un adecuado desarrollo embrionario, lo cual optimizará la gestación en las ovejas y aumentará en el número de corderos nacidos. Sin embargo, factores nutricionales, endocrinos, ambientales, enfermedades y genéticos afectan la fertilidad de las ovejas y causan muertes embrionarias (Vanroose *et al.*, 2000). El proceso de reproducción requiere cantidades de nutrientes y energía acorde a las necesidades y, de no ser así, se obtienen resultados negativos (Doyle *et al.*, 2019). Las muertes embrionarias ocurren entre 20 y 40 % de las gestaciones y dos terceras partes suceden durante la implantación (Bazer *et al.*, 2011).

El desarrollo folicular, la tasa ovulatoria y la transcripción de los Factores de Crecimiento similares a la insulina tipo 1 y 2 (*IGF1* e *IGF2*) son afectados por el estado nutricional de la oveja (De la Isla *et al.*, 2010). El gen *IGF1* estimula el crecimiento y la proliferación celular e inhibe la muerte celular programada, su producción y expresión es elevada en glándulas uterinas de animales cíclicos y gestantes (Mondal *et al.*, 2017); el gen *IGF2* participa en la regulación de la función uterina y el desarrollo

placentario, su producción es abundante en la placenta (Sferruzzi-Perri *et al.*, 2008). Por tanto los IGF funcionan en el crecimiento, diferenciación celular, acción mitogénica, desarrollo fetal y de placenta (Constancia *et al.*, 2002). Ovejas con baja condición corporal (CC) tienen niveles bajos de insulina e IGF-1 como respuesta fisiológica para conservar la masa muscular, lo cual provoca una inhibición en la secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), y por consecuencia, de las hormonas luteinizante (LH) y estimulante del folículo (FSH), que causa un retraso en el reinicio de la actividad cíclica reproductiva (Clarke, 2014). Sin embargo, la presencia de IGF1 en oviducto aumenta la secreción de proteínas al lumen, favorece la fertilización y el desarrollo temprano de la gestación (Ruiz *et al.*, 2011). La expresión de *IGF2* está restringida a las células de la teca de folículos antrales, lo cual estimula la esteroidogénesis de las células (Webb *et al.*, 2007), en el líquido folicular, mejora la maduración y desarrollo temprano del embrión en etapa de blastocisto (Wang *et al.*, 2009), regula la proliferación, diferenciación, implantación, vascularización (Sferruzzi-Perri *et al.*, 2008), producción de IFN τ (Sequeira *et al.*, 2016), función placentaria, crecimiento fetal (Gibson *et al.*, 2017) y diferenciación de tejidos (Gebert *et al.*, 2006).

Por lo anterior, la presente tesis evaluó el efecto de la CC y calidad nutricional de dos dietas en respuesta a la incidencia de estro, tiempo a estro, desarrollo folicular, retorno a estro, gestación, prolificidad y fecundidad. También se evaluó su efecto en niveles séricos de insulina, progesterona e IGF1 y la regulación de los genes IGF1 e IGF2 en ovejas Suffolk en la época reproductiva.

Objetivos

El objetivo principal fue:

Identificar la presencia de los genes *IGF1* e *IGF2* y sus polimorfismos en ovinos de raza Suffolk, durante la época reproductiva, bajo dos regímenes de alimentación y diferente condición corporal, asociado a las secreciones de progesterona, insulina e IGF1, durante la fase del reconocimiento de la gestación y variables reproductivas.

Los objetivos específicos fueron:

- i. Analizar el efecto de los IGF en la reproducción ovina.
- ii. Evaluar la condición corporal de ovejas Suffolk, en respuesta a la presencia o ausencia del gen *IGF2* y sus polimorfismos y como estos tienen efecto en el desarrollo folicular, variables reproductivas y niveles séricos de progesterona, en ovejas Suffolk en la época reproductiva, con el uso de un protocolo de sincronización basado en progestágenos.
- iii. Identificar la presencia o ausencia del gen *IGF1* como sus polimorfismos en ovejas Suffolk alimentadas con el 100 y 70 % de sus requerimientos nutricionales y su influencia en variables reproductivas y niveles séricos de insulina e *IGF1*.

Hipótesis

Las ovejas alimentadas con dietas bajas en niveles nutrimentales presentan cambios en la secuencia de ADN de los genes *IGF1* e *IGF2* y en los niveles de hormonas y respuesta de variables reproductivas en ovejas Suffolk.

Hipótesis específicas:

- i. La presencia de los IGF mejora la reproducción ovina.
- ii. Ovejas con condición corporal baja tienen cambios en la secuencia de ADN del gen *IGF2*, lo cual afecta el desarrollo folicular y variables reproductivas y niveles séricos de progesterona, en ovejas Suffolk en la época reproductiva.
- iii. Ovejas alimentadas con el 70 % de los requerimientos para mantenimiento durante la época reproductiva tienen cambios en la secuencia de ADN del gen *IGF1*, lo cual afecta las variables reproductivas y los niveles séricos de insulina e *IGF1* en ovejas Suffolk.

Referencias

- Bazer, F.W., G. Wu, G. A. Johnson, J. Kim, and G. Song. 2011. Uterine histotroph and conceptus development: select nutrients and secreted phosphoprotein 1 affect mechanistic target of rapamycin cell signaling in ewes. *Biol of Reprod* 85: 1094–1107. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.094722>.
- Clarke, L. J. 2014. Interface between metabolic balance and reproduction in ruminants: Focus on the Hypothalamus and Pituitary. *Hormones and Behavior* 66 (1): 15-40. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.02.005>.
- Constância, M., M. Hemberger, J. Hughes, W. Dean, A. Ferguson-smith and R. Fundele. 2002. Placentel-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growt. *Nature* 417:945-948.
- De la Isla, H., A. López, A. Ayala Burgos, y A. González-Bulnes. 2010. Efecto de la condición corporal y la época del año sobre el ciclo estral, estro, desarrollo folicular y tasa ovulatoria en ovejas Pelibuey mantenidas en condiciones de trópico. *Veterinaria México* 41:167–175.
- Doyle, D. N., P. Lonergan, M. G. Diskin, K. M. Pierce, A. K. Kelly, C. Stanton, A. A. Hennessy, S. M. Waters, M. H. Parr, and D. A. Kenny. 2019. Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation and post-insemination plane of nutrition on systemic concentrations of metabolic analytes, progesterone, hepatic gene expression and embryo development and survival in beef heifers. *Theriogenology*, 127, 102-113. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.037>.
- Gebert, C., C. Wrenzycki, D. Herrmann, D. Gröger, R. Reinhard, P. Hajkova, A. Lucas-Hahn, J. Carnwath, H. Lehrach and H. Niemann. 2006. The bovine *IGF2* gen is differentially methylated in oocyte and sperm DNA. *Genetics* 33: 222-229. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.03.011>.
- Gibson, C., M. de Ruijter-Villani, and T.A.E. Stout. 2017. Negative uterine asynchrony retards early equine conceptus development and upregulation of placental imprinted genes. *Placenta* 57: 175e182. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.07.007>
- Hiendleder S., A. Janke and R. Wassmunth. 2001. Molecular data on wild sheep genetic resources and domestic sheep evolution. *Arch. Tierz.* 271-279.
- Medrano, J. A. 2000. Recursos animales locales del centro de México. *Arch. Zootec.* 49: 385-390.
- Mondal, S., A. Mor, and I.J. Reddy. 2017. Factors/genes in maternal recognition of pregnancy: an overview. current developments in biotechnology and bioengineering. *Human and Animal Health Applications* 23: 597-630. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63660-7.00023-1>

- Ruiz, A.J.L., L.F. Uribe-Velásquez, y J. H. Osorio. 2011. Factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1 (IGF-1) en la reproducción de la hembra bovina. *Vet. Zootec.* 5(2): 68-81.
- Servicios de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2020. Avance acumulado de la producción pecuaria. Consultado en: https://nube.siap.gob.mx/cierre_pecuario/.
- Sferruzzi-Perri, A.N., J.A. Owens, P. Standen, and C.T. Roberts. 2008. Maternal insulin-like growth factor-ii promotes placental functional development via the type 2 igf receptor in the guinea pig. *Placenta* 29: 347 – 355. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.01.009>
- SNIIM. 2019. Anuarios estadísticos de mercados nacionales. Sistema nacional de información e integración de mercados. Secretaría de Economía, México.
- Vanroose, G., A. de Kruif, and A. Van Soom. 2000. Embryonic mortality and embryo–pathogen interactions. *Anim. Reprod. Sci.* 60: 131–143.
- Wang, L.M., H.L. Feng, Y.Zh. Ma, M. Cang, H.J. Li, Zh. Yan, P. Zhou, J.X. Wen, S. Bou, and D.J. Liu. 2009. Expression of IGF receptors and its ligands in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Animal Reproduction Science* 114: 99 – 108. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.09.019>.
- Webb, R., P. Garnsworthy, B. Campbell, and M. Hunter. 2007. Intraovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology* 68: 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.036>.

CAPÍTULO I. ESTUDIO BIBLIOMÉTRICO DE FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A LA INSULINA EN LA REPRODUCCIÓN DE BOVINOS Y OVINOS

1.1. RESUMEN

Los factores de crecimiento similares a insulina (*IGF*) tipo 1 y 2 (*IGF1* e *IGF2*) son péptidos mitogénicos que regulan el crecimiento, proliferación celular, maduración y desarrollo temprano del embrión en etapa de blastocisto, aumentando el número de células e inhibiendo la muerte celular programada. El objetivo de este estudio fue realizar un análisis bibliométrico de las publicaciones científicas referentes a los *IGF* y su relación con la reproducción de bovinos y ovinos. Una búsqueda se realizó en la base de datos referenciales SCOPUS® con las palabras clave: insuline-like growth factor, igf1, igf2, reproduction, ruminant, sheep, cattle, bovine, ovine, ewe, ram, bulls y heifer y se obtuvieron 91 documentos para el análisis de co-ocurrencias, mediante el software VOSviewer. Así se identificaron las principales revistas, países e instituciones que han publicado sobre la relación de los *IGF* y reproducción bovina y ovina. Los resultados muestran que las publicaciones respecto a este tema se centran en los términos: Cattle, Ewe, Age, Weight, Pregnancy y SNP. La conclusión es que hay pocas publicaciones referentes a la relación de los *IGF* y la reproducción de bovinos y ovinos; en los últimos 16 años hay un incremento en el interés de este tema, de manera principal en el área de genética molecular. Entre Estados Unidos, Reino Unido, Australia e Italia hay una red de colaboración. La mayoría de publicaciones de los *IGF* en la reproducción de bovinos y ovinos, están en revistas con CiteScore elevado y se encuentran en el percentil 1 dentro de su área de publicación.

Palabras clave: VOSviewer, SCOPUS®, gestación, *IGF1*, *IGF2*

BIBLIOMETRIC STUDY OF GROWTH FACTORS SIMILAR TO INSULIN IN THE REPRODUCTION OF BOVINE AND SHEEP

1.2. ABSTRACT

Insulin-like growth factors (IGF) type 1 and 2 (IGF1 and IGF2) are mitogenic peptides that regulate the growth, cell proliferation, maturation and early development of the embryo in the blastocyst stage, increasing the number of cells and inhibiting death programmed cell phone. The objective of this study was to carry out a bibliometric analysis of the scientific publications referring to IGFs and their relationship with the reproduction of sheep and cattle. A search was carried out in the SCOPUS® reference database with the keywords: insuline-like growth factor, igf1, igf2, reproduction, ruminant, sheep, cattle, bovine, ovine, ewe, ram, bulls and heifer, obtaining 91 documents for co-occurrence analysis using VOSviewer software. The main journals, countries and institutions that have published on the relationship of IGFs and bovine and ovine reproduction were identified. The results show that the publications on this topic focus on the terms: Cattle, Ewe, Age, Weight, Pregnancy and SNP. The conclusion is that there are few publications regarding the relationship of IGFs and the reproduction of cattle and sheep, in the last 16 years there has been an increase in the interest of this topic, especially in the area of molecular genetics. There is a network of collaboration between the countries of the USA, United Kingdom, Australia and Italy. Most of the publications of the IGF in the reproduction of bovines and sheep are in journals with a high CiteScore and that are in the 1st percentile within their publication area.

Key words: VOSviewer, SCOPUS®, pregnancy, IGF1, IGF2.

1.3.INTRODUCCIÓN

Los factores de crecimiento similares a insulina (*IGF*) se conforman por dos factores de crecimiento; *IGF1* e *IGF2*, dos receptores: tipo 1 (*IGFR1*) y tipo 2 (*IGFR2*), seis principales proteínas de unión (*IGFBP 1* a *IGFBP 6*) y proteínas de unión de baja afinidad (*IGFBP 7* a *IGFBP 10*) (Ghanipoor-Samami *et al.*, 2018). Tanto *IGF1* e *IGF2* son péptidos mitogénicos; *IGF1* actúa de manera parácrina o autocrina (Hua *et al.*, 2013), su secreción está influenciada por el estado nutricional del animal, sensibilidad a la hormona de crecimiento (GH) o falla en la vía de señalización del receptor GH, su expresión se da en glándulas uterinas de animales cíclicos y gestantes, lo cual estimula el crecimiento y la proliferación celular e inhibe la muerte celular programada (Mondal *et al.*, 2017). *IGF2* participa en la regulación de la función uterina y el desarrollo placentario, su producción es abundante en la placenta (Sferruzzi-Perri *et al.*, 2008) y su expresión genética es vía paterna, a diferencia de su receptor *IGF2R*, el cual se expresa vía materna (Hua *et al.*, 2013) y a diferencia del *IGF1*, su sensibilidad a GH es poca (Mondal *et al.*, 2017).

La biodisponibilidad de *IGF1* e *IGF2* está mediada por las proteínas de unión de *IGFBP1 - 6*; cuando los *IGF* se encuentran unidos a estas proteínas se inhibe su efecto en las células blanco (Oberlender *et al.*, 2013). Durante el desarrollo folicular y la maduración final del ovocito, la hormona insulina actúa como señal metabólica para la secreción de GH y de los *IGF* y este sistema está involucrado en el crecimiento, proliferación y maduración folicular (Laskowski *et al.*, 2016).

Durante la fase de selección folicular, *IGF1* se expresa en las células de la granulosa y junto a FSH tienen un efecto sinérgico, el cual incrementa la actividad de aromatasa y promueve la síntesis de esteroides. Sin embargo, la expresión de *IGF2* está restringida a las células de la teca de folículos antrales, lo cual estimula la esteroidogénesis de las células mediante la activación de receptores de *IGF1* (Webb *et al.*, 2007). En folículos grandes, el *IGF1* está en grandes cantidades, lo cual aumenta la sensibilidad de las células de la granulosa a FSH al final de la selección folicular (Lenz *et al.*, 2007). El mayor número de transcripciones de *IGF1* y sus

receptores ocurre antes de la ovulación, cuando los niveles de estradiol son elevados; el *IGF1* actúa dentro del oviducto para aumentar la secreción de proteínas al lumen, lo cual favorece la fertilización y el desarrollo temprano de la gestación (Ruiz *et al.*, 2011). Después, en preimplantación, el *IGF1* se caracteriza por disminuir la apoptosis, aumentar la proliferación celular y mejorar la transformación y diferenciación celular (Meiyu *et al.*, 2011). La expresión endometrial de *IGF1* está regulado por los niveles de progesterona en el endometrio uterino; por esta razón, las hembras gestantes presentan niveles más altos de *IGF1* en comparación con animales no gestantes (Sequeira *et al.*, 2016). En cuanto a *IGF2*, Wang *et al.* (2009) aseguran que la presencia de *IGF2* en el líquido folicular, mejora la maduración y desarrollo temprano del embrión en etapa de blastocisto, aumentando el número de células, regulando la proliferación, diferenciación, implantación, vascularización (Sferruzzi-Perri *et al.*, 2008), producción de IFN γ (Sequeira *et al.*, 2016), función placentaria, crecimiento fetal (Gibson *et al.*, 2017) y diferenciación de tejidos (Gebert *et al.*, 2006).

La consulta de toda esta información provino de publicaciones científicas, las cuales facilitan la difusión de la información y propicia el surgimiento de nuevo conocimiento, el crecimiento de la ciencia y el progreso científico (Bordons, 2004). Su análisis cuantitativo permite obtener una visión del complejo proceso de comunicación científica, ya que permite examinar el comportamiento en un determinado campo de la ciencia. Una forma de cuantificar el crecimiento de la ciencia es mediante la bibliometría, definida por Alan Pritchard como la aplicación de los métodos matemáticos a los libros y otros medios de comunicación (Pritchard, 1969), lo cual ofrece un conjunto de métodos y medidas para estudiar la estructura y el proceso de dicha comunicación académica (Borgman y Furner, 2002).

Una forma de aplicar la bibliometría es mediante indicadores bibliométricos, los cuales conforman datos estadísticos deducidos de las publicaciones científicas (Gómez y Bordons, 1996), cuando se trata de conocer aspectos cuantitativos de la investigación, y pueden clasificarse de acuerdo con términos estadísticos como indicadores unidimensionales y bidimensionales (Van Raan, 1993), que Sanz Casado y Martín

Moreno (1997) nombran a estos últimos como multidimensionales para incluir aquellos que estudien más de dos dimensiones. Los indicadores multidimensionales estudian simultáneamente varias características, de manera simultánea, con el uso de técnicas de análisis multivariado para establecer interrelaciones múltiples en las publicaciones o en las formas de investigar de los científicos (Sanz, 2000). Esto permite construir mapas de la ciencia por medio del análisis de la co-ocurrencias de elementos específicos, tales como el número de veces que las palabras clave o las citas a documentos son mencionadas juntas en publicaciones (análisis de palabras conjuntas y de citas conjuntas) en un campo de la ciencia en particular (VanRaam, 1993).

VOSviewer es un programa informático que se utilizado para crear y visualizar redes de interacciones e interrelaciones de publicaciones científicas, revistas científicas, investigadores, instituciones, países o palabras clave o ambos, relacionados con un tema de investigación específico. La conexión de los elementos que conforman estas redes se puede dar por coautoría, co-ocurrencia, co-cita, cita o acoplamiento bibliográfico (Van Eck and Waltman, 2010). Los datos se obtienen de bases de datos referenciales y de citas como Scopus (Duque-Acevedo *et al.*, 2020) o Web of Science (WOS) específicamente de las bases de datos Science Citation Index Expanded (SCIE) y Social Sciences Citatio Index (SSCI) (Liu *et al.*, 2015). Ahora la mayor parte de la investigación referente a la relación de los *IGF* y la reproducción, se ha efectuado en humanos y ratones. Por lo tanto, el objetivo de este documento fue realizar un análisis bibliométrico con los registros bibliográficos de los documentos obtenidos en la base de datos referenciales SCOPUS® y el uso del software VOSviewer® Visulizing scientific landscapes (Centre for Science and Technology Studies, Leiden University, The Netherlands. 2020), para mostrar un panorama amplio de los estudios realizados con los *IGF* y su relación con la reproducción de bovinos y ovinos.

1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

En la base de datos analizadora de la producción científica SCOPUS® se introdujeron palabras claves relacionadas con los *IGF* y la reproducción de rumiantes, en especial de los bovinos y ovinos. La búsqueda se realizó en resumen o palabras claves, o

ambos, de artículos científicos dentro de dicha base referencial. La búsqueda se realizó en el mes de septiembre del año 2020. La estrategia de búsqueda fue la siguiente: ((((TITLE-ABS-KEY (insuline-like AND growth AND factor)) OR (TITLE-ABS-KEY(igf1)) OR (TITLE-ABS-KEY(igf2))) AND (TITLE-ABS-KEY (reproduction)) AND (TITLE-ABS-KEY(ruminant*)) OR (TITLE-ABS-KEY(sheep*)) OR (TITLE-ABS-KEY(cattle)) OR (TITLE-ABS-KEY(bovine*)) OR (TITLE-ABS-KEY(ovine*)) OR (TITLE-ABS-KEY(ewe*)) OR (TITLE-ABS-KEY(ram*)) OR (TITLE-ABS-KEY(bulls)) OR (TITLE-ABS-KEY(heifer*))

Para mostrar las características de los documentos analizados, se utilizaron los indicadores unidimensionales listados en el Cuadro 1, y que se consideran adecuados para caracterizar la investigación científica sobre IGF en la reproducción de bovinos y ovinos que fue indizada en Scopus en el periodo 1996-2020.

Cuadro 1. Indicadores bibliométricos unidimensionales y multidimensionales usados para identificar la investigación sobre IGF en bovinos y ovinos indizada en Scopus (1996-2020).

Indicadores unidimensionales	Indicadores multidimensionales
Crecimiento de la literatura	Cooperación entre los países
Publicaciones más citadas	Identificación de las temáticas de investigación
Países de publicación	
Instituciones con más publicaciones	
Revistas de publicación	

Los datos obtenidos se analizaron en el programa bibliométrico VOSviewer que se utiliza para crear y visualizar mapas, el cual usa “Visualization of Similarities” (VOS), un método propuesto por van Eck y Waltman (2007), como alternativa al escalado multidimensional para visualizar similitudes entre objetos.

Un análisis de co-ocurrencia de palabras clave y términos referente a los *IGF* en los bovinos y ovinos se realizó en títulos, en resúmenes y las palabras clave de las publicaciones científicas, con el uso del método normalización-fuerza de asociación, resolución de 1.0, con escala de visualización del 100 %, peso TLS (total link strength), tamaño de variación de etiqueta del 50 % y ancho del núcleo del 30 %, con un método de conteo completo, un número de registros de cada término ≥ 5 y un tamaño mínimo de cluster de 1.

1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento de la literatura

En la metabase de Scopus se encontraron 91 documentos: 83 artículos, 7 revisiones y 1 documento de sesión. La primera publicación que se relacionó a los *IGF* con la reproducción en bovinos y ovinos fue en 1996 con el título “Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1” publicado en *Biotechnology*, que ahora es *Nature Biotechnology*. No hubo un aumento considerable de publicaciones durante la década siguiente, y en el 2007 se publicaron cinco documentos de *IGF* relacionados con la reproducción en bovinos y ovinos. Después el número de documentos publicados fluctuó y el mayor número de publicaciones por año se registró en 2016, con 10 documentos (Figura 1).

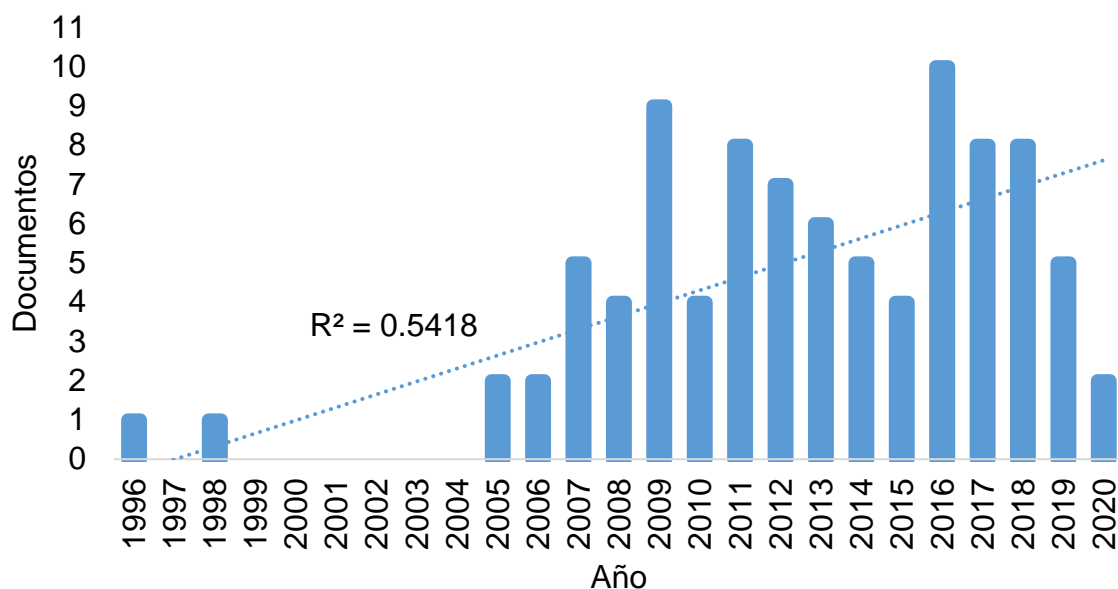


Figura 1. Distribución de publicaciones registradas en Scopus de *IGF* y el comportamiento reproductivo en bovinos y ovinos de 1996 a 2020.

Publicaciones más citadas

La estructura de citas por publicación entre 1996 y 2020 es: 2 publicaciones con ≥ 100 citas. El artículo con mayor número de citas se enfocó en la esteroidogénesis en células de la granulosa de ovarios en bovinos, trataron a las vacas con metformina, se redujo o inhibió la presencia de *IGF1* y *FSH*, y causó niveles bajos de progesterona y estradiol (Tosca *et al.*, 2007). El segundo artículo con mayor número de citas se centró en las alteraciones de genes *IGF2*, *IGF2R* y *H19* impresos en clones de bovinos, debido a una reprogramación incompleta de los núcleos de las células del donante durante la transferencia nuclear (Yang *et al.*, 2005).

Veinte publicaciones entre 99 y 50 citas. Hawken *et al.* (2012) asociaron el peso y condición corporal, con niveles de *IGF1* y encontraron que la concentración estaba asociada con regiones genómicas similares dentro y entre razas. Spicer y Aad *et al.* (2007) apoyan la hipótesis de que *IGF2* aumenta la producción de estradiol y

progesterona por las células de la granulosa, siendo *IGF2* importante en el desarrollo folicular bovino y Gebert *et al.* (2009) investigaron el desarrollo de embriones *in vivo* y mencionaron que la reprogramación del gen *IGF2* es específica según el sexo del embrión.

Siete publicaciones entre 49 y 40 citas. Maillard *et al.* (2011) demostraron que la hormona resistina se encuentra en ovarios de bovinos, y modula *in vitro* la función de GH en respuesta a *IGF1* y Sponchiado *et al.* (2017) mencionan la importancia del *IGF1* e *IGF2* en la programación embrionaria (7 días después del estro) y mantienen la gestación en bovinos.

Nueve publicaciones entre 39 y 30 citas. Sartori *et al.* (2016) analizaron las diferencias entre razas en relación de *IGF1* e insulina en la función ovárica, ovocitos viables, folículos antrales y número de blastocistos en las razas *B. Taurus* y *B. indicus*. Según Oishi *et al.* (2006), los cambios en la expresión de *IGF2* en placenta está relacionado con muertes embrionarias tempranas en clones de bovinos.

Once publicaciones entre 29 y 20 citas. Ptak *et al.* (2013), estudiaron la metilación del gen *IGF2* en la producción de embriones *in vivo* y su relación con la supervivencia embrionaria. Fagundes *et al.* (2011) evaluaron el patrón de metilación en las Regiones Metiladas Diferencialmente (DMR) en el último exón del *IGF2* en ovocitos maduros e inmaduros de bovinos en diferentes etapas del desarrollo embrionario.

Dieciocho publicaciones entre 19 y 10 citas. Albonico *et al.* (2017), analizaron el efecto de dos micotoxinas de *Fusarium* en la función reproductiva de bovinos y reportaron que las micotoxinas beauvericina y fumonisina tienen un efecto inhibitorio en FSH y *IGF1* y afectan la función reproductiva en vacas. Katska-Ksiazkiewicz *et al.* (2006), efectuaron una revisión de los métodos genéticos dentro de los cuales se estudió la

expresión génica de *IGF2* y biotecnológicos de aprovechamiento del potencial reproductor en mamíferos, enfocándose principalmente en bovinos y cerdos.

Veintiún publicaciones entre nueve y una cita. Dettori *et al.* (2018) estudiaron la relación de receptor de la hormona de crecimiento (GHR), receptor de la hormona del crecimiento y liberación de hormonas (GHRHR) e *IGF1* en calidad y producción de leche. Grossi *et al.* (2015) evaluaron los efectos de la sustitución de alelos de *IGF1*, marcadores GH y del Factor de transcripción específico de la hipófisis anterior (*PIT1*) en valores reproductivos estimados (EBV) de bovinos, y demostraron una alta relación de *IGF1* con EBV. Dentro de estas publicaciones hay tres que no tienen registro de citas. La publicación más reciente fue de Zhang *et al* (2020), quienes buscaron una estrategia para mejorar el proceso de clonación mediante la rectificación de la reprogramación epigenética incompleta y la metilación del gen *IGF2*. La publicación más antigua y no citada es de Kasimanickam (2016), cuyo objetivo fue explicar las diferencias de expresión génica de los genes *VEGF*, *PIGF*, *AdipoQ*, *AdipoR2*, *PPARG*, *LEP*, *IGF1*, *IGF2* en el útero, la carúncula y el cotiledón de ovejas con toxemia subclínica de gestación. El total de la base de datos tiene un índice $h= 35$. En promedio, se tienen 31 citas, en las publicaciones con la temática de la relación de los *IGF* con actividad reproductiva en bovinos y ovinos.

En el Cuadro 2, se enlistan las 15 publicaciones con mayor número de citas entre el intervalo de 1996 y 2020.

Cuadro 2. Publicaciones más citadas sobre los IGF en la reproducción de bovinos y ovinos.

Año	Autores	Título	Tipo de publicación	Fuente	Categoría/especie	N° citas
-----	---------	--------	---------------------	--------	-------------------	----------

2007	Tosca L., Chabrolle C., Uzbekova S., Dupont J.	Effects of metformin on bovine granulosa cells steroidogenesis: Possible involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (AMPK)	Artículo	Biology of Reproduction	Esteroidogénesis en células de la granulosa / Bovinos	104
2005	Yang L., Chavatte-Palmer P., Kubota C., O'Neill M., Hoagland T., Renard J.-P., Taneja M., Yang X., Tian X.C.	Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones	Artículo	Molecular Reproduction and Development	Clonación / Bovinos	101
2012	Hawken R.J., Zhang	Genome-wide association studies of	Artículo	Journal of Animal Science	Condición corporal, niveles <i>IGF1</i>	94

	Y.D.,	female			y	
	Fortes	reproduction in			reproducción	
	M.R.S.,	tropically			/ Bovinos	
	Collis E.,	adapted beef				
	Barris	cattle				
	W.C.,					
	Corbet					
	N.J.,					
	Williams					
	P.J.,					
	Fordyce					
	G.,					
	Holroyd					
	R.G.,					
	Walkley					
	J.R.W.,					
	Barendse					
	W.,					
	Johnston					
	D.J.,					
	Prayaga					
	K.C., Tier					
	B.,					
	Reverter					
	A.,					
	Lehnert					
	S.A.					
201	Mani	IGF1 induces	Artículo	Reproductio	<i>IGF1</i> ,	94
0	A.M.,	up-regulation of		n	desarrollo	
	Fenwick	steroidogenic				

	M.A., Cheng Z., Sharma M.K., Singh D., Wathes D.C.	and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidyli- nitro-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells.			follicular / Bovinos	
200 7	Spicer L.J., Aad P.Y.	Insulin-like growth factor (IGF) 2 stimulates steroidogenesis and mitosis of bovine granulosa cells through the IGF1 receptor: Role of follicle- stimulating hormone and IGF2 receptor	Artículo	Biology of Reproductio n	<i>IGF1</i> e <i>IGF2</i> , desarrollo follicular /Bovinos	91
200 8	Spicer L.J., Aad P.Y., Allen D.T., Mazerbou rg S.,	Growth differentiation factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis	Artículo	Biology of Reproductio n	<i>IGF1</i> , desarrollo follicular / Bovinos	87

	Payne A.H., Hsueh A.J.	by bovine theca cells: Influence of follicle size on responses to GDF9				
199 8	Lincoln G.A., Richardson M.	Photo- neuroendocrine control of seasonal cycles in body weight, pelage growth and reproduction: lessons from the HPD sheep model	Artículo	Comparativ e Biochemistr y and Physiology - C Pharmacolo gy Toxicology and Endocrinolo gy	<i>IGF1</i> , fotoperiodo, peso corporal, circunferencia escrotal / Ovinos	86
199 6	Damak S., Sul H.- Y., Jay N.P., Bullock D.W.	Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1		Bio/Technol ogy	<i>IGF1</i> , clonación / Ovinos	78
201 1	Wathes D.C., Cheng Z., Fenwick M.A., Fitzpatrick	Influence of energy balance on the somatotrophic axis and matrix metalloproteinas	Artículo	Reproductio n	Expresión de <i>IGF1</i> e <i>IGF2</i> , postparto, fertilidad / Bovinos	75

	R., Patton J.	e expression in the endometrium of the postpartum dairy cow				
200 8	Satterfield M.C., Hayashi K., Song G., Black S.G., Bazer F.W., Spencer T.E.	Progesterone regulates FGF10, MET, IGFBP1, and IGFBP3 in the endometrium of the ovine uterus	Artículo	Biology of Reproductio n	<i>IGF1</i> e <i>IGF2</i> , peri- implantación, gestación, progesterona / Ovinos	65
200 9	Fouladi- Nashta A.A., Wonnacot t K.E., Gutierrez C.G., Gong J.G., Sinclair K.D., Garnswort hy P.C., Webb R.	Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n- 3 and n-6 fatty acids	Artículo	Reproductio n	<i>IGF1</i> , nutrición, desarrollo embrionario / Bovinos	63

2013	Nivet A.- L., Vigneault C., Blondin P., Sirard M.-A.	Changes in granulosa cells' gene expression associated with increased oocyte competence in bovine	Artículo	Reproductio n	<i>IGF2</i> , calidad en ovocitos, fertilidad / Bovinos	59
2009	Velazque z M.A., Zaraza J., Oropeza A., Webb R., Niemann H.	The role of IGF1 in the in vivo production of bovine embryos from superovulated donors	Revisión	Reproductio n	<i>IGF1</i> , superovulació n, calidad embrionaria / Bovinos	58
2009	Gentili S., Morrison J.L., McMillen I.C.	Intrauterine growth restriction and differential patterns of hepatic growth and expression of IGF1, PCK2, and HSDL1 mRNA in the sheep fetus in late gestation	Artículo	Biology of Reproductio n	<i>IGF1</i> , <i>IGF2</i> , <i>IGF1R</i> , <i>IGF2R</i> , desarrollo fetal, placenta / Ovinos	54
2008	Pisani L.F.,	Effects of pre- mating nutrition	Artículo	Reproductio n	<i>IGF1</i> , desarrollo	54

Antonini on mRNA levels
S., Pocar of
P., Ferrari developmentally
S., Brevini relevant genes
T.A.L., in sheep
Rhind oocytes and
S.M., granulosa cells
Gandolfi
F.

ovocitos,
nutrición
restringida /

Países de publicación o Cooperación entre los países

Los países con mayor aportación en publicaciones referente a la relación de los *IGF* en la reproducción de bovinos y ovinos, se muestran en el cuadro 3. Las principales colaboraciones entre países se pueden observar en la Figura 2, donde Estados Unidos tiene colaboración principal con Italia, Reino Unido, Australia y Francia; Alemania principalmente colabora con Reino Unido y México y las colaboraciones principales del Reino Unido con otros países son: Alemania, México y Estados Unidos.

Cuadro 3. Los principales 15 países con mayor número de publicaciones sobre los *IGF* en la reproducción de bovinos y ovinos

País	Número de publicaciones
Estados Unidos de América	33
Reino Unido	15
Brasil	13
Australia	10
Italia	10
Alemania	9
Francia	7
India	6
Canadá	5
Japón	5
China	4
México	4
Irlanda	3
Polonia	2
Argentina	1

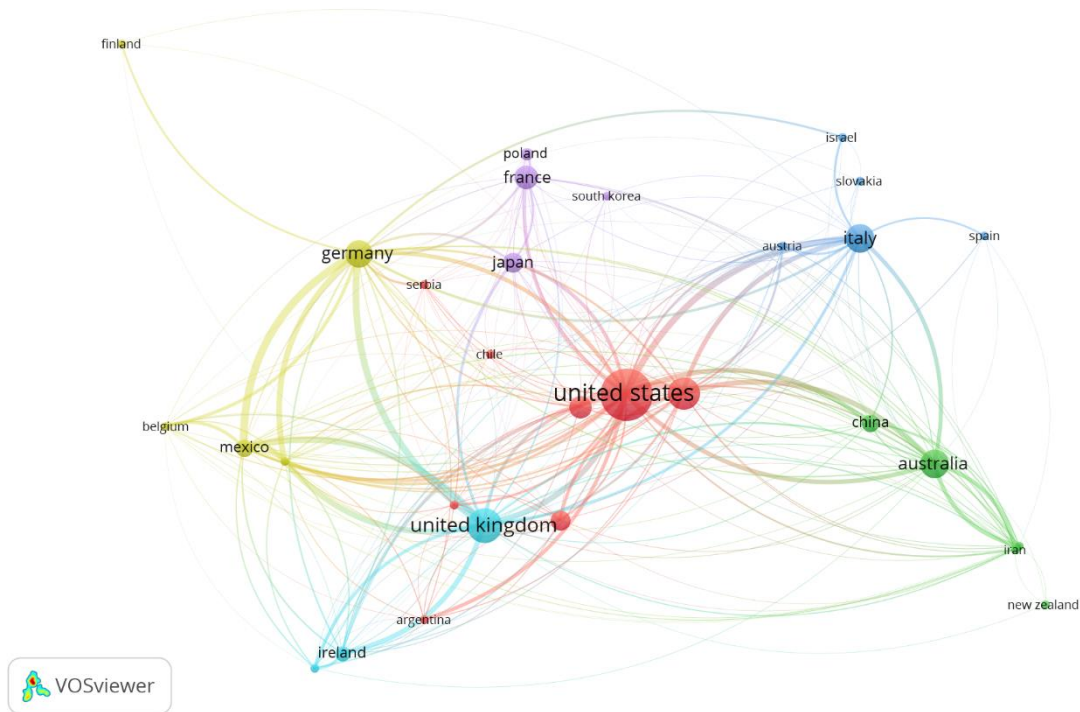


Figura 2. Visualización de los países con mayor número de publicaciones relacionados a los IGF y la reproducción de bovinos y ovinos y su relación de colaboración, con el uso del programa VOSviewer®.

La universidad con mayor número de publicaciones es la Universidad de Sao Paulo – USP, con 10 publicaciones y se encuentra en la posición 101-150 del Ranking académico de Universidades del mundo (ARWU) y en la posición número 115 de la Clasificación Mundial de Universidades (QS). La segunda universidad con más publicaciones es la Universidad del estado de Oklahoma, la cual esta en la posición 501-600 del ARWU y posición 751-800 del QS y tiene ocho publicaciones de la relación de los IGF con la reproducción de bovinos y ovinos. La tercera es la Universidad de Queensland, en la posición 54 del ARWU y posición 46 del QS y tiene 7 publicaciones referentes a la relación de los IGF con la reproducción de bovinos y ovinos (Cuadro 4). En el cuadro 4 se observan las cinco principales universidades que han publicado referente a los IGF y su relación con la reproducción en bovinos y ovinos, están dentro de las 600 mejores universidades del mundo de acuerdo a ARWU y en las 800 mejores universidades de acuerdo a QS, en especial la Universidad del estado de Oklahoma.

Cuadro 4. Principales diez instituciones que más han publicado sobre la relación entre IGF y la reproducción de bovinos y ovinos.

Institución	País	P	TC	PC	>100	>30	<30	ARWU	QS
1. Universidade de São Paulo	Brasil	10	171	17.1	0	3	7	101-150	115
2. Oklahoma State University	USA	8	298	37.25	0	3	5	501-600	751-800
3. The University of Queensland	Australia	7	241	34.43	0	3	4	54	46
4. UNESP-Universidade Estadual Paulista	Brasil	6	110	18.33	0	2	4	301-400	493
5. University of Missouri - Columbia	USA	6	173	28.83	0	2	4	151-200	483
6. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa	Brasil	6	100	16.67	0	1	5	-	-
7. Centre Inrae Val De Loire INRAE	Francia	6	269	44.83	1	3	2	-	-
8. Royal Veterinary College	Reino Unido	5	300	60.00	0	4	1	801-900	-

University of London									
9. University of Nottingham	Reino Unido	4	207	51.75	0	4	0	101-150	99
10. University of Milano-Bicocca	Italia	4	108	27.00	0	1	3	301-400	521-530

P= número de publicaciones; TC= Total de citas; PC= Promedio de citas; >100= publicaciones con más de cien citas; >30 = publicaciones entre 30 y 99 citas por publicación; <30= publicaciones con menos de 30 citas. ARWU= Academic Ranking of World Universities; QS= World University Rankings.

Revistas de publicación

La revista con mayor número de publicaciones registradas referente a la relación de los *IGF* con la reproducción de bovinos y ovinos es *Reproduction* con 24 publicaciones, y publica artículos de investigación referentes a biología reproductiva en humanos y animales. *Reproduction* tiene gran importancia en el área de reproducción pecuaria, la cual va enfocada el presente estudio, y con una medida de impacto CiteScore 2019 de 5.9. La segunda revista con mayor número de publicaciones en el tema es *Biology of Reproduction* con 20 publicaciones y CiteScore= 5.2; luego está *PlosOne* con 7 publicaciones y CiteScore= 5.2; (Cuadro 5). El CiteScore es una medida de impacto usada en Scopus para las revistas indizadas en esta base de datos (Ziljstra y MacCollough, 2016).

En el Cuadro 5 se observa que 8 de las 10 principales revistas con publicaciones referentes a la relación de los *IGF* con la reproducción de bovinos y ovinos, están dentro del cuartil 1. Esto significa que se encuentran dentro de las principales revistas con mayor índice de impacto en su área de estudio (Reproducción o Ciencia Pecuaria), por lo que se consideran de gran importancia y amplia divulgación. Dentro de las 10 principales revistas, también están *Toxicon*, que está en el cuartil 2, y *Reproduction*

and Development, la cual se encuentra en el cuartil 3; esta última se considera con las de menos impacto dentro de su área de estudio, en este caso dentro de la categoría de genética.

Cuadro 5. Análisis con CiteScore de las revistas con mayor número de publicaciones de *IGF* y reproducción en bovinos y ovinos.

Revista	No. Docs.	No. Citas	CiteScore	Categoría Scopus	Posición / Cuartil
Reproduction	24	943	5.9	Medicina, Ginecología y obstetricia	14 de 171 / C1
Biology of Reproduction	20	789	5.2	Medicina, Medicina reproductiva	12 de 70 / C1
Plos One	7	113	5.2	Multidisciplinaria	10 de 111 / C1
Toxicon	3	54	4.1	Toxicología	57 de 116 / C2
Animal	2	49	3.6	Ciencia animal y Zoología	59 de 402 / C1
Animal Reproduction Science	2	21	3.0	Ciencia animal y Zoología	88 de 402 / C1
Human Reproduction	2	43	10.1	Obstetricia y Ginecología	3 de 171 / C1
Journal of Dairy Science	2	24	5.4	Ciencia animal y Zoología	14 de 402 / C1
Molecular Reproduction and Development	2	131	3.5	Genética	186 de 324 / C3

Reproductive Biology	2	22	3.0	Ciencia animal y Zoología	87 de 402 / C1
-------------------------	---	----	-----	------------------------------	-------------------

Identificación de las temáticas de investigación

Los resultados del análisis de co-ocurrencias mostraron el uso de 3700 palabras o términos con mayor frecuencia empleados en las publicaciones científicas, de los cuales solo se retuvieron los términos con mayor a 5 co-ocurrencias que fueron 148, organizados en 3 clusters. Las 15 palabras o términos utilizados con mayor frecuencia en las publicaciones se muestran en el Cuadro 6. Este análisis muestra cuales son los tópicos usados con mayor frecuencia dentro del área de estudio. La especie usada con mayor frecuencia en los estudios es el bovino, como en el estudio realizado por Hawken *et al.* (2012), quienes asociaron el peso y condición corporal, con niveles de *IGF1* y encontraron que la concentración estaba asociada con regiones genómicas similares dentro y entre razas. En otro estudio con bovinos, Curchoe *et al.* (2005) analizaron la expresión génica del gen *IGF2* y su efecto en el crecimiento y desarrollo fetal de embriones *in vivo*. La segunda especie utilizada con mayor frecuencia es la ovina. Luther *et al.* (2007) estudiaron la influencia de la desnutrición en el crecimiento y desarrollo fetal en ovejas y concluyeron que la subnutrición disminuye las concentraciones de *IGF1*, insulina y glucosa, lo cual afecta el suministro fetal de nutrientes y el crecimiento fetal. También se utilizan las palabras edad, peso corporal (Luther *et al.*, 2007; Siqueira *et al.* 2017), proliferación celular (Tosca *et al.*, 2007; Spicer and Aad, 2007; Spicer *et al.*, 2009; Maillard *et al.* 2011) y progesterona (Weems *et al.*, 2007; Viñoles *et al.*, 2010).

Cuadro 6. Las 15 palabras utilizadas con mayor frecuencia en los artículos relacionados con *IGF* y la reproducción de bovinos y ovinos.

Palabra Clave	Frecuencia	Palabra Clave	Frecuencia
Cattle	57	Progesterone	26
Ewe	47	Estradiol	26

Age	45	Secretion	25
Weight	41	<i>Vitro</i>	25
Pregnancy	39	IGF2R	21
SNP	27	Metformin	18
Heifer	26	Phosphorylation	18
Cell proliferation	26		

En la Figura 3 se muestran los tres clusters y la relación entre ellos. Un cluster es un grupo de palabras que tienen relación entre sí. El cluster uno es el más grande (color rojo) agrupa 83 términos y se muestran los estudios realizados en bovinos y relacionados con los IGF, mutaciones en los genes de IGF y fertilización *in vitro*. Un ejemplo de publicación en este cluster es el publicado por Tosca *et al.* (2007), quienes evaluaron el efecto de la metformina en la esteroidogénesis de las células de la granulosa en células ováricas de bovinos, y concluyeron que la metformina reduce la secreción de progesterona, estradiol y esteroidogénesis, en ausencia de FSH e IGF1. Gebert *et al.* (2009) analizaron la asociación de la metilación de ADN del gen *IGF2* con el sexo de los embriones bovinos y concluyeron que la metilación del ADN fue menor en blastocistos femeninos que en los masculinos.

La temática del cluster uno tiene estrecha relación con el cluster dos conformado por 40 términos (color verde), y entre ellos agrupan estudios donde analizaron la proliferación celular y esteroidogénesis. Algunos ejemplos de esta relación entre los clusters 1 y 2 son las publicaciones de Tosca *et al.* (2010) quienes evaluaron el efecto de la metformina en cultivos de células de la granulosa de ovarios bovinos y concluyeron que la metformina disminuye niveles de *IGF1*, lo cual provoca disminución en el crecimiento y síntesis de proteínas en cultivos de células de la granulosa de bovinos. Spicer y Aad (2007) analizaron el efecto del IGF2 a través del receptor de *IGF1* (*IGF1R*) en la esteroidogénesis y mitosis de células de la granulosa en folículos bovinos y concluyeron que el aumento de *IGF1* en el desarrollo de folículos puede disminuir la síntesis del receptor de *IGF2* (*IGF2R*), lo cual aumenta la disponibilidad

de *IGF2* e induce la esteroidogénesis y mitogénesis en células de la granulosa a través del *IGF1R*.

El cluster tres, es el de menor tamaño (color azul) y está conformado por 25 términos, se concentra principalmente en los estudios realizados en ovejas, relacionados con la reproducción ovina e IGF. Las palabras empleadas con mayor repetibilidad en estos estudios fueron estradiol, progesterona, tasa ovulatoria y desarrollo embrionario *in vitro* principalmente. Una publicación relacionada con este cluster es la de Viñoles *et al.* (2010), quienes evaluaron el efecto de la nutrición en la secreción de IGF1, desarrollo folicular y tasa ovulatoria de ovejas y concluyeron que ovejas con una mala nutrición tenían baja condición corporal, bajas concentraciones de insulina, leptina e IGF1, lo cual afectó el desarrollo folicular y la tasa ovulatoria. Satterfield *et al.* (2008) analizaron el efecto de progesterona en la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos 7 y 10 (FGF7 y FGF10) e IGF1 y 2 en la implantación y desarrollo temprano de la gestación, y concluyeron que el tratamiento con progesterona exógena aumenta los niveles de ARNm de *IGF1* e *IGF2* en el día 9 después del apareamiento, lo cual propicia un ambiente uterino adecuado para el desarrollo exitoso de la gestación. Como se observa en la Figura 3, el cluster tres tiene estrecha relación con la temática del cluster dos. Un ejemplo de esta relación es la publicación de Pisani *et al.* (2008), quienes evaluaron la relación entre la nutrición previa al empadre y la cuantificación de ARNm de genes relacionados con el metabolismo del folículo; receptor de leptina, transportador de glucosa 1, 3 y 8 (*SLC2A1*, *SLC2A3* y *SLC2A8*), *IGF1* e *IGF1R*, y concluyeron que la desnutrición antes del empadre tiene una influencia negativa en células de la granulosa, la expresión de genes relacionados con el metabolismo del folículo, afectando el desarrollo folicular.

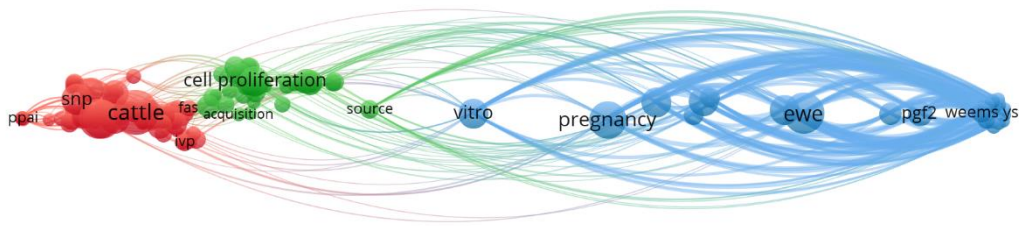


Figura 3. Mapa de red de las temáticas para IGF y la reproducción de bovinos y ovinos, agrupadas en clústeres.

1.6. CONCLUSIONES

En el presente estudio bibliométrico se concluye que hay poca información del tema, porque solo se obtuvieron 91 documentos. Sin embargo, en los últimos 16 aumentó la publicación de artículos que muestren la relación de los IGF con la reproducción de bovinos y ovinos. Pero la fluctuación en las publicaciones es variable porque hay un número mayor de publicaciones en el año 2016. Respecto a la cantidad más alta de citas por publicación, hay una probabilidad mayor de ser citado, si la investigación se basa en aspectos de cambios a nivel de ADN, cambios en la expresión génica, esteroidogénesis en ovario, crecimiento celular, implantación y desarrollo temprano de la gestación y apoptosis, porque las publicaciones con mayor número de citas abordan estas temáticas.

Los países e instituciones con mayor número de documentos publicados y de las colaboraciones entre instituciones en la temática de este manuscrito, forman la red de colaboración con mayor participación entre Estados Unidos, Reino Unido, Australia e Italia. La Universidad de Sao Paulo en Brasil, es la universidad con mayor número de

publicaciones del tema de la influencia de los IGF en la reproducción de bovinos y ovinos; sin embargo, las colaboraciones con otras instituciones no es tan marcada como lo es la Universidad del estado de Oklahoma. Las cinco instituciones con el mayor número de publicaciones y número de citas por publicación, que resultaron del análisis bibliométrico están dentro de las 600 instituciones consideradas como las mejores del mundo. También existe una gran probabilidad de publicar documentos relacionados con la influencia de los IGF en la reproducción de bovinos y ovinos en revistas con alto índice de impacto, porque las 10 revistas con mayor número de publicaciones tienen CiteScore altos y están en el percentil 1 dentro de su área de publicación, y es una gran oportunidad para quien se interese por desarrollar investigación en esta área de estudio. El uso de herramientas bibliométricas como la metabase Scopus y el software VOSviewer, son de gran ayuda para conocer y obtener mayor información de investigaciones realizadas por investigadores o grupos de investigadores e instituciones, referentes a un tema de interés particular, y aumenta la probabilidad de crear redes de colaboración en el mundo.

1.7. REFERENCIAS

- Albonico, M., L.F. Schutz, F. Caloni, C. Cortinovia, L.J. Spicer. 2017. In vitro effects of the Fusarium mycotoxins fumonisin B1 and beauvericin on bovine granulosa cell proliferation and steroid production. *Toxicon*, 128: 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.01.019>
- Bordons, M. 2004. Hacia el reconocimiento internacional de las publicaciones científicas españolas. *Revista Española de Cardiología*, 2004, vol. 57, No. 9, pp. 799-802.
- Borgman, C. L. y Furner, J. 2002. 'Scholarly communication and bibliometrics', *Annual Review of Information Science and Technology*. John Wiley & Sons, Ltd, 36(1), pp. 2–72. doi: 10.1002/aris.1440360102.
- Curchoe, C., S.Q. Zhang, Y.F. Bin, X.Q. Zhang, L. Yang, D.Y. Feng, M. O'Neill, and X.C. Tian. 2005. Promoter-specific expression of the imprinted igf2 gene in cattle (*Bos taurus*). *Biol Reprod*. 73(6): 1275-1281. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.044727>.
- Dettori, M.L., M. Pazzola, P. Paschino, M. Amills, G.M. Vacca. 2018. Association between the GHR, GHRHR, and IGF1 gene polymorphisms and milk yield and

- quality traits in Sarda sheep. *J Dairy Sci*, 101(11):9978-9986. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14914>.
- Duque-Acevedo, M., L.J. Belmonte-Ureña, F.J. Cortés-García, F. Camacho-Ferre. 2020. Agricultural waste: Review of the evolution, approaches and perspectives on alternative uses. *Global Ecology and Conservation* 22 e00902. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e00902>.
- Fagundes, N.S., V.A. Michalczechen-Lacerda, E.S Caixeta, G.M. Machado, F.C. Rodrigues, E.O. Melo, M.A.N. Dode, M.M. Franco. 2011. Methylation status in the intragenic differentially methylated region of the IGF2 locus in *Bos taurus indicus* oocytes with different developmental competencies. *Mol Hum Reprod*, 17(2):85-91. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq075>.
- Gebert, C., C. Wrenzycki, D. Herrmann, D. Gröger, R. Reinhard, P. Hajkova, A. Lucas-Hahn, J. Carnwath, H. Lehrach and H. Niemann. 2006. The bovine *igf2* gen is differentially methylated in oocyte and sperm DNA. *Genetics* 33: 222-229. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.03.011>.
- Gebert, C., C. Wrenzycki, D. Herrmann, D. Gröger, J. Thiel, R. Reinhardt, H. Lehrach, P. Hajkova, A. Lucas-Hahn, J.W. Carnwath, H. Niemann. 2009. DNA methylation in the IGF2 intragenic DMR is re-established in a sex-specific manner in bovine blastocysts after somatic cloning. *Genomics*, 94(1): 63-9. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.03.004>.
- Ghanipoor-Samami, M., A. Javadmanesh, B.M. Burns, D.A. Thomsen, G.S. Nattrass, C.A.S. Estrella, K.L. Kind, and S. Hiendleder. 2018. Atlas of tissue- and developmental stage specific gene expression for the bovine insulin-like growth factor (IGF) system. *PLoS ONE* 13(7): e0200466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200466>.
- Gibson, C., M. de Ruijter-Villani, and T.A.E. Stout. 2017. Negative uterine asynchrony retards early equine conceptus development and upregulation of placental imprinted genes. *Placenta* 57: 175e182. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.07.007>.
- Gómez Caridad, I., & Bordons Gangas, M. 1996. Limitaciones en el uso de los indicadores bibliométricos para la evaluación científica. *Política Científica*, 46. P. 21-26. <http://hdl.handle.net/10261/9813>
- Grossi, D.A., N.V. Grupioni, M.E Buzanskas, C.C.P. de Paz, L.C.D.A. Regitano, M.M. de Alencar, F.S. Schenkel, D.P Munari. 2015. Allele substitution effects of IGF1, GH and PIT1 markers on estimated breeding values for weight and reproduction traits in Canchim beef cattle. *Livestock Science*, 180: 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.07.018>.
- Hawken, R.J., Y.D. Zhang, M.R.S. Fortes, E. Collis, W.C. Barris, N.J. Corbet, P.J. Williams, G. Fordyce, R.G. Holroyd, J.R.W. Walkley, W. Barendse, D.J. Johnston, K.C. Prayaga, B. Tier, A. Reverter, S.A. Lehnert. 2012. Genome-wide

- association studies of female reproduction in tropically adapted beef cattle. *J Anim Sci* 90(5):1398-410. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4410>.
- Hua, S., Y. Wang, H. Wu, F. Quan, H. Zhang, and Y. Zhang. 2013. Differences in DNA methylation and mRNA levels between the breeding and non-breeding seasons of in vitro produced IVF and SCNT sheep embryos. *Small Ruminant Research* 113: 390 – 397. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.04.005>.
- Kasimanickam, R.K. 2016. Subclinical pregnancy toxemia-induced gene expression changes in ovine placenta and uterus. *Front. Vet. Sci.*, 3: 69. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00069>.
- Katska-Ksiazkiewicz, L., D. Lechniak-Cieślak, A. Korwin-Kossakowska, H. Alm, B. Ryńska, E. Warzych, J. Sosnowski, G. Sender. 2006. Genetical and biotechnological methods of utilization of female reproductive potential in mammals. *Reproductive biology*, 6 Suppl 1:21-36
- Laskowski, D., Y. Sjunnesson, P. Humblot, G. Andersson, H. Gustafsson, R. Båge. 2016. The functional role of insulin in fertility and embryonic development - What can we learn from the bovine model?. *Theriogenology* 30: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.062>.
- Lenz, M.I., G.F. Ramírez, y L.F. Uribe. 2007. Papel del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1) en la regulación de la función ovárica. *Biosalud*, 6: 149-159.
- Liu, Z., Y. Yin, W. Liu, and M. Dunford. 2015. Visualizing the intellectual structure and evolution of innovation systems research: a bibliometric analysis. *Scientometrics* 103:135–158. <https://doi.org/10.1007/s11192-014-1517-y>.
- Luther, J., R. Aitken, J. Milne, M. Matsuzaki, L. Reynolds, D. Redmer, J. Wallace. 2007. Maternal and fetal growth, body composition, endocrinology, and metabolic status in undernourished adolescent sheep. *Front Vet Sci.*, 3: 69. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00069>.
- Maillard, V., P. Froment, C. Ramé, S. Uzbekova, S. Elis, J. Dupont. 2011. Expression and effect of resistin on bovine and rat granulosa cell steroidogenesis and proliferation. *Reproduction*, 141(4): 467-79. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0419>.
- Meiyu, Q.I., Z. Roth, and L. Di. 2011. Insulin-like growth factor-i (igf-i) in reproduction system of female bovine. *Journal of Northeast Agricultural University* 18 (4): 84-87. [https://doi.org/10.1016/S1006-8104\(12\)60030-0](https://doi.org/10.1016/S1006-8104(12)60030-0).
- Mondal, S., A. Mor, and I.J. Reddy. 2017. Factors/genes in maternal recognition of pregnancy: an overview. *Current developments in biotechnology and bioengineering. Human and Animal Health Applications* 597-630. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63660-7.00023-1>.
- Oberlender, G., L.D.M. Solis, M.G. Zangeronimo, A.C. da Silva, T.M. de Alcantara, T. P. Preisser, and L.A. Vieira. 2013. Role of insulin-like growth factor-I and

- follicular fluid from ovarian follicles with different diameters on porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology* 30: 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.018>.
- Oishi, M., H. Gohma, K. Hashizume, Y. Taniguchi, H. Yasue, S. Takahashi, T. Yamada, Y. Sasaki. 2006. Early embryonic death-associated changes in genome-wide gene expression profiles in the fetal placenta of the cow carrying somatic nuclear-derived cloned embryo. *Mol Reprod Dev*, 73(4): 404-9. <https://doi.org/10.1002/mrd.20345>.
- Pisani, L.F., S. Antonini, P. Pocar, S. Ferrari, T.A.L. Brevini, S.M. Rhind, F. Gandolfi. 2008. Effects of pre-mating nutrition on mRNA levels of developmentally relevant genes in sheep oocytes and granulosa cells. *Reproduction*, 136: 303-312. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0394>.
- Pritchard, A. 1969 Statistical bibliography or bibliometrics?. *Journal of Documentation*, 25(4):348-349, Dec.
- Ptak, G.E., A. D'Agostino, P. Toschi, A. Fidanza, F. Zacchini, M. Czernik, F. Monaco, P. Loi. 2013. Post-implantation mortality of in vitro produced embryos is associated with DNA methyltransferase 1 dysfunction in sheep placenta. *Hum Reprod*, 28(2): 298-305. <https://doi.org/10.1093/humrep/des397>.
- Ruiz, A.J.L., L.F. Uribe-Velásquez, y J. H. Osorio. 2011. Factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1 (IGF-1) en la reproducción de la hembra bovina. *vet. zootec.* 5(2): 68-81.
- Sanz, E. 2000. Proyecto docente para la provisión de una plaza de Catedrático de Universidad sobre Bibliometría. Madrid, España: Universidad Carlos III.
- Sartori, R., L.U. Gimenes, P.L.J. Monteiro, L.F. Melo, P.S. Baruselli, M.R. Bastos. 2016. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology*, 86(1):32-40. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.016>.
- Satterfield, M.C., K. Hayashi, G. Song, S.G. Black, F.W. Bazer, T.E. Spencer. 2008. Progesterone regulates FGF10, MET, IGFBP1, and IGFBP3 in the endometrium of the ovine uterus. *Biol Reprod*, 79(6): 1226-36. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.071787>.
- Sequeira, M., S.J. Pain, V. de Brun, A. Meikle, P.R. Kenyon, and H.T. Blair. 2016. Gestation-related gene expression and protein localization in endometrial tissue of Suffolk and Cheviot ewes at gestation day 19, after transfer of Suffolk or Cheviot embryos. *Theriogenology* 86: 1557 – 1565. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.015>.
- Sferruzzi-Perri, A.N., J.A. Owens, P. Standen, and C.T. Roberts. 2008. Maternal insulin-like growth factor-II promotes placental functional development via the

- type 2 IGF receptor in the Guinea pig. *Placenta* 29: 347 – 355. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.01.009>.
- Siqueira, L.G., P. Tribulo, Z. Chen, A.C. Denicol, M.S. Ortega, V.M. Negrón-Pérez, J. Kannampuzha-Francis, K.G. Pohler, R.M. Rivera, P.J. Hansen. 2017. Colony-stimulating factor 2 acts from days 5 to 7 of development to modify programming of the bovine conceptus at day 86 of gestation. *Biology of reproduction*, 77, 343–350. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox018>
- Spicer, L.J., P.Y. Aad. 2007. Insulin-like growth factor (IGF) 2 stimulates steroidogenesis and mitosis of bovine granulosa cells through the IGF1 receptor: Role of follicle-stimulating hormone and IGF2 receptor. *Biol Reprod*, 77(1):18-27. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.058230>.
- Spicer, L.J., S. Sudo, P.Y. Aad, L.S. Wang, S.-Y. Chun, I. Ben-Shlomo, C. Klein, A.J.W. Hsueh. 2009. The hedgehog-patched signaling pathway and function in the mammalian ovary: A novel role for hedgehog proteins in stimulating proliferation and steroidogenesis of theca cells. *Reproduction*, 138(2): 329-39. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0317>.
- Sponchiado, M., N.S. Gomes, P.K. Fontes, T. Martins, M. Del Collado, A.D.A Pastore, G. Pugliesi, M.F.G. Nogueira, M. Binelli. 2017. Pre-hatching embryo-dependent and -independent programming of endometrial function in cattle. *PLoS One*, 8(8): e69444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069444>.
- Tosca, L., C. Chabrolle, S. Uzbekova, J. Dupont. 2007. Effects of metformin on bovine granulosa cells steroidogenesis: Possible involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (AMPK). *Biology of reproduction* 76, 368–378. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.055749>.
- Tosca, L., C. Ramé, C. Chabrolle, S. Tesseraud, J. Dupont. 2010. Metformin decreases IGF1-induced cell proliferation and protein synthesis through AMP-activated protein kinase in cultured bovine granulosa cells. *Reproduction*, 139: 409-418. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0351>
- Van Eck, N. J. y Waltman, L. 2007 'VOS: A New Method for Visualizing Similarities Between Objects', in Decker, R. and Lenz, H.-J. (eds) *Advances in Data Analysis*. Berlin, Heidelberg: Springer (Studies in Classification, Data Analysis, and Knowledge Organization), pp. 299–306. doi: 10.1007/978-3-540-70981-7_34.
- Van Eck, N.J., and Waltman, L. 2010. Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. *Scientometrics*, 84(2), 523–538.
- Van Raan, A.J.F., 1993. Advanced bibliometric methods to assess research performance and scientific development: basic principles and recent practical applications. *Research Evaluation [en línea]*, vol. 3, no. 3, pp. 151-166. [Consulta: 12 octubre 2020]. ISSN 0958-2029. DOI 10.1093/rev/3.3.151. Disponible en: <https://academic.oup.com/rev/article/3/3/151/1564337>.

- Viñoles, C., B. Paganoni, K.M.M. Glover, J.T.B. Milton, D. Blache, M.A. Blackberry, G.B. Martin. 2010. The use of a 'first-wave' model to study the effect of nutrition on ovarian follicular dynamics and ovulation rate in the sheep. *Reproduction*, 140(6): 865-74. [https://doi.org/ 10.1530/REP-10-0196](https://doi.org/10.1530/REP-10-0196).
- Webb, R., P. Garnsworthy, B. Campbell, and M. Hunter. 2007. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology* 68: 22-29. [https://doi.org/ 10.1016/j.theriogenology.2007.04.036](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.036).
- Weems, Y.S., L. Kim, V. Tsuda, C. Yin, C.W. Weems. 2007. What regulates placental steroidogenesis in 90-day pregnant ewes?. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 84(1-2): 54-65. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2007.04.002>.
- Wang, L.M., H.L. Feng, Y.Zh. Ma, M. Cang, H.J. Li, Zh. Yan, P. Zhou, J.X. Wen, S. Bou, and D.J. Liu. 2009. Expression of IGF receptors and its ligands in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Animal Reproduction Science* 114: 99 – 108. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.09.019>.
- Yang, L., P. Chavatte-Palmer, C. Kubota, M. O'Neill, T. Hoagland, J.-P. Renard, M. Taneja, X. Yang, X.C. Tian. 2005. xpression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. *Mol Reprod Dev*, 71(4):431-8. <https://doi.org/10.1002/mrd.20311>.
- Zhang, J., L. Hao, Q. Wei, S. Zhang, H. Cheng, Y. Zhai, Y. Jiang, X. An, Z. Li, X. Zhang, B. Tang. 2020. TET3 overexpression facilitates DNA reprogramming and early development of bovine SCNT embryos. *Reproduction*, 160(3): 379-391. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0021>.
- Ziljstra, H. R. McCollough. 2016. «CiteScore: A New Metric to Help You Choose the Right Journal». *Authors' Update*. Recuperado 9 de noviembre de 2020 (<https://www.elsevier.com/authors-update/story/impact-metrics/citescore-a-new-metric-to-help-you-choose-the-right-journal>).

CAPÍTULO II. INFLUENCIA DE LA CONDICIÓN CORPORAL EN LA RESPUESTA REPRODUCTIVA Y LA REGULACIÓN GÉNICA DEL *IGF2* EN OVEJAS SUFFOLK

2.1. RESUMEN

La condición corporal (CC) influye en la respuesta ovárica de las ovejas y el Factor de Crecimiento similar a la insulina tipo 2 (*IGF2*) en el estado nutricional de la oveja. El objetivo de este estudio fue evaluar la CC en respuesta al desarrollo folicular (DF), estro, gestación, fecundidad, prolificidad, niveles de progesterona (P4) y regulación génica de los exones 5 y 10 del *IGF2* en 39 ovejas Suffolk con 3.3 ± 2.7 años de edad y 55.5 ± 9.8 kg de peso. El diseño experimental fue completamente al azar. La CC de las ovejas se mantuvo entre 1.5 a 2.5 (n= 19, CC baja-CCB) y 3.0 a 4.0 (n= 20, CC alta-CCA). El DF se observó desde 48 h antes, hasta 12 h después del retiro del CIDR, en intervalos de 12 h entre mediciones. El estro, se sincronizó con CIDR durante nueve días y en el día 7 se aplicaron eCG y PgF 2α . Las ovejas en estro se inseminaron artificialmente vía intrauterina (IAI), y después se observó retorno a estro durante 34 d. El diagnóstico de gestación se realizó 45 d después de la IAI. Las concentraciones plasmáticas de P4 se midieron el día 0, 15, 17, 19 y 21 después de la IAI. La regulación génica del *IGF2* se analizó por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Las ovejas con CCA tuvieron mayor número de folículos >6mm, a las 12 h después del retiro de CIDR ($p \leq 0.05$) y menor porcentaje de retorno al día 34 post-IAI. No hubo diferencias en los niveles de P4, tiempo a estro, incidencia de estro, gestación, fecundidad y prolificidad entre CCA y CCB ($p > 0.05$) y todas las ovejas presentaron el *IGF2*.

Palabras clave: desarrollo folicular, progesterona, gestación, mutaciones, PCR.

INFLUENCE OF BODY CONDITION ON REPRODUCTIVE RESPONSE AND GENE REGULATION OF IGF2 IN SUFFOLK SHEEP

2.2. ABSTRACT

Body condition (CC) influences the ovarian response of sheep and Insulin-like Growth Factor 2 (IGF2) influences the nutritional status of the sheep. The objective of this study was to evaluate CC in response to follicular development (FD), estrus, pregnancy, fecundity, prolificacy, progesterone levels (P4) and gene regulation of exons 5 and 10 of IGF2 in 39 Suffolk sheep with 3.3 ± 2.7 years old and 55.5 ± 9.8 kg body weight. The experimental design was completely randomized. The sheep CC was maintained between 1.5 to 2.5 (n = 19, low CC-BCC) and 3.0 to 4.0 (n = 20, high CC-ACC). FD was observed from 48 h before, until 12 h after removal of the CIDR, at 12 h intervals between measurements. The estrus was synchronized with CIDR for nine days, on day 7 eCG and PgF2 α were applied. Ewes in estrus were artificially inseminated via intrauterine (IAI), then return to estrus was observed for 34 d. The pregnancy diagnosis was made 45 d after IAI. Plasma P4 concentrations were measured on days 0, 15, 17, 19, and 21 after IAI. The gene regulation of IGF2 was analyzed by means of Polymerase Chain Reaction (PCR). Ewes with CCA had a higher number of follicles > 6mm, at 12 h after CIDR removal ($p \leq 0.05$) and a lower percentage of return at day 34 post-IAI. There were no differences in P4 levels, time to estrus, incidence of estrus, pregnancy, fertility and prolificacy between CCA and CCB ($p > 0.05$) and all ewes presented IGF2.

Key words: follicular development, progesterone, gestation, mutations, PCR

2.3. INTRODUCCIÓN

La reproducción en las ovejas es estacional, lo cual se relaciona con el balance energético de la dieta (Clarke, 2014), ya que requieren cantidades de nutrientes y energía acorde a sus necesidades y, de no ser así, puede influenciar de manera negativa sus procesos reproductivos (Doyle *et al.*, 2019). El desarrollo folicular, la tasa ovulatoria y la transcripción de los Factores de Crecimiento similares a la insulina tipo 1 y 2 (*IGF1* e *IGF2*), pueden ser afectados por el estado nutricional de la oveja (De la Isla *et al.*, 2010; Gebert *et al.*, 2006), lo cual disminuye el número y tamaño de folículos preovulatorios (Viñoles *et al.*, 2005). Una manera de evaluar el estado nutricional de las ovejas (proporción de grasa y músculo) es mediante la puntuación de condición corporal (CC; Phythian *et al.*, 2012), en una escala del 1 al 5 (Thompson y Meyer, 1994). Un puntaje de CC de 2.5 a 3.5 al momento del empadre se considera óptimo (Maurya *et al.*, 2009; Kenyon *et al.*, 2014), para obtener una tasa mayor de concepción y número de corderos nacidos por temporada reproductiva (Vatankhah *et al.*, 2012).

Según Fukui *et al.* (2010), una CC >3.0 tiende a mantener una fertilidad de 60 % durante la época no reproductiva. Sin embargo, el estado nutricional deficiente en combinación con factores endocrinos, ambientales, enfermedades y genéticos, son causa de muertes embrionarias (Vanroose *et al.*, 2000) entre 20 y 40 % de las gestaciones y de éstas, dos terceras partes ocurren durante la implantación lo que causa bajas tasas de fertilidad (Bach, 2019). El crecimiento y preparación del ovocito para ovular ocurre cuando el balance energético de la oveja es negativo y la maduración final del mismo y su ovulación ocurren cuando se reanuda el balance energético positivo. Después, el crecimiento fetal dependerá del suministro placentario de nutrientes, el cual está determinado por la capacidad de la oveja para adquirir nutrientes y de la placenta para transferir nutrientes al embrión (Sferruzzi-Perri *et al.*, 2008).

Algunos genes involucrados con supervivencia embrionaria son *IGF1* (Meiyu *et al.*, 2011) e *IGF2* (Constancia *et al.*, 2002), los cuales influyen en el crecimiento y diferenciación celular, acción mitogénica (Hua *et al.*, 2013), desarrollo fetal y de la

placenta (Constancia *et al.*, 2002). Gebert *et al.* (2006) analizaron el efecto de la metilación del gen *IGF2* en espermatozoides, ovocitos y embriones, y encontraron que en el exón 10 de dicho gen se encuentran las islas de la metilación citosina guanina (CpGs) que determinan la expresión del gen *IGF2*. Estas islas de la metilación afectan el número y la calidad de espermatozoides y la tasa de maduración de ovocitos (Hua *et al.*, 2013), lo cual menoscaba el desarrollo, la sobrevivencia y la implantación del embrión (Gebert *et al.*, 2006). Por lo antes mencionado, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la condición corporal en la respuesta del desarrollo folicular, estro, gestación, fecundidad, prolificidad, niveles de progesterona (P4) y regulación génica de los exones 5 y 10 del *IGF2* con ovejas Suffolk en la época reproductiva.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación, ovejas y alimentación

El estudio se realizó en las instalaciones del módulo de ovinos y caprinos del departamento de Zootecnia, de la Universidad Autónoma Chapingo, municipio de Texcoco, Estado de México (19° 23' 40" N y 98° 39' 28" O) y altitud de 2250 msnm (INAFED, 2020). En esta investigación se utilizaron 39 hembras multíparas de la raza Suffolk, con 3.3 ± 2.7 años de edad en promedio y peso de 55.5 ± 9.8 kg. Los dos tratamientos se distribuyeron al azar entre las 39 ovejas: hembras con CC baja de 1.5 a 2.5 (n= 19, CCB), y hembras con condición corporal alta de 3.0 a 4.0 (n= 20, CCA), en la escala descrita por Thompson y Meyer (1994). La alimentación para las 39 ovejas durante los 90 d de la investigación fue a base de ensilado de maíz ($4 \text{ kg oveja}^{-1} \text{ día}^{-1}$) con 8.20 % de proteína cruda (PC), 65.73 % de fibra detergente neutra (FDN), 49.53 % de fibra detergente acida (FDA) y $2.49 \text{ Mcal kg}^{-1}$ de energía metabolizable (EM). Además, cada oveja del tratamiento CCA recibieron 400 g de alimento concentrado con 13.25 % PC, 35.31 % FDN, 8.33 % FDA y $2.65 \text{ Mcal kg}^{-1}$ EM. La alimentación ofrecida fue de acuerdo al tipo de CC deseada de los tratamientos, para mantener constante su condición. La investigación comprendió cuatro etapas: adaptación, sincronización, empadre y postempadre (Figura 1).

Presincronización y sincronización del estro

Una presincronización se realizó mediante la aplicación de dos dosis con 5 mg dosis⁻¹ oveja⁻¹ de prostaglandinas 2 α (PgF2 α ; Lutalyse, Zoetis, Michigan, USA), en los días -18 y -7 previos a la sincronización, con el objetivo de homogenizar la respuesta ovárica. Después se colocó (Día 0) un dispositivo intravaginal impregnado con 0.3 g de progesterona (CIDR, Pfizer, Hamilton, New Zeland) durante 9 d. En el séptimo día se aplicaron 350 U.I. de Gonadotropina Coriónica equina (eCG; Folligon, Intervet, USA) y 5 mg de PgF2 α . La detección del estro inició a las 12 h después de retirado el CIDR y después cada cuatro horas hasta la manifestación externa de estro, con la utilización de carneros celadores provistos de un mandil para evitar la cópula. Las ovejas que manifestaron signos de estro, fueron aisladas y privadas de cualquier alimento y agua durante 12 h previas a la IAI (Figura 1).

Evaluación del desarrollo folicular

De manera aleatoria se seleccionaron seis ovejas de cada tratamiento para evaluar el desarrollo folicular, mediante un equipo de ultrasonografía transrectal (DP-10Vet, Mindray, China), a partir de 48 h antes y hasta 12 h posteriores al retiro del CIDR, con intervalos de 12 h entre cada medición. El número y tamaño de folículos presentes se determinó en la superficie del ovario, y los folículos clasificaron en pequeños 2.0-3.9 mm, medianos 4.0-5.9 mm y grandes > 6.0 mm (Evans *et al.*, 2000).

Inseminación artificial intrauterina (IAI), estro y retorno a estro

El semen utilizado era fresco, diluido en pajillas de 0.25 mL (60 x 10⁶ células mL⁻¹) y una pajilla por oveja. El retorno a estro se detectó inmediatamente después de la IAI por 35 días posteriores, dos veces día⁻¹ durante 30 min, utilizando machos celadores provistos con mandil (Figura 1).

Gestación, fecundidad y prolificidad

En el día 45 posterior a la IAI, se realizó el diagnóstico de gestación por ecografía ventral, con un ecógrafo portátil (4Vet mini, DRAMINSKI, Poland) y transductor de 4.0-

9.0 MHz. La tasa de fecundidad se determinó mediante el conteo de corderos nacidos, respecto al número total de ovejas inseminadas por tratamiento. Y el porcentaje de prolificidad se determinó mediante el total de corderos nacidos, respecto al número de ovejas paridas.

Análisis de progesterona

Las muestras sanguíneas se tomaron en los días 0, 15, 17, 19 y 21 después de la IAI (Figura 2.1), en tubos estériles de 5 mL (BD Vacutainer, NJ, USA), se centrifugaron a 693 x g (Thermo Scientific CL10, Massachusetts, USA) durante 15 min para separar el suero y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis posterior. Las muestras serológicas se analizaron en el Laboratorio Reproducción-Endocrinología de la UNAM-FMVZ, Ciudad de México, mediante kits para radioinmunoanálisis en fase sólida (Coat-A-Count Progesterone®, Siemens, CA, USA), con una sensibilidad de análisis de 1.10 ±0.51 y 5.57 ±1.89 ng mL⁻¹, con un coeficiente de variación entre pruebas de 4.81 y 4.37 %, respectivamente.

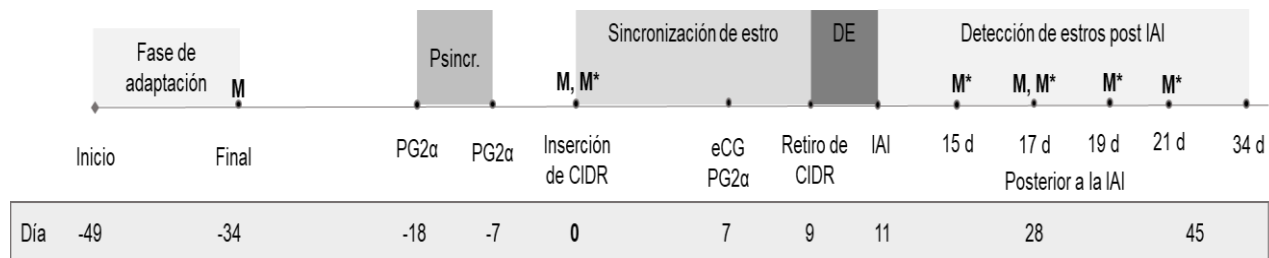


Figura 4. Esquema de la fase de adaptación, sincronización del estro y toma de muestras sanguíneas para determinar niveles de P4 e *IGF2*. (Psincr.= Presincronización; DE= detección de estros; IAI= inseminación artificial intrauterina; M= muestreos análisis moleculares; M*= muestreos análisis progesterona).

Análisis de la regulación del gen *IGF2*

Las muestras sanguíneas se tomaron al día -34 con respecto al día 0 (inserción del CIDR), a celo detectado después de la sincronización del estro y al día 17 post IAI (Figura 1), mediante la punción de la vena yugular con jeringas de 3 mL, bajo los criterios de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999; SAGARPA, 2001) sobre

especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio, en concordancia con las regulaciones para el uso y cuidado de animales de investigación, aprobadas por el Consejo General Académico de Colegio de Postgraduados, México (Colpos, 2016). De la sangre recolectada, se colocaron 0.5 mL en tarjetas de Tecnología Asociada Flinders o por sus siglas en inglés FTA Whatman (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) y se secaron 30 min y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su análisis. En la purificación del DNA, se utilizó 1 mm² de la muestra contenida en las tarjetas FTA, la cual se introdujo en un tubo para Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se adicionaron 100 µL de reactivo purificante Whatman FTA durante 8 min y el reactivo se desechó mediante decantación. Este paso se realizó tres veces con el objetivo de purificar los ácidos nucleicos almacenados en las tarjetas FTA. Después se agregaron 200 µL del amortiguador Tris (hidroximetil aminometano)-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) a temperatura ambiente durante 5 min, y se desechó el amortiguador. Este paso se repitió dos veces.

Amplificación del gen *IGF2*

Los exones 5 y 10 del gen *IGF2* se amplificaron mediante la PCR. La mezcla de reacción para la PCR se preparó en un volumen final de 12.5 µL, con 6.25 µL de mezcla maestra de reacción para PCR (Master Mix 2X; Promega© Madison, WI, USA), 0.625 µL de cada oligonucleótido diseñado (µM; IDT®, Illinois, USA; *IGF2*, exón 5: For-5´-AGATGGTTTCCCCAGACCCT; Rev-5´-GGTGCGGAACGTGGAGAG, número de acceso AH005355.3; y para el exón 10: For-5´-CAGCCCCTGACTCACTCTTC-3´ y Rev-5´-GGGCTGATTGAGGGGTTTAT-3´, número de acceso AH005355.3) y 5 µL de dihidrato de trehalosa al 10 % (en agua libre de nucleasas y proteasas (Merck© KGaA 64271, Darmstadt, Alemania). Los tubos con el fragmento de la tarjeta procesada y la mezcla de reacción (ya homogenizada), se colocaron en un termociclador (Bio Rad® C1000 Touch Thermal Cycler; Hercules, California).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: *IGF2*, exón 5: desnaturalización inicial de un ciclo a 95 °C, 4 min, más 34 ciclos (desnaturalización

95 °C, 1 min; alineamiento a 64 °C, 1 min y extensión a 72 °C, 2 min) y extensión final, un ciclo a 72 °C, 10 min; y exón 10: desnaturalización inicial de un ciclo a 95 °C, 4 min, más 35 ciclos (desnaturalización a 95 °C, 1 min; alineamiento a 62 °C, 1 min y extensión a 72 °C, 2 min) y extensión final un ciclo a 72 °C, 10 min. La calidad y el tamaño de los fragmentos amplificados se verificó para cada exón por electroforesis en geles de agarosa al 1.0 % con solución amortiguadora Tris-Acetic Acid-EDTA (TAE 1X, Merck© KGaA 64271, Darmstadt, Alemania), GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, SFO Bay Area, USA), amortiguador de carga Loading Dye 6x y marcador molecular GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific, Carlsbad, California, USA). La visualización de los fragmentos se realizó con un transiluminador con luz UV (Chemi-Smart 3000, VILBER Lourmat, France) y el software INFINITY.

Secuenciación y análisis bioestadístico de secuencias

Los amplicones obtenidos de los exones 5 y 10 del gen *IGF2* se enviaron a la empresa MacroGen (Seúl, Corea del Sur), para su limpieza y secuenciación. Una vez obtenidas las secuencias de los exones 5 y 10 de dicho gen, se realizó una búsqueda en Nucleotide BLAST del NCBI y se seleccionaron aquellas que tenían mayor similitud con las de nuestro estudio, y para los exones 5 y 10 fue AH005355.3. Con las secuencias de cada exón y las secuencias similares, se analizó la calidad de las secuencias y se realizó un alineamiento con el algoritmo MUSCLE® (versión 2020.2.4, Edgar, 2004) en el programa Geneious®, para determinar el grado de similitud y detectar posibles polimorfismos.

Análisis estadístico

El número de folículos pequeños, medianos y grandes se analizó con un modelo completamente al azar y PROC GLM. La prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$) se realizó para medias de los tratamientos. Las variables incidencia de estro (IE), retorno al estro (RE), gestación, ovulación y presencia o ausencia de los exones 5 y 10 del gen *IGF2*, se analizaron mediante regresión logística con el procedimiento Logistic. La variable tiempo a inicio de estro (TE) se analizó con el método estadístico curvas de sobrevivencia Log-Rank, mediante el procedimiento Life Test; la prueba de

comparación de medias para los análisis se realizó con la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$). Para fecundidad, prolificidad y niveles de P4 se utilizó el modelo estadístico de regresión Poisson, con el procedimiento de GENMOD y el método de Bonferroni para efectuar la comparación entre los tratamientos. En todos los análisis se utilizó SAS (versión 9.4, Institute Inc., Cary, NC). En cada uno de los modelos estadísticos usados se comprobó que no existiera efecto del peso y edad de las ovejas en todas las variables de estudio.

2.5. RESULTADOS

Desarrollo folicular

No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) en el número de folículos pequeños (2-3.9 mm) y medianos (4.0-5.9 mm) entre tratamientos durante las mediciones. Sin embargo, las ovejas del grupo CCA tuvieron mayor número de folículos grandes (> 6.0 mm) a las 12 h después de retirar el CIDR, con diferencias significativas ($p\leq 0.05$) entre tratamientos (Figura 2).

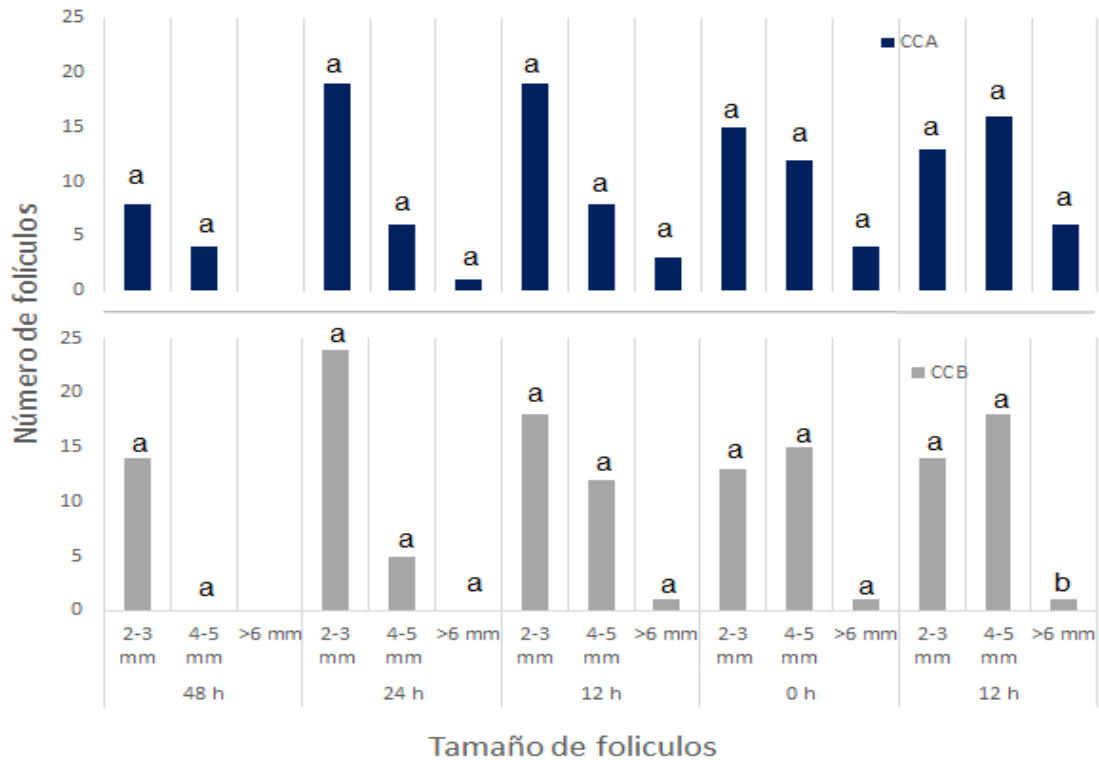


Figura 5. Promedio de folículos pequeños, medianos y grandes. Barras por columna con diferente literal son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Incidencia y tiempo al inicio del estro

Las ovejas de los tratamientos CCB y CCA mostraron en promedio signos de estro a las 29.6 y 22.7 h, respectivamente, después de retirado el CIDR, sin diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$; Figura 3). El porcentaje de ovejas que mostraron signos de estro con el protocolo de sincronización en los tratamientos CCB y CCA fue de 68.42 % y 75 %, respectivamente, sin diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$). El tratamiento CCA tuvo mayor cantidad de folículos >6 mm a las 12 h después de retirado el CIDR con respecto al tratamiento CCB ($p \leq 0.05$; Figura 2). Hubo efecto de la edad ($p = 0.0429$) en la incidencia de estro, con mayor porcentaje de incidencia de estro en las ovejas de 4 ± 2.6 años del CCA en comparación con las ovejas del CCB con 3.5 ± 3.5 años de edad, pero no del peso ($p = 0.0753$) de las ovejas.

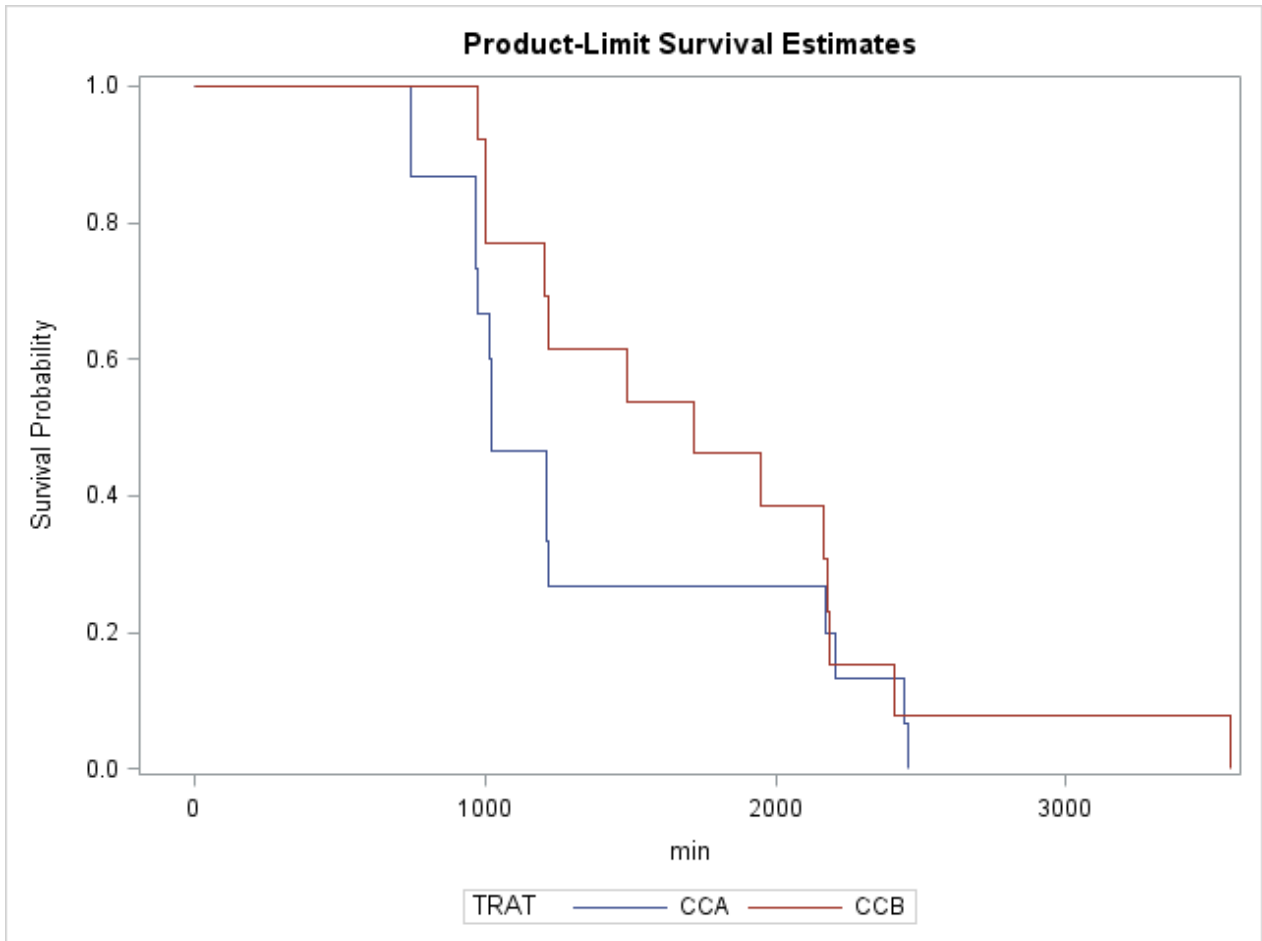


Figura 6. Curva de supervivencia para el inicio del estro en ovejas Suffolk con CCA y CCB. Long Rank ($p=0.3417$).

Retorno a estro

La cantidad de ovejas que retornaron a estro (RE) después de la inseminación fue similar entre tratamientos durante los primeros 17 días ($p>0.05$; Cuadro 1), sin efecto de las covariables edad ($p=0.7060$) y peso ($p=0.4711$). Sin embargo, para el día 34 post IA existió una diferencia significativa en el retorno a estro entre tratamientos ($p\leq 0.05$; Cuadro 1), sin efecto de las covariables edad ($p=0.6511$) y peso ($p=0.7399$).

Porcentaje de gestación

No se observaron diferencias en el porcentaje de hembras gestantes del tratamiento CCA en comparación con las ovejas del tratamiento CCB ($p>0.05$, Cuadro 1). No hubo

efecto de las covariables edad ($p=0.5802$) y la del peso ($p=0.5651$) en los resultados de la variable porcentaje de gestación.

Cuadro 7. Porcentajes de retorno a estro y gestación.

Tratamiento	n	RE	RE	Gestación %
		17 días %	34 días %	
CCB	19	36.84 ^a	25.0 ^a	31.58 ^a
CCA	20	50.0 ^a	0.0 ^b	45.0 ^a

Columnas con diferente literal son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Prolificidad y fecundidad

En cuanto a la variable prolificidad se obtuvieron 1.3 corderos oveja parida⁻¹ en ambos tratamientos (CCB y CCA; $p > 0.05$), sin efecto de las covariables edad ($p = 0.8399$) y peso ($p = 0.6044$) en prolificidad. Respecto a fecundidad, se obtuvo una diferencia de 0.08 corderos entre tratamientos (CCB: 0.42 vs. CCA: 0.50), pero no fue significativa entre tratamientos ($p > 0.05$) y sin efecto de las covariables edad ($p = 0.7738$) y peso ($p = 0.4933$) en fecundidad.

Niveles de progesterona y ovulación

No hubo diferencias significativas entre tratamientos en las diferentes etapas de la medición de niveles de progesterona sérica y ovulación ($p > 0.05$; Cuadro 2).

Cuadro 8. Promedio de niveles séricos de progesterona en las ovejas Suffolk

Trat	% ov	Día 0 (IAI)	15 post IAI	17 post IAI	19 post IAI	21 post IAI
		ng/mL				
CCB	87.5 _a	3.12±2.88 ^a	6.86±5.09 ^a	5.68±6.33 ^a	5.41±5.17 ^a	4.41±5.21 _a

CCA	86.7 _a	2.12±2.33 ^a	4.80±3.55 ^a	4.39±4.19 ^a	4.60±3.60 ^a	4.90±2.59 _a
-----	-------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------

Trat= tratamiento; ov= ovulación.

Identificación de los exones 5 y 10 del gen IGF2 y sus polimorfismos

En todas las ovejas de ambos tratamientos se encontraron los exones 5 (290 pb; Figura 4, inciso a) y 10 (576 pb; Figura 4, inciso b) del gen *IGF2*, sin encontrar algún polimorfismo evidente en las secuencias analizadas en ambos exones de dicho gen (Figura 5).

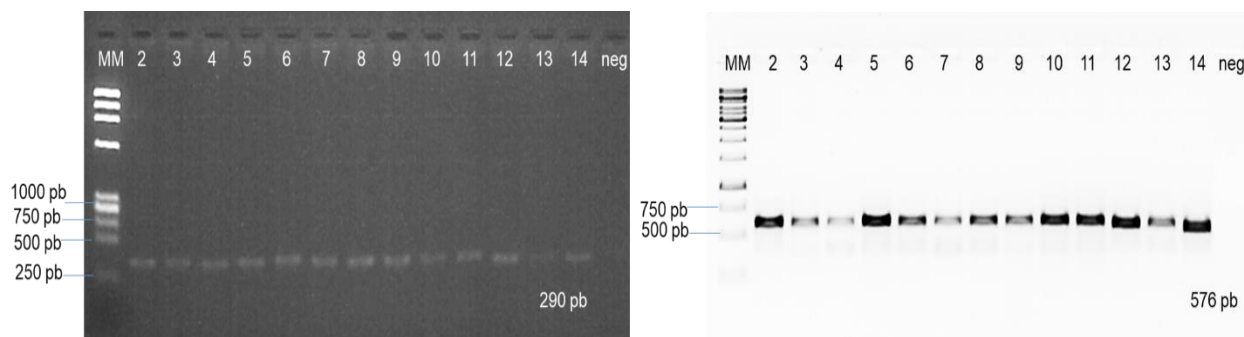


Figura 7. Amplificación del exón 5 (a; 290 pb), carril MM (1): marcador molecular, carriles 2 al 14: muestras amplificadas (290 pb) y carril neg (15)= testigo negativo, y exón 10 (b; 576 pb), carril MM (1): marcador molecular, carriles 2 al 14: muestras amplificadas (576 pb) y carril neg (15)= testigo negativo del gen *IGF2*.

Las secuencias de los exones 5 y 10 del gen *IGF2* (Figura 5) de este estudio tuvieron un 99.4 % y 99.9–100 % de similitud con las secuencias AH005355.3 y AH005355.3, respectivamente; provenientes Estados Unidos.

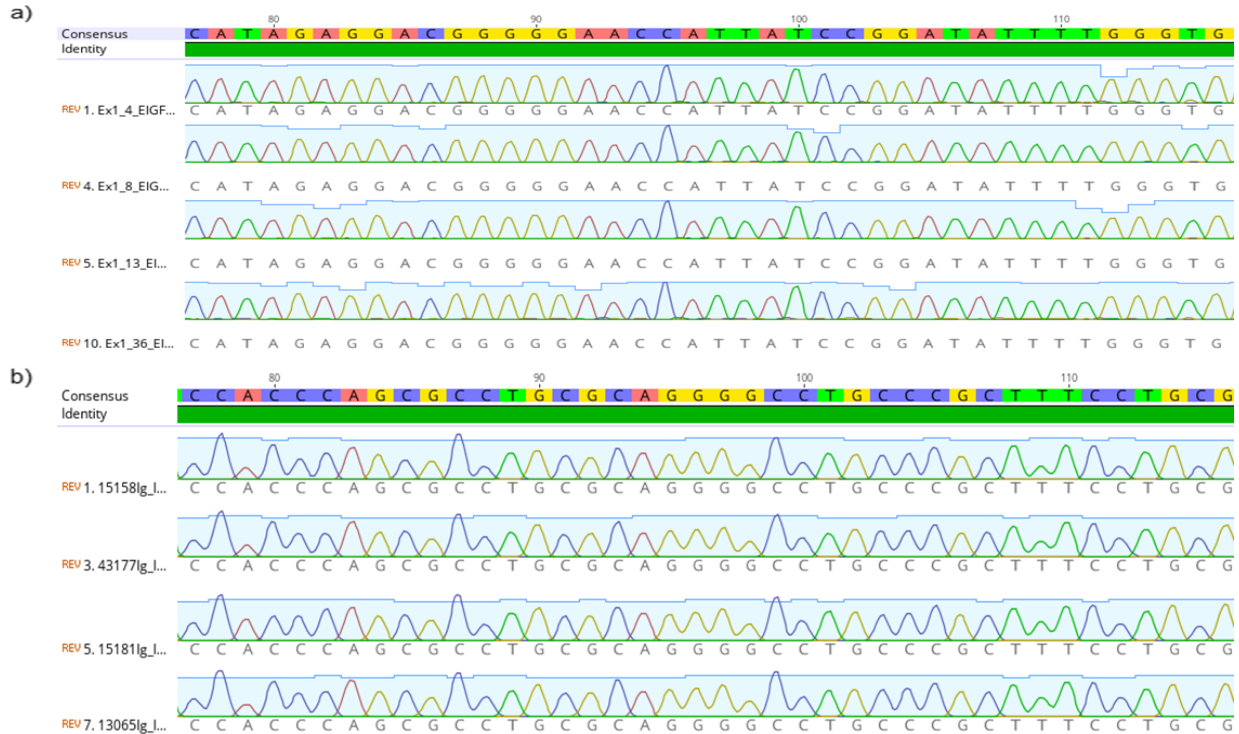


Figura 8. Alineación de secuencias de los exones 5 y 10 del gen *IGF2* (tamaño del producto; a: 290pb y b: 576 pb).

2.6. DISCUSIÓN

De la Isla *et al.* (2010) demostraron que durante el periodo de agosto-noviembre, ovejas Pelibuey con CC alta (3.2 ± 0.3) tuvieron mayor número de folículos >4 mm y tasa de ovulación (1.8 ± 0.14), en comparación con ovejas de CC baja (2.1 ± 0.3 ; tasa de ovulación de 1.3 ± 0.15). Este resultado concuerda con lo reportado en el presente estudio con ovejas Suffolk, en el mayor número de folículos grandes (> 6.0 mm) en el tratamiento CCA en comparación con el tratamiento CCB. En ovejas de raza Hu consideradas prolíficas (Luna y Alonso, 2014), con condición corporal de 2.58 ± 0.05 , se demostró que un suplemento a corto plazo (durante 6 d) con 1560 g adicionales a una dieta de mantenimiento (1040 g; $PC=67.20$ g d^{-1} en materia seca) aumentó el número de folículos ≥ 3.5 mm, en comparación con ovejas alimentadas con una dieta de mantenimiento (Ying *et al.*, 2011), resultado similar al obtenido en el presente estudio, ya que las ovejas CCA tuvieron mayor número de folículos >6 mm y su dieta se complementó con 400 g de concentrado ($PC = 98$ g d^{-1}). En otro estudio realizado

en ovejas de raza aragonesa con una alimentación deficiente de nutrimentos, tuvieron un mayor número de folículos ≥ 6 mm a las 48 h previas a la manifestación de estro; sin embargo, el tamaño de folículos aumentó durante la fase folicular ($p \leq 0.01$) en ovejas alimentadas con 100 % de los requerimientos de mantenimiento (Sosa *et al.*, 2010). Este último resultado es parecido a los del presente estudio, pues las ovejas con CCA tuvieron un mayor número de folículos > 6 mm 12 h después de retirado el CIDR de sincronización de estro, y se infiere que el estado nutricional de las ovejas con CCA fue mejor que el de las CCB.

Los resultados para incidencia al estro del presente estudio difieren a lo reportado por Alhamada *et al.* (2017) en ovejas de raza Merino, donde todas las ovejas con diferente CC (rango de 1.33 ± 0.4 a 2.33 ± 0.2) manifestaron signos de estro; además, Ruiz *et al.* (2015) observaron en ovejas Suffolk una incidencia de estro del 98% para ovejas con $CC = 2.30 \pm 0.1$ y 100 % de estro para las ovejas con $CC = 2.50 \pm 0.1$. Durante la fase folicular del estro, las concentraciones de P4 son basales a causa de la destrucción del cuerpo lúteo por efecto de la secreción de $PgF2\alpha$ (Lüttgenau *et al.*, 2011), mientras que en las células de la granulosa del folículo aumenta la secreción de estradiol, con estímulo directo en las neuronas productoras de GnRH/LH, induce el pico preovulatorio, ovulación y manifestación externa de estro (Viñoles *et al.*, 2005). Ovejas con CC entre 2.25 a 2.75 incrementan su tasa ovulatoria; sin embargo, en ovejas fuera de este rango existe una relación negativa entre CC y tasa ovulatoria (Kenyon *et al.*, 2014). Esos resultados no concuerdan con los del presente estudio, ya que no existió diferencias ($p > 0.05$) en el número de ovejas que ovularon entre los tratamientos CCA y CCB. Thompson y Meyer (1994) mencionan que el puntaje de CC óptimo en época de empadre debe ser superior a 2.5; esta puntuación concuerda con la clasificación de las ovejas dentro del tratamiento CCA.

Zhang *et al.* (2018) mencionan que el ofrecer una dieta con bajos niveles energéticos durante la fase de desarrollo embrionario, aumenta la secreción de $PgF2\alpha$ y baja la producción de progesterona, lo cual provoca una luteólisis y como consecuencia, muertes embrionarias tempranas y tardías y retorno a nuevos ciclos estrales. También, el bajo peso y la baja CC después de la inseminación incrementa las pérdidas

embrionarias tardías (60 d después de la inseminación), las cuales suceden entre 1 y 5 % menos que durante la etapa de gestación temprana (Viñoles *et al.* 2012), en los resultados de este estudio, no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos. Fernández-Foren *et al.* (2019) reportaron que ovejas con CC >2.75 tuvieron mayores concentraciones de P4 plasmática que las ovejas con CC <2.25 (3.56 ± 0.36 vs 2.28 ± 0.35 ng mL⁻¹, respectivamente; $p \leq 0.05$). Estos resultados difieren con los del presente estudio, en el cual no hubo diferencias significativas entre tratamientos. De igual manera, esos autores mencionan que algunos moduladores esenciales de la fisiología del útero para una buena implantación del embrión son las hormonas esteroidales, y cualquier cambio en la capacidad el útero para responder a estas conlleva a problemas en la implantación embrionaria. Existe evidencia de que las ovejas con subnutrición tienen baja sensibilidad a hormonas esteroidales, bajos niveles de P4 y sus receptores en endometrio, lo cual ocasiona un ambiente uterino no apto para el desarrollo exitoso de una gestación (Sosa *et al.*, 2009). Esto podría explicar el retorno a estro y porcentaje de gestación en las ovejas del tratamiento CCB, con respecto a las ovejas del tratamiento CCA, aunque no hubo diferencias significativas entre tratamientos.

En relación con estos resultados, Kenyon *et al.* (2014) mencionan un efecto de la CC en la tasa de retorno posterior al servicio y que existe un mínimo y un máximo de CC; al pasar esos límites, la tasa de retorno disminuye, pero puede haber diferencias entre razas. Así, la fertilidad de las ovejas está influenciada tanto por los carneros usados para la IA (momento de la IA, dosis, concentración y calidad del semen usado), como por las hembras (tipo y tiempo de duración del tratamiento utilizado para la inducción o sincronización de estro, temporada reproductiva, CC, estado fisiológico y edad) (Fukui *et al.*, 2010). El resultado obtenido en el presente estudio confirma lo reportado por Vatankhah *et al.* (2012), quienes indican que ovejas con una puntuación entre 3.0 y 3.5 en CC durante el apareamiento tuvieron una tasa de concepción de 0.96 ± 0.02 y 0.97 ± 0.03 , respectivamente. Además, las ovejas con baja CC tienen una disminución en los niveles de IGF (Clarke *et al.*, 2014), lo que ocasiona un aumento en los niveles de la hormona de crecimiento (GH) y una reducción en la secreción de GnRH (Mondal *et al.*, 2017), lo cual afecta la secreción pulsátil de la hormona luteinizante (LH)

preovulatoria y, por consecuencia, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Maurya *et al.*, 2009).

La fecundidad reportada en este estudio concuerda con lo reportado por Vatankhah *et al.* (2012), quienes mencionan que con una CC de 3.5 se obtienen tasas de fecundidad de 1.19 ± 0.05 , 0.36 mayor respecto al presente estudio, en comparación con ovejas de CC menor (1 y 2; 0.34 ± 0.09 y 0.77 ± 0.03 , respectivamente) y mayor número de corderos nacidos por oveja expuesta al carnero. Sin embargo, según esos autores, con CC menores o mayores a 3.0-3.5 al momento del apareamiento hay un efecto negativo en el porcentaje de gestación y en el número de corderos nacidos. Sin embargo, el resultado favorable obtenido en prolificidad y fecundidad en el presente estudio, se pudo deber al protocolo de sincronización y la combinación de P4-eCG, lo cual pudo promover el crecimiento de los folículos, ya que eCG tienen actividad de FSH y LH y posterior ovulación, y se obtuvo un resultado similar en los tratamientos CCA y CCB. Esto concuerda con lo reportado por Olivera-Munzante *et al.* (2019) en ovejas Merino, al utilizar protocolos con P4-eCG, con y sin suplemento proteica al día -10 y -3 previos a la IA y una CC en promedio de 2.9 ± 0.2 , con lo cual se obtuvo una prolificidad de 1.24 ± 0.44 y 1.37 ± 0.49 , respectivamente; y en fecundidad hubo una diferencia de 0.26 entre las ovejas de P4-eCG + suplemento (0.81) y ovejas sincronizadas solo con P4-eCG (0.55); una diferencia mayor comparada con el 0.08 obtenido en fecundidad entre las ovejas con CCA (0.50) y CCB (0.42) en el presente estudio.

Durante la fase de selección del desarrollo folicular, la expresión de *IGF2* está restringida a células de la teca en folículos antrales para estimular la esteroidogénesis (Webb *et al.*, 2007) y también hay efecto folicular en las fases de reclutamiento y dominancia, mediante procesos endocrinos, autocrinos y paracrinos (Stinckens *et al.*, 2010), para aumentar el crecimiento de las células de la granulosa dentro de los folículos ováricos, aunado a la sinergia con FSH, lo que beneficia la maduración de los ovocitos y aumenta la producción de progesterona (Spicer and Aad, 2007). Antes no había registro de la presencia e influencia de *IGF2* en embriones preimplantación; sin embargo, Wang *et al.* (2009) aseguran que la presencia de *IGF2* en el líquido

folicular, tiene influencia positiva en la maduración y desarrollo temprano del embrión en etapa de blastocisto, para aumentar el número de células de blastocisto (Ibrahim *et al.*, 2015), regular la proliferación y la diferenciación (mediante la transformación de células cónicas ectoplacentales en células gigantes de trofoblasto), la fusión e invasión del trofoblasto, el cual provee nutrientes al embrión (glucosa y aminoácidos), la implantación, la vascularización (Sferruzzi-Perri *et al.*, 2008), la producción de IFN γ (Sequeira *et al.*, 2016), la función placentaria, el crecimiento fetal (Gibson *et al.*, 2017) y la diferenciación de tejidos (Gebert *et al.*, 2006).

El gen *IGF2* se expresa de manera amplia por el embrión y favorece un desarrollo embrionario normal (Meiyu *et al.*, 2011); además, tiene influencia principal en dos etapas: la primera se asocia con el desarrollo, regulando genéticamente el número de células madre determinadas, y la segunda se asocia con el crecimiento, donde se establecen los límites del tamaño de los órganos (Burns and Bassim, 2001). En ovejas, la expresión de *IGF2* en el endometrio durante el desarrollo temprano de la gestación, en especial al día 19 de gestación, es influenciada por el tipo de raza y el embrión (Sequeira *et al.*, 2016). Aunque no existieron mutaciones de un solo nucleótido en las secuencias de los exones 5 y 10 del gen *IGF2* en las ovejas Suffolk con CC divergentes, Wei *et al.* (2020) reportaron que el desarrollo embrionario es un proceso expuesto a la plasticidad y es sensible a factores como el medio ambiente en especial la nutrición. La epigenética es un factor importante para tomar en cuenta al explicar los resultados obtenidos en la presente investigación, donde todas las ovejas presentaron ambos exones de dicho gen, ya que se enfoca en el estudio de la maquinaria molecular alrededor del código genético, la cual regula su transcripción sin alterar la secuencia de nucleótidos (Cordero *et al.*, 2015), y tiene un efecto en los procesos biológicos y productivos de la oveja.

2.7. CONCLUSIONES

La CC no afectó el tiempo a estro, incidencia de estro, gestación, fecundidad, prolificidad, niveles plasmáticos de P4; además, no afectó la regulación génica ni la secuencia de los exones 5 y 10 del gen *IGF2*. Sin embargo, la CCA aumentó el número

de folículos >6mm a las 12 h después de retirar el dispositivo intravaginal con progestágenos y la CCB aumentó el porcentaje de retornos al día 34 después de la IAI, en la época reproductiva con ovejas Suffolk.

2.8. AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento de la beca otorgada a la primera autora, en la realización de los estudios de nivel doctorado en el Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad - Ganadería en el Colegio de Postgraduados, Montecillo. Así mismo, se agradece al departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo por el apoyo y las facilidades brindadas con el uso de los ovinos, al Colegio de Postgraduados por el financiamiento de la investigación, al M.C. Carlos Guillermo Germán Alarcón por el apoyo con la inseminación artificial intrauterina, al Dr. Said Cadena Villegas por el apoyo en las mediciones de desarrollo folicular y a la M.C. Susana Rojas Maya del Laboratorio Reproducción-Endocrinología de la UNAM-FMVZ, por el apoyo en el análisis de progesterona.

2.9. REFERENCIAS

- Alhamada, M., N. D., E. González-García, and F. Bocquier. 2017. Sexual behaviour in sheep is driven by body condition and the related nutritional and metabolic status. *Applied Animal Behaviour Science* 191 (junio): 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.02.004>.
- Bach, A. 2019. Effects of nutrition and genetics on fertility in dairy cows. *Reproduction, Fertility and Development* 31: 40–54. <https://doi.org/10.1071/RD18364>
- Burns, J. L., and A. H. Bassim. 2001. Cell survival and proliferation are modified by insulin-like growth factor 2 between days 9 and 10 of mouse gestation. *Development* 128: 3819-3830.
- Clarke, L. J. 2014. Interface between metabolic balance and reproduction in ruminants: Focus on the Hypothalamus and Pituitary. *Hormones and Behavior* 66 (1): 15-40. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.02.005>
- Constancia, M., M. Hemberger, J. Hughes, W. Dean, A. Ferguson-Smith and R. Fundele. 2002. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 417:945-948.
- Cordero, P., J. Li, J. A. Oben. 2015. Epigenetics of obesity: beyond the genome sequence. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 18: 361-366. <https://doi.org/10.1097/MCO.000000000000179>

- De la Isla, H., A. López, A. Ayala Burgos, y A. González-Bulnes. 2010. Efecto de la condición corporal y la época del año sobre el ciclo estral, estro, desarrollo folicular y tasa ovulatoria en ovejas Pelibuey mantenidas en condiciones de trópico. *Veterinaria México* 41:167–175.
- Doyle, D. N., P. Lonergan, M. G. Diskin, K. M. Pierce, A. K. Kelly, C. Stanton, A. A. Hennessy, S. M. Waters, M. H. Parr, and D. A. Kenny. 2019. Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation and post-insemination plane of nutrition on systemic concentrations of metabolic analytes, progesterone, hepatic gene expression and embryo development and survival in beef heifers. *Theriogenology*, 127, 102-113. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.037>
- Evans, A.C.O., P. Duffy, N. Hynes, y M. P. Boland. 2000. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 53 (3): 699-715. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00268-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00268-X)
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Fernandez-Foren, A., C. Sosa, J.A. Abecia, M.I. Vázquez, F. Forcada, A. Meikle. 2019. Dietary restriction in sheep: uterine functionality in ewes with different body reserves during early gestation. *Theriogenology* 135, 189-197. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.023>
- Fukui, Y., H. Kohno, K. Okabe, S. Katsuki, M. Yoshizawa, T. Togari, and H. Watanabe. 2010. Factors affecting the fertility of ewes after intrauterine insemination with frozen-thawed semen during the non-breeding season. *J. Reprod. Dev.* 56: 460-466. <https://doi.org/10.1262/jrd.10-015t>
- Gebert, C., C. Wrenzycki, D. Herrmann, D. Gröger, R. Reinhard, P. Hajkova, A. Lucas-Hahn, J. Carnwath, H. Lehrach and H. Niemann. 2006. The bovine *IGF2* gen is differentially methylated in oocyte and sperm DNA. *Genetics* 33: 222-229. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.03.011>
- Gibson, C., M. de Ruijter-Villani, and T.A.E. Stout. 2017. Negative uterine asynchrony retards early equine conceptus development and upregulation of placental imprinted genes. *Placenta* 57: 175e182. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.07.007>
- Hua, S., Y. Wang, H. Wu, F. Quan, H. Zhang, and Y. Zhang. 2013. Differences in DNA methylation and mRNA levels between the breeding and non-breeding seasons of in vitro produced IVF and SCNT sheep embryos. *Small Ruminant Research* 113: 390 – 397. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.04.005>
- Ibrahim, S., D. Salilew-Wondim, F. Rings, M. Hoelker, C. Neuhoff, E. Tholen, C. Looft, K. Schellander, and D. Tesfaye. 2015. Expression pattern of inflammatory response genes and their regulatory microRNAs in bovine oviductal cells in

- response to lipopolysaccharide: implication for early embryonic development. *PLoS ONE* 10(3): e0119388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119388>
- INAFED. 2020. Enciclopedia de los municipios y Delegaciones de México. Instituto nacional para el federalismo y desarrollo municipal del estado de México. Secretaría de Gobierno. México. <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/municipios/15099a.html>.
- Kenyon, Pr, Sk Maloney, y D. Blache. 2014. Review of sheep body condition score in relation to production characteristics. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 57 (1): 38-64. <https://doi.org/10.1080/00288233.2013.857698>
- Lüttgenau, J., N. Beindorff, S.E. Ulbrich, J.P. Kastelic, H. Bollwein. 2011. Low plasma progesterone concentrations are accompanied by reduced luteal blood flow and increased size of the dominant follicle in dairy cows. *Theriogenology* 76, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.025>
- Luna, C.P., R.A. Alonso. 2014. Genes con efecto mayor sobre la fertilidad de ovejas. Revisión. *Rev Mex Cienc Pecu* 5(1):107-130.
- Maurya, V.P., S. Kumar, D. Kumar, R. Gulyani, A. Joshi, S.M.K. Naqvi, A.L. Arora, and V.K. Singh. 2009. Effect of body condition score on reproductive performance of Chokla ewes. *Indian Journal of Animal Sciences*, 79(11), 1136-1138.
- Meiyu, Q.I., Z. Roth, and L. Di. 2011. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) in reproduction system of female bovine. *Journal of Northeast Agricultural University* 18 (4): 84-87. [https://doi.org/10.1016/S1006-8104\(12\)60030-0](https://doi.org/10.1016/S1006-8104(12)60030-0).
- Mondal, S., A. Mor, and I.J. Reddy. 2017. Factors/genes in maternal recognition of pregnancy: an overview. current developments in biotechnology and bioengineering. *Human and Animal Health Applications* 597-630. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63660-7.00023-1>
- Olivera-Muzante, J., S. Fierro, J.L. Alabart, M. Claramunt, M.A. Minteguiaga, G. Aunchayna, N. Errandonea, and G. Bancharo. 2019. Short-term dietary protein supplementation improves reproductive performance of estrous-synchronized ewes when there are long intervals of prostaglandin or progesterone-based treatments for timed AI. *Animal Reproduction Science* 206, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.05.011>
- Phythian, C.J., D. Hughes, E. Michalopoulou, P.J. Cripps, y J.S. Duncan. 2012. Reliability of body condition scoring of sheep for cross-farm assessments. *Small Ruminant Research* 104 (1-3): 156-62. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.10.001>
- Ruiz, A.J.L., L.F. Uribe-Velásquez, y J. H. Osorio. 2015. Factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1 (IGF-1) en la reproducción de la hembra bovina. *Vet. Zootec.* 5(2): 68-81.

- Sequeira, M., S.J. Pain, V. de Brun, A. Meikle, P.R. Kenyon, and H.T. Blair. 2016. Gestation-related gene expression and protein localization in endometrial tissue of Suffolk and Cheviot ewes at gestation day 19, after transfer of Suffolk or Cheviot embryos. *Theriogenology* 86: 1557 – 1565. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.015>
- Sferruzzi-Perri, A.N., J.A. Owens, P. Standen, and C.T. Roberts. 2008. Maternal insulin-like growth factor-ii promotes placental functional development via the type 2 igf receptor in the guinea pig. *Placenta* 29: 347 – 355. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.01.009>
- Sosa, C., A. Gonzalez-Bulnes, J.A. Abecia, F. Forcada, and A. Meikle. 2010. Short-term undernutrition affects final development of ovulatory follicles in sheep synchronized for ovulation. *Reprod Dom Anim* 45, 1033–1038. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01483.x>
- Sosa, C., Abecia J.A., Carriquiry M., Forcada F., Martin G.B., Palacin I., Meikle A. 2009. Early pregnancy alters the metabolic responses to restricted nutrition in sheep. *Domest Anim Endocrinol* 36(1):13e23. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2008.08.003>
- Spicer, L.J., P.Y. Aad. 2007. Insulin-Like Growth Factor (IGF) 2 stimulates steroidogenesis and mitosis of bovine granulosa cells through the igf1 receptor: role of follicle-stimulating hormone and *igf2* receptor. *Biology of reproduction* 77: 18–27. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.058230>
- Stinckens, A., P. Mathur, S. Janssens, V. Bruggeman, O.M. Onagbesan, M. Schroyen, G. Spincemaille, E. Decuypere, M. Georges, and N. Buys. 2010. Indirect effect of *IGF2* intron3 g.3072G>A mutation on prolificacy in sows. *Animal Genetics*, 41: 493 – 498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02040.x>
- Thompson, J, y H Meyer. 1994. Body condition scoring of sheep, 4. http://ir.library.oregonstate.edu/concern/administrative_report_or_publications/kk91fk644.
- Vanroose, G., A. de Kruif, and A. Van Soom. 2000. Embryonic mortality and embryo–pathogen interactions. *Anim. Reprod. Sci.* 60:131–143. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00098-1](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00098-1).
- Vatankhah, M., M.A. Talebi, y F. Zamani. 2012. Relationship between ewe body condition score (bcs) at mating and reproductive and productive traits in lori-bakhtiari sheep. *Small Ruminant Research* 106 (2-3): 105-9. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.02.004>
- Viñoles, C., M. Forsberg, G .B. Martin, C. Cajarville, J. Repetto, and A. Meikle. 2005. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction* 129, 299–309. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00536>.
- Viñoles, C., K.M.M. Glover, B.L. Paganoni, J.T.B. Milton, and G.B. Martin. 2012. Embryo losses in sheep during short-term nutritional supplementation.

Reproduction, Fertility and Development, 24, 1040–1047.
<http://dx.doi.org/10.1071/RD11281>

- Wang, L.M., H.L. Feng, Y.Zh. Ma, M. Cang, H.J. Li, Zh. Yan, P. Zhou, J.X. Wen, S. Bou, and D.J. Liu. 2009. Expression of IGF receptors and its ligands in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Animal Reproduction Science* 114: 99 – 108. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.09.019>.
- Webb, R., P. Garnsworthy, B. Campbell, and M. Hunter. 2007. Intraovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology* 68: 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.036>.
- Wei, Y., C. Han, S. Li, Y. Cui, Y. Bao, and W. Shi. 2020. *Cuscuta chinensis* flavonoids down-regulate the dna methylation of h19/*igf2* imprinted control region and estrogen receptor alpha promoter of testis in bisphenol a exposed mice offspring. *Food Funct.* 32 pp.
- Ying, S., Z. Wang, C. Wang, H. Nie, D. He, R. Jia, Y. Wu, Y. Wan, Z. Zhou, Y. Yan, Y. Zhang, and F. Wang. 2011. Effect of different levels of short-term feed intake on folliculogenesis and follicular fluid and plasma concentrations of lactate dehydrogenase, glucose, and hormones in Hu sheep during the luteal phase. *Reproduction* 142 699 – 710. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0229>.
- Zhang, Hao, Ling-wei Sun, Zi-yu Wang, Tie-wei Ma, Ming-tian Deng, Feng Wang, and Yan-li Zhang. 2018. Energy and protein requirements for maintenance of Hu sheep during pregnancy. *Journal of Integrative Agriculture* 17 (1): 173-83. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61691-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61691-5).

CAPÍTULO III. INFLUENCIA DE LA RESTRICCIÓN ALIMENTICIA EN LA REGULACIÓN DE *IGF1* Y FERTILIDAD DE OVEJAS SUFFOLK

3.1.RESUMEN

La nutrición tiene gran influencia en la eficiencia reproductiva de ovinos y existe evidencia de que el gen o Factor de Crecimiento similar a la insulina tipo 1 (*IGF1*) está relacionado con el estado metabólico del ovino y su eficiencia reproductiva. El objetivo de este estudio fue evaluar la influencia de la restricción alimenticia en la medición de niveles plasmáticos de *IGF1* e insulina, en la regulación del exón 3 del gen *IGF1*, incidencia de estro, retorno a estro y en la gestación en ovejas Suffolk sincronizadas en la época reproductiva. Dos dietas se proporcionaron a las ovejas durante 40 d: r-30 (70 % de sus requerimientos para mantenimiento), y R100 (100 % de los requerimientos con base en su estado fisiológico). El estro, previa presincronización con $PGF2\alpha$, se sincronizó con progestágenos durante 9 d, y en el día 7 se aplicó eCG y $PGF2\alpha$. La monta natural (MN) se realizó en las ovejas que manifestaron estro y después se observó retorno a estro durante 34 d. El diagnóstico de gestación se realizó a los 45 y 60 d después de la MN. Las concentraciones plasmáticas de insulina e *IGF1* se midieron durante la implantación y gestación temprana. La regulación génica del *IGF1* se analizó. Las ovejas con R100 tuvieron porcentaje de gestación más alto ($p\leq 0.05$) y mayores niveles plasmáticos de *IGF1* al día 34 post MN ($p\leq 0.05$). Ovejas con r-30 tuvieron niveles menores de insulina plasmática al día 23 post MN ($p\leq 0.05$). Todas las ovejas tuvieron presencia del gen *IGF1*. La restricción nutricional en ovejas Suffolk tuvo efecto negativo en el porcentaje de gestación y niveles plasmáticos de *IGF1* e insulina, pero no la regulación génica del exón 3 del *IGF1* ni la incidencia de estro y retorno a estro.

Palabras clave: mutaciones, NRC, gestación, PCR, alimentación.

INFLUENCE OF DIETARY RESTRICTION ON THE REGULATION OF IGF1 AND FERTILITY OF SUFFOLK SHEEP

3.2. ABSTRACT

Nutrition has a high influence on reproductive efficiency in sheep and there is evidence that the gene or insulin-like growth factor-1 (*IGF1*) is related to the metabolic state of the sheep and its reproductive efficiency. The objective of this study was to evaluate the influence of dietary restriction on the measurement of plasma levels of IGF1 and insulin, on the regulation of the exon 3 of the *IGF1* gene, on estrous incidence, on return to estrous and on gestation in Suffolk sheep synchronized in reproductive season. Two diets were given to the sheep for 40 d: r-30 (70 % of their maintenance requirements), and R100 (100 % of the requirements based on their physiological state). The estrus, previous presynchronization with PGF2 α , was synchronized with progestogens for 9 d, and on day 7 eCG and PGF2 α were applied. Natural mating (NM) was performed in sheep that manifested estrus; afterwards a return to estrus was observed for 34 d. The pregnancy diagnosis was made 45 and 60 days after (NM). Plasma concentrations of insulin and IGF1 were measured during implantation and early gestation. The gene regulation of *IGF1* was analyzed. Ewes with R100 had a higher % gestation ($p \leq 0.05$) and plasma levels of IGF1 increased at day 34 post NM ($p \leq 0.05$). Sheep with r-30 had lower levels of plasma insulin at day 23 post NM ($p \leq 0.05$). All sheep had the presence of the *IGF1* gene. Nutritional restriction in Suffolk sheep had a negative effect in the percentage of pregnancy and plasma levels of IGF1 and insulin, but not on gene regulation of exon 3 of the *IGF1* neither estrus incidence or return to estrous.

Key words: mutations, NRC, gestation, PCR, feeding.

3.3. INTRODUCCIÓN

La fertilidad en vacas es influenciada por diversos factores y al combinarse con la escasez de nutrientes, hay un efecto negativo en la misma (Bach, 2019). El ovocito normal crece y se prepara para ovular cuando el balance energético en bovinos es negativo, y durante su maduración final y la ovulación, reanuda su balance energético positivo (Leroy *et al.*, 2010). Después, el crecimiento fetal dependerá del suministro placentario de nutrientes, el cual está determinado por la capacidad de la madre para adquirir nutrientes y por la capacidad de la placenta para transferir nutrientes al embrión (Sferruzzi-Perri *et al.*, 2008). En este sentido, el gen *IGF1* es un péptido mitogénico, su secreción está influenciada por la desnutrición, la sensibilidad a la hormona de crecimiento (GH) y se expresa por las glándulas uterinas de animales cíclicos y gestantes; una de las principales funciones del *IGF1* es la activación de la vía de señalización para la proteína quinasa B (AKT), un estimulador del crecimiento, proliferación celular e inhibidor de la muerte celular programada (Mondal *et al.*, 2017).

Rumiantes con una condición corporal (CC) baja tienen niveles bajos de insulina e *IGF-1* que provocan un incremento en los niveles séricos de la GH como respuesta fisiológica para conservar la masa muscular, causan una inhibición en la secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), y por consecuencia, de las hormonas luteinizante (LH) y estimulante del folículo (FSH) lo que produce un retraso en el reinicio de la actividad cíclica reproductiva (Clarke, 2014). Durante el desarrollo folicular y maduración final del ovocito, la hormona insulina actúa como señal metabólica para la secreción de GH e IGF (Laskowski *et al.*, 2016), los cuales se originan en la teca del ovario (Ruiz *et al.*, 2011). Un aumento de IGF durante la maduración del ovocito produce un incremento en células del blastocisto (Byrne *et al.*, 2002), favorece la expansión de las células del cumulo, mejora la maduración nuclear y contribuye en la reducción de la apoptosis de ovocitos (Wasielak; Bogacki, 2007). En folículos grandes IGF1 se encuentra en cantidades abundantes (Sudo *et al.*, 2007), y aumenta la sensibilidad de las células de la granulosa a FSH al final de la selección folicular (Lenz *et al.*, 2007) mediante la estimulación en la actividad de la aromatasa y

con ayuda del *IGF1*. El folículo dominante es el único capaz de utilizar los niveles bajos de FSH para culminar su crecimiento (Fortune *et al.*, 2004). El mayor número de transcripciones de *IGF1* y sus receptores ocurre antes de la ovulación, cuando los niveles de estradiol son elevados; el *IGF1* actúa dentro del oviducto para aumentar la secreción de proteínas al lumen, y favorece la fertilización y el desarrollo temprano de la gestación (Ruiz *et al.*, 2011).

Hay pocos estudios respecto a la influencia de la nutrición en niveles plasmáticos de metabolitos y en la regulación de los genes *IGF* relacionados con variables reproductivas en ovinos en especial en la raza Suffolk. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la influencia de la restricción alimenticia en la medición de los niveles plasmáticos de IGF1 e insulina, en la regulación del exón 3 del *IGF1*, en la incidencia del estro, el retorno al estro y en la gestación en ovejas Suffolk sincronizadas en la época reproductiva.

3.4.MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación, ovejas y alimentación

El estudio se realizó en las instalaciones del módulo de ovinos y caprinos del Departamento de Zootecnia, de la Universidad Autónoma Chapingo, Municipio de Texcoco, Estado de México (19° 29' 40" N y 98° 53' 28" O) y altitud de 2250 msnm (García, 2004). En esta investigación se usaron hembras multíparas (n=30) de raza Suffolk con 3.6 ± 2.27 años de edad en promedio y peso de 56.6 ± 9.99 kg. En los dos tratamientos se distribuyeron las hembras al azar: 1) hembras alimentadas con el 100 % de sus requerimientos nutricionales de acuerdo a su estado fisiológico (n=15, R100); 2) hembras alimentadas con el 70 % de los requerimientos para mantenimiento (n=15, r-30), de acuerdo a las tablas del NRC 2007 (National Research Council) para ambos tratamientos. El alimento para las ovejas del R100 tuvo la siguiente composición: mantenimiento-empadre, 8.9 % de proteína cruda (PC) y 2.2 Mcal kg⁻¹ de energía metabolizable (EM); gestación inicial, 9 % de PC y 2.6 Mcal kg⁻¹. La composición del alimento para las ovejas del r-30 fue: 6.3 % de PC y 1.54 Mcal kg⁻¹ de EM. La

investigación comprendió cuatro etapas: adaptación, sincronización, empadre y postempadre en la época reproductiva (Figura 1).

El contenido nutricional de los ingredientes utilizados en la alimentación se muestra en el Cuadro 1 y el promedio del consumo individual de nutrientes se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 9. Nutrientes contenidos en el ensilado de maíz y alimento concentrado ofrecido durante la fase experimental a ovejas Suffolk.

	Ensilado	Concentrado
MS (%)	24.24	85.99
PC (%)	8.20	11.40
FDN (%)	65.73	30.37
FDA (%)	49.53	8.33
EM (Mcal kg ⁻¹)	2.49	2.65

La obtención de los valores es el promedio de los resultados del análisis proximal y análisis Van Soest realizada en muestras de ensilado y alimento concentrado. MS= Materia seca; PC= Proteína Cruda; FDN= Fibra detergente neutra; FDA= Fibra detergente acida; EM= Energía metabolizable.

Cuadro 10. Promedio del consumo individual de nutrientes en ovejas Suffolk, alimentadas con ensilado de maíz y concentrado comercial.

	Requerimientos (NRC, 2007)			
	Mantenimiento - Empadre		Gestación inicial (día 4 al 34 post MN)	
	-30%	100%	-30%	100%
Forraje: concentrado	100:0	97.5:2.5	100:0	95:5
MS (kg)	0.77	1.1	0.77	1.3
PC (g)	68.6	98	68.6	117

EM (Mcal kg ⁻¹)	1.54	2.2	1.54	2.6
-----------------------------	------	-----	------	-----

MS= Materia seca; PC= Proteína Cruda; FDN= Fibra detergente neutra; FDA= Fibra detergente acida; EM= Energía metabolizable.

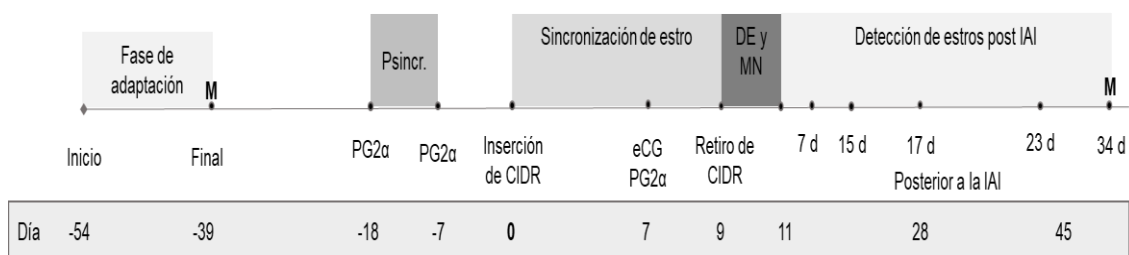
Presincronización y sincronización del estro

Una presincronización se realizó mediante la aplicación de dos dosis con 5 mg dosis⁻¹ oveja⁻¹ de prostaglandinas 2 α (PGF2 α ; Lutalyse, Zoetis, Michigan, USA), en los días -18 y -7 previos a la sincronización, con el objetivo de homogenizar la respuesta ovárica. Después se colocó (Día 0) un dispositivo intravaginal impregnado con 0.3 g de progesterona (CIDR, Pfizer, Hamilton, New Zealand) durante nueve días. Al séptimo día, se aplicaron 400 U.I. de Gonadotropina Coriónica equina (eCG; Folligon, Intervet, USA) y 5 mg de PGF2 α . La detección del estro inició 12 h después de retirado el CIDR, luego cada cuatro horas hasta la manifestación externa de estro, y se utilizaron carneros celadores provistos de un mandil para evitar la cópula (Figura 1).

Monta natural (MN), estro y retorno a estro

Las ovejas que manifestaron signos de estro, fueron aisladas junto con el macho asignado para realizar la MN y se efectuó una segunda MN a las 12 h. Los carneros no realizaron más de cuatro empadres. El primer retorno a estro se detectó en el día 17 posterior a la MN (intervalo de los días 13 al 22 posteriores) y el segundo retorno en el día 34 (intervalo de los días 29 al 39 posteriores), dos veces cada día durante 30 min, y se usaron machos celadores provistos con mandil (Figura 1).

Figura 9. Esquema de muestreos realizados para el análisis de regulación génica para el exón 3 del *IGF1*.



Diagnóstico de gestación

El diagnóstico de gestación se realizó por ecografía ventral en el día 45 después de la MN, y el diagnóstico de gestación se validó el día 60 posterior a la MN, con un ecógrafo portátil (4Vet mini, DRAMINSKI, Poland) y transductor de 4.0-9.0 MHz.

Análisis de insulina e IGF1 séricos

Las muestras sanguíneas se tomaron los días 7, 15, 17, 23 y 34 posteriores a la MN, en tubos estériles de 5 mL (BD Vacutainer, NJ, USA), se centrifugaron a 693 x g (Thermo Scientific CL10, Massachusetts, USA) durante 15 min, para separar el suero sanguíneo que se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis. Las muestras se analizaron en el Laboratorio Reproducción-Endocrinología de la UNAM-FMVZ, Ciudad de México. Para determinar los niveles séricos de insulina se utilizó un kit de inmunoensayo enzimático en fase sólida (Insulin ELISA, DRG, Marburg, Germany) con una sensibilidad de análisis de 1.76 $\mu\text{LU mL}^{-1}$ con un coeficiente de variación intraensayo de 2.2 %. Para la medición cuantitativa de *IGF1* en sangre se usó un kit de inmunoensayo enzimático (IGF-1 ELISA, ALPCO, Salem, USA), con una sensibilidad de análisis de 0.091 ng mL^{-1} y un coeficiente de variación intraensayo de 5.81 %.

Análisis de la regulación génica del exón 3 del IGF1

Las muestras sanguíneas se tomaron en los días -39 (respecto a la inserción del CIDR) y el día 34 post MN (Figura 1), mediante la punción de la vena yugular con jeringas de

3 mL, bajo los criterios de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) (SAGARPA, 2001) sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio, en concordancia con las regulaciones para el uso y cuidado de animales de investigación, aprobado por el Consejo General Académico de Colegio de Postgraduados, México (COLPOS, 2016). De la sangre recolectada, se colocaron 0.5 mL en tarjetas de Tecnología Asociada Flinders o por sus siglas en inglés FTA Whatman (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom). Después, las muestras se secaron 30 min y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su análisis. En la purificación del DNA se utilizó 1 mm² de la muestra contenida en las tarjetas FTA, la cual se introdujo en un tubo para Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y se adicionaron 100 µL de reactivo purificante Whatman FTA durante 10 min; el reactivo se desechó mediante decantación. Este paso se realizó tres veces con el objetivo de purificar los ácidos nucleicos almacenados en las tarjetas FTA. Después, se agregaron 200 µL de amortiguador Tris (hidroximetil aminometano)-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) a temperatura ambiente durante 5 min, y el amortiguador se desechó. Este paso se repitió dos veces.

Amplificación del gen IGF1

El exón 3 del gen *IGF1* se amplificó mediante la PCR. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 12.5 µL, con 6.25 µL de mezcla maestra de reacción para PCR (Master Mix 2X, (Promega© Madison, WI, USA), 0.625 µL de los iniciadores del exón 3 del gen *IGF1*; For-5'- GGGGTATGGCTCGAGCAGTC-3'; Rev-5'- TTCTGAGCCTTGGGCATGT-3', número de acceso, X51358 (HE *et al.*, 2012; IDT®, Illinois, USA) y 5 µL de dihidrato de trehalosa al 10 % (en agua libre de nucleasas y proteasas, Merck© KGaA 64271, Darmstadt, Alemania). Los tubos con el fragmento de la tarjeta procesada y la mezcla de reacción, ya homogenizada, se colocaron en un termociclador (GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystems; California, USA).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial de un ciclo a 95°C, 5 min, un "touchdown" de 6 ciclos (desnaturalización a 95 °C, 30 s;

alineamiento a 68 °C, 30 s y extensión a 72 °C, 45 s), 25 ciclos (desnaturalización a 95 °C, 30 s; alineamiento a 62 °C, 30 s y extensión a 72 °C, 45 s) y extensión final un ciclo a 72 °C, cinco min. Se verificó la calidad y el tamaño de los fragmentos amplificados por electroforesis en geles de agarosa al 4.0 % con solución amortiguadora Tris-Acetic Acid-EDTA (TAE 1X, Merck© KGaA 64271, Darmstadt, Alemania), GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, SFO Bay Area, USA), amortiguador de carga Loading Dye 6x y marcador molecular Φ X174 DNA-Hae III (New England BioLabs, MA, USA); la visualización de los fragmentos se realizó con un transiluminador con luz UV (MiniBIS Pro, DNR Bio-Imaging Systems, Neve Yamin, Israel), utilizando el software GelCapture.

Secuenciación y análisis de secuencias

Los amplicones obtenidos del exón 3 del gen *IGF1*, se enviaron a la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur), para su limpieza y secuenciación. Una vez obtenidas las secuencias del exón 3 de *IGF1*, se realizó una búsqueda en Nucleotide BLAST del NCBI y se seleccionaron aquellas que tenían mayor similitud con las de nuestro estudio (X51358). Con las secuencias de cada exón y las secuencias consenso, se analizó la calidad de las secuencias y se realizó un alineamiento con el algoritmo MUSCLE® (versión 2020.2.4, Edgar, 2004) en el programa Genious®, para determinar el grado de similitud y detectar posibles polimorfismos.

Análisis estadístico

Las variables presencia o ausencia del gen *IGF1*- exón3, incidencia de estro (IE), retorno al estro (RE) y gestación, se analizaron mediante regresión logística utilizando el procedimiento Logistic. La variable tiempo a inicio de estro (TE) se analizó con el método estadístico curvas de sobrevivencia Log-Rank, mediante el procedimiento Life Test; la prueba de comparación de medias para los análisis fue con la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$). Para el análisis de los niveles de insulina e IGF1 se utilizó el modelo estadístico de regresión Poisson, utilizando el procedimiento de GENMOD y la comparación entre los tratamientos fue mediante el método de Bonferroni. En todos

los análisis se utilizó SAS versión 9.4. En cada uno de los modelos estadísticos usados se comprobó que no existiera efecto del peso y edad en las variables de estudio.

3.5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Incidencia y tiempo al inicio de estro

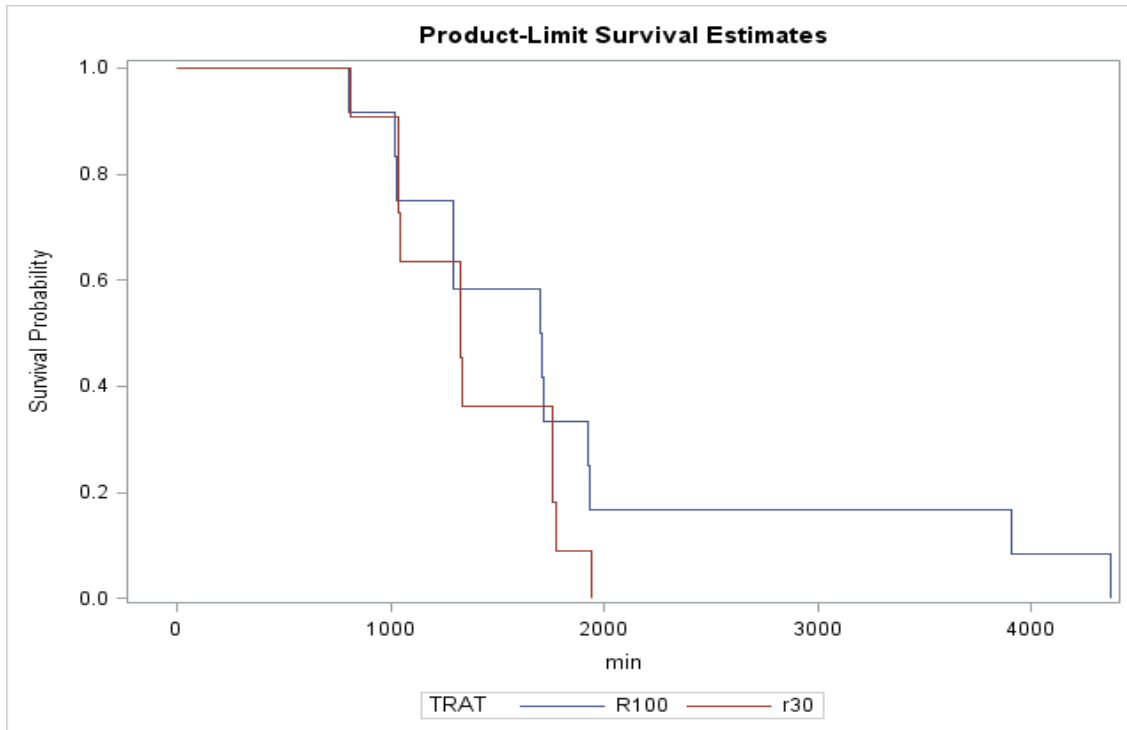
Las ovejas del tratamiento R100 en promedio mostraron signos de estro a las 31.5 h después de retirado el CIDR, 8.5 h después que las ovejas del tratamiento r-30; pero sin mostrar diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0.05$; Cuadro 3 y Figura 2). Al igual, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de ovejas que mostraron signos de estro en ambos tratamientos ($p>0.05$; Cuadro 3), después del protocolo de sincronización.

Cuadro 11. Incidencia y tiempo al inicio de estro en ovejas Suffolk.

Tratamiento	n	Estro %	Tiempo al estro (h)
R100	15	80.0	31.5
r30	15	73.3	23.0

Prueba de Tukey, $p>0.05$.

Figura 10. Curva de supervivencia para el inicio del estro en ovejas Suffolk de los tratamientos R100 y r-30. Prueba de Tukey. Long Rank ($p=0.3675$).



El folículo dominante produce grandes cantidades de estradiol, el cual tiene una retroacción positiva con GnRH (Lenz *et al.*, 2007) y, por lo tanto, un aumento en la secreción de LH y FSH; esta última estimula una mayor síntesis de la proteína A placentaria asociada al embarazo (PAPP-A), que provoca una disminución de las proteínas de unión de baja afinidad 4 (IGFBP4) y 5 (IGFBP5), y aumenta la disponibilidad del IGF1 producido en células de la granulosa, las cuales van a actuar de manera autocrina y paracrina para estimular el ovocito, con lo cual pueda satisfacer sus necesidades anabólicas de manera eficiente (Wasielak; Bogacki, 2007). Una alimentación con alto contenido de energía aumenta los niveles de insulina e IGF1, lo cual acelera el proceso de meiosis dentro de las células del cumulo, aumentando la tasa de crecimiento del folículo dominante y del folículo preovulatorio (Laskowski *et al.*, 2016; Sakaguchi *et al.*, 2002). Todos estos estudios concuerdan con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que las ovejas con una mejor alimentación en calidad y energía fueron las ovejas del tratamiento R100, las cuales obtuvieron mayores niveles de insulina e IGF1, posiblemente debido a una mayor eficiencia en el desarrollo folicular, para generar mayor número de folículos preovulatorios.

Contrario a lo reportado en la literatura, las ovejas del r-30 mostraron signos de estro en un tiempo más corto; este resultado pudo deberse a la subnutrición en el tratamiento, ya que los niveles de insulina bajan, y causan un retraso en el reinicio de la actividad cíclica reproductiva, una reducción en la secreción pulsátil de LH y una reducción en la producción de estrógenos por el folículo dominante (Laskowski *et al.*, 2016). No obstante, un descenso en el mecanismo inhibitorio en la producción intraovárica de IGF1 puede ayudar a regular la función folicular y mantener los niveles intrafoliculares de IGF1 (Ruiz *et al.*, 2011), para mantener un funcionamiento adecuado del folículo.

La presencia de IGF1 en células del ovario tiene efectos mitogénicos, en las células de la granulosa y lúteas estimula la producción de progesterona, aumenta la producción de estradiol y de la proliferación celular, y en células de la teca estimula la producción de andrógenos, pero disminuye la calidad de los ovocitos (Gong *et al.*, 2002). Esta información de la literatura concuerda con el porcentaje de retornos a estro del presente estudio, ya que las ovejas con mayor nivel de IGF1 fueron aquellas del tratamiento R100; sin embargo, a pesar de que se cubrieron los requerimientos nutricionales de acuerdo a su etapa fisiológica, tuvieron un mayor porcentaje de retornos a estro. Esto difiere con lo reportado por Zhang *et al.* (2018), quienes mencionan que el ofrecer una dieta con bajos niveles energéticos durante la fase de desarrollo embrionario, aumenta la secreción de PG2 α y baja la producción de progesterona, lo que provoca una luteólisis y, como consecuencia, muertes embrionarias y retorno a nuevos ciclos estrales (Lozano *et al.*, 2003). En el presente estudio, los mayores niveles de insulina e IGF1, resultado de una alimentación adecuada en la etapa de empadre, no tuvieron efecto en el tiempo ni en la manifestación del estro en ovejas Suffolk, con el uso de un protocolo de sincronización con progestágenos.

Retorno a estro

No se observaron diferencias significativas en el primer retorno (día 17) a estro después de la MN entre los tratamientos (R100 vs. R-30; $p > 0.05$, Cuadro 4); a pesar

de la diferencia de 20 puntos porcentuales y sin efecto de las covariables edad ($p=0.2135$) y peso ($p=0.8018$). En el día 34 post MN, hubo un retorno a estro de 9.0 % en ovejas del tratamiento R100 y 0 % en el tratamiento r-30, sin diferencias significativas ($p>0.05$, Cuadro 4) y sin efecto de las covariables edad ($p=0.8611$) y peso ($p=0.8767$).

Porcentaje de gestación

En el porcentaje de ovejas gestantes hubo diferencias significativas entre los tratamientos (R100 y r-30; $p\leq 0.05$, Cuadro 4), sin efecto de las covariables edad ($p=0.4205$) y peso ($p=0.3393$) en los resultados de la variable porcentaje de gestación.

Cuadro 12. Porcentajes de retorno a estro y gestación en ovejas Suffolk.

Tratamiento	n	RE	RE	RE %	Gestación %
		17 días %	34 días %		
R100	15	26.7 ^a	9.1 ^a	33.3 ^a	86.7 ^a
r30	15	6.7 ^a	0 ^a	6.7 ^a	46.7 ^b

Columnas con diferente literal son significativamente diferentes (Regresión logística, $p\leq 0.05$). RE=retorno a estro.

Niveles de insulina

Entre tratamientos hubo diferencias significativas ($p\leq 0.05$) en los niveles de insulina en sangre al día 23 después del empadre (Cuadro 5).

Cuadro 5. Promedio de niveles séricos de insulina en ovejas Suffolk.

Tratamiento	7 post MN	15 post MN	17 post MN	23 post MN	34 post MN
	ng/mL				
R100	23.28 ^a	37.10 ^a	33.43 ^a	34.75 ^a	17.84 ^a
r30	16.88 ^a	17.27 ^a	21.0 ^a	16.25 ^b	16.63 ^a

Columnas con diferente literal son significativamente diferentes (Prueba de Bonferroni, $p \leq 0.05$) con respecto a diferencias en niveles séricos de insulina entre tratamientos.

Niveles de IGF1

Entre tratamientos hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos en los niveles de *IGF1* en sangre al día 34 después de la MN (cuadro 6).

Cuadro 6. Promedio de niveles séricos de IGF1 en ovejas Suffolk.

Tratamiento	7 post I.A.	15 post I.A.	17 post I.A.	23 post I.A.	34 post I.A.
	ng/mL				
R100	12.61 ^a	12.16 ^a	12.51 ^a	10.85 ^a	12.46 ^a
r30	8.40 ^a	8.71 ^a	9.61 ^a	9.56 ^a	9.69 ^b

Columnas con diferente literal son significativamente diferentes (Prueba de Bonferroni, $p \leq 0.05$) con respecto a diferencias en niveles séricos de IGF1 entre tratamientos.

Los efectos de IGF1 durante la implantación y el desarrollo temprano de la gestación, se caracterizan por disminuir la apoptosis, aumentar la proliferación celular y mejorar la transformación y diferenciación celular (Meiyu *et al.*, 2011). Sin embargo, no se ha podido demostrar si existe una correlación de los niveles periféricos de IGF1 con los niveles de IGF1 en líquido luminal uterino y si estos niveles periféricos pueden tener influencia en el embrión (Bilby *et al.*, 2006). Una alta correlación se ha demostrado entre los niveles de expresión de ARNm de progesterona y niveles de expresión de ARNm de IGF1, de lo cual se infiere que la expresión endometrial de IGF1 está regulado por los niveles de progesterona en el endometrio uterino; por esta razón, las hembras gestantes presentan niveles más altos de IGF1 en el endometrio uterino en comparación con animales que no están gestantes (Sequeira *et al.*, 2016).

En el presente experimento, un 20 % de ovejas del tratamiento R100 mostraron signos de retorno a estro después de la MN; sin embargo, estas ovejas resultaron preñadas en el diagnóstico de gestación. Esto se pudo deber probablemente a un error en la

metodología del diagnóstico de estro o alguna disminución en los niveles de progesterona que provocara manifestación externa de estro (Viñoles *et al.*, 2012), ya que los niveles de IGF1 eran similares a las ovejas que no retornaron y diagnosticadas como gestantes. Un 46.7 % de ovejas del tratamiento r30 no mostraron signos de estro posterior a la MN; estas ovejas no resultaron preñadas al momento del diagnóstico de gestación, probablemente debido a muertes embrionarias en los primeros 20 días posteriores a la concepción sin mostrar signos de retorno a estro o a la presencia de muertes fetales entre los días 21 a 40 después de la concepción (Bazer *et al.*, 2011), ya que estas ovejas tuvieron niveles menores de IGF1 en comparación con las ovejas del grupo R100. De esta manera, los niveles elevados de insulina e IGF1 en sangre al día 23 y 24 (implantación y desarrollo temprano de la gestación) después de la MN del presente estudio, respectivamente, se asociaron con un mayor porcentaje de gestación en las ovejas pertenecientes al tratamiento R100.

Identificación del exón 3 en el gen *IGF1* y sus polimorfismos

En todas las ovejas de ambos tratamientos se encontró el exón 3 (171 pb, Figura 3) del gen *IGF1*, sin algún polimorfismo evidente en las secuencias analizadas del exón de dicho gen (Figura 4). Las secuencias del exón 3 del gen *IGF1* de este estudio tuvieron un 100 % de similitud con la secuencia X51358; proveniente de Estados Unidos.

Figura 11. Amplificación del exón 3 en el gen *IGF1* en ovejas Suffolk sincronizadas; carril MM (1): marcador molecular, carriles 2 al 14: muestras amplificadas (171 pb) y carril neg (15)= testigo negativo.

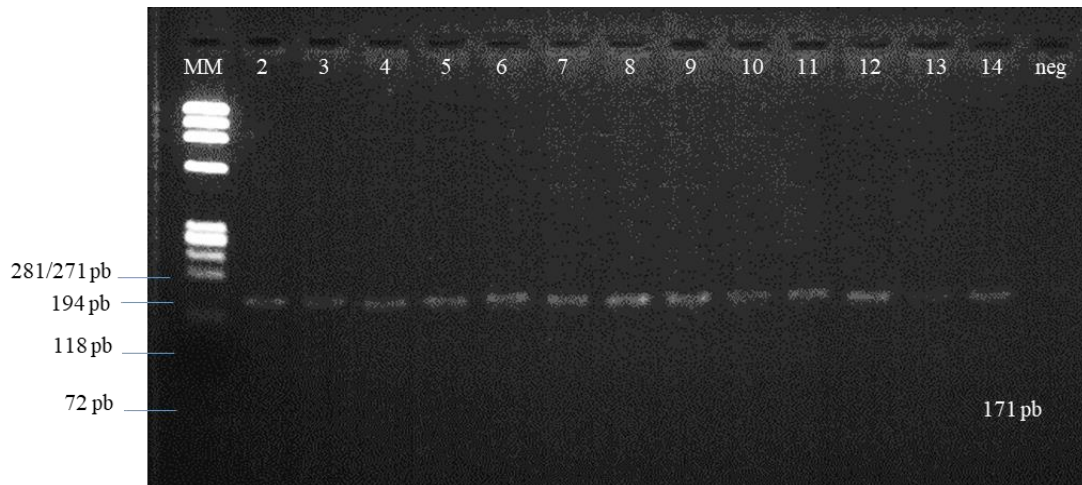
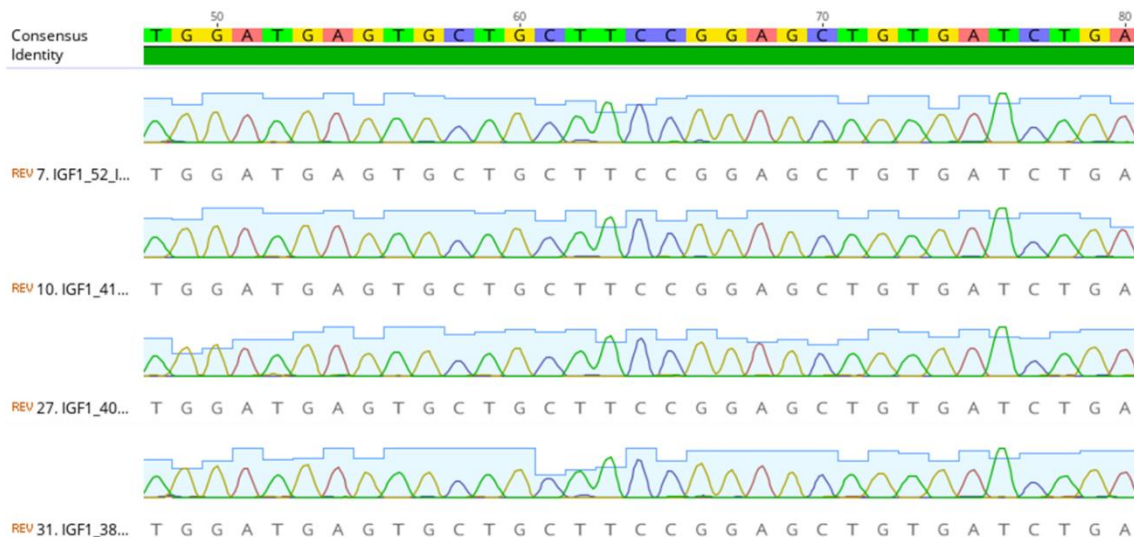


Figura 12. Alineación de secuencias del exón 3 en el gen *IGF1* (tamaño del producto 171pb).



La ingesta de alimento durante la gestación altera las marcas epigenéticas, las cuales mantienen una regulación en la expresión de genes impresos. Esta regulación lo hace mediante la metilación del ADN (adición de un grupo metilo al nucleótido citosina, teniendo como próximo nucleótido una guanina; es decir, un sitio CpG), la modificación de histonas y el ARN no codificante (Zhou *et al.*, 2019). Una desregularización en la metilación puede provocar silenciamiento de estos genes o una sobreexpresión de los mismos, provocando efectos indeseables e incluso susceptibilidad a enfermedades

(Wei *et al.*, 2020). El desarrollo de embriones sea *in vivo* o *in vitro* es afectado por la expresión de los genes *IGF1* e *IGF2* y la disponibilidad de nutrientes en la dieta, pues se ha demostrado que una alimentación de baja calidad nutricional disminuye la transcripción de los *IGF*, y hay un efecto negativo en el desarrollo embrionario (Gerbert *et al.*, 2006). La epigenética es probable que sea un factor que influyó en los resultados de este estudio, ya que todas las ovejas presentaron el gen y en el análisis del exón 3 no se encontraron mutaciones o, si hay otro cambio, puede estar presente en alguna otra región del gen *IGF1*.

3.6.CONCLUSIONES

La restricción nutricional, comparada con ofrecer una dieta que cubra los requerimientos nutricionales de ovejas Suffolk según su etapa fisiológica, no mostró diferencias significativas en la incidencia de estro, retorno a estro, ni afectó la regulación génica del exón 3 del *IGF1*. Sin embargo, e independiente de los factores genéticos, el ofrecer una dieta baja en nutrientes con 70 % de los requerimientos para mantenimiento durante la sincronización de estros, la MN y las etapas de implantación y gestación temprana (15-34 días posteriores a la fertilización), causó un efecto negativo en los niveles séricos de insulina e *IGF1* y en el porcentaje de gestación en ovejas Suffolk en la época reproductiva.

3.7.AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento de la beca otorgada a la primera autora, durante la realización de sus estudios de nivel doctorado en el Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad - Ganadería en el Colegio de Postgraduados, Montecillo. Así mismo, se agradece al departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo por el apoyo y las facilidades brindadas con el uso de los ovinos, al Colegio de Postgraduados por el financiamiento de la investigación y a la M.C. Susana Rojas Maya del Laboratorio Reproducción-Endocrinología de la UNAM-FMVZ, por el apoyo en el análisis de *IGF1* e insulina.

3.8.REFERENCIAS

- Bach, A. 2019. Effects of nutrition and genetics on fertility in dairy cows. *Reproduction, Fertility and Development* 31: 40–54. <https://doi.org/10.1071/RD18364>
- Bazer, W.F., G. Wu, G.A. Johnson, J. Kim, G. Song. 2011. Uterine histotroph and conceptus development: select nutrients and secreted phosphoprotein 1 affect mechanistic target of rapamycin cell signaling in ewes. *Biology of Reproduction*, 85: 1094–1107, 2011. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.094722>.
- Bilby, T.R., A. Sozzi, M.M. López, F.T. Silvestre, A.D. Ealy, C.R. Staples, and W.W. Tatcher. 2006. Pregnancy, bovine somatotropin, and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: I. Ovarian, conceptus, and growth hormone/insulin-like growth factor system responses. *Journal of Dairy Science* 89: 3360-3374. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72373-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72373-6)
- Byrne, A.T., J. Southgate, D.R. Brison, H.J. Leese. 2002. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol Reprod Dev* 62: 489–495. <https://doi.org/10.1002/mrd.10153>.
- Clarke, Iain J. 2014. Interface between Metabolic Balance and Reproduction in Ruminants: Focus on the Hypothalamus and Pituitary. *Hormones and Behavior* 66 (1): 15-40. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.02.005>
- COLPOS. 2016. Reglamento para el uso y cuidado de animales destinados a la investigación en el Colegio de Postgraduados. En: Reglamento para el uso y cuidado de animales en experimentación. p. 1-16.
- Fortune, J., G. Rivera, and M. Yang. 2004. Follicular development: The role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*, 82–83 109–126. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.031>.
- García, E. 2004. Modificaciones al sistema climático de Köppen. 5th ed. México: Instituto de Geografía de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gebert, C., C. wrenzycki, D. Herrmann, D. Gröger, R. Reinhard, P. Hajkova, A. Lucas-Hahn, J. Carnwath, H. Lehrach and H. Niemann. 2006. The bovine IGF2 gen is

- differentially methylated in oocyte and sperm DNA. *Genetics* 33: 222-229.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.03.011>
- Gong, J., W. Lee, P. Garnsworthy, R. Webb. 2002. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction* 123: 419 – 27.
<https://doi.org/10.1530/rep.0.1230419>.
- He, J.N., B.Y. Zhang, M.X. Chu, P.Q. Wang, T. Feng, G.L. Cao, R. Di, L. Fang, D.W. Huang, Q.Q. Tang, and N. Li. 2012. Polymorphism of insulin-like growth factor 1 gene and its association with litter size in Small Tail Han sheep. *Mol Biol Rep.* 39:9801–9807. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1846-y>
- Laskowski, D., Y. Sjunnesson, P. Humblot, G. Andersson, H. Gustafsson, R. Båge. 2016. The functional role of insulin in fertility and embryonic development - What can we learn from the bovine model? *Theriogenology* 30: 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.062>
- Lenz, M.I., G.F. Ramírez, y L.F. Uribe. 2007. Papel del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1) en la regulación de la función ovárica. *Biosalud*, 6: 149-159.
- Leroy, J.L.M.R., V. Van Hoeck, M. Clemente, D. Rizos, A. Gutierrez-Adan, A. Van Soom, M. Uytterhoeven, and P.E.J. Bols. 2010. The effect of nutritionally induced hyperlipidaemia on in vitro bovine embryo quality. *Hum Reprod* 25:768–78. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep420>
- Lozano, J M, P Lonergan, M P Boland, y D O’Callaghan. 2003. Influence of Nutrition on the Effectiveness of Superovulation Programmes in Ewes: Effect on Oocyte Quality and Post-Fertilization development. *Reproduction* 125(4):543-53.
- Meiyu, Q.I., Z. Roth, and L. Di. 2011. Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) in Reproduction System of Female Bovine. *Journal of Northeast Agricultural University* 18 (4): 84-87. [https://doi.org/10.1016/S1006-8104\(12\)60030-0](https://doi.org/10.1016/S1006-8104(12)60030-0)
- Mondal, S., A. Mor, and I.J. Reddy. 2017. Factors/Genes in Maternal Recognition of Pregnancy: An Overview. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Human and Animal Health Applications* 597-630.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63660-7.00023-1>.

- Ruiz, A.J.L., L.F. Uribe-Velásquez, y J. H. Osorio. 2011. Factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1 (IGF-1) en la reproducción de la hembra bovina. *vet. zootec.* 5(2): 68-81..
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca, y Alimentación). 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación*, 22 Agosto, p. 107–165. Retrieved from: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf
- Sakaguchi, M., T. Dominko, N. Yamauchi, M.L. Leibfried-Rutledge, T. Nagai, and N.L. First. 2002. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. *Reprod* 123: 135 -142. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230135>
- Sequeira, M., S.J. Pain, V. de Brun, A. Meikle, P.R. Kenyon, and H.T. Blair. 2016. Gestation-related gene expression and protein localization in endometrial tissue of Suffolk and Cheviot ewes at gestation Day 19, after transfer of Suffolk or Cheviot embryos. *Theriogenology* 86: 1557 – 1565. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.015>
- Sferruzzi-Perri, A.N., J.A. Owens, P. Standen, and C.T. Roberts. 2008. Maternal Insulin-like Growth Factor-II Promotes Placental Functional Development Via the Type 2 IGF Receptor in the Guinea Pig. *Placenta* 29: 347 – 355. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.01.009>.
- Sudo, N., T. Shimizu, C. Kawashima, E. Kaneko, M. Tetsuka, A. Miyamoto. 2007. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) system during follicle development in the bovine ovary: relationship among IGF-I, type I IGF receptor (IGFR-I) and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A). *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.264, n.1-2, p.197-203. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.10.011>

- Viñoles, C., K.M.M. Glover, B.L. Paganoni, J.T.B. Milton, G.B. Martin. 2012. Embryo losses in sheep during short-term nutritional supplementation. *Reproduction, Fertility and Development*, 24: 1040–1047. <https://doi.org/10.1071/RD11281>.
- Wasielak, M., and M. Bogacki. 2007. Apoptosis inhibition by insulin-like growth factor (IGF)-I during in vitro maturation of bovine oocytes. *The Journal of Reproduction and Development*, 53: 419 – 426. <https://doi.org/10.1262/jrd.18076>
- Wei, Y., C. Han, S. Li, Y. Cui, Y. Bao, and W. Shi. 2020. Cuscuta Chinensis Flavonoids Down-regulate the DNA Methylation of H19/Igf2 Imprinted Control Region and Estrogen Receptor Alpha Promoter of Testis in Bisphenol A Exposed mice offspring. *Food Funct.* 32 pp.
- Zhang, Hao, Ling-wei Sun, Zi-yu Wang, Tie-wei Ma, Ming-tian Deng, Feng Wang, y Yan-li Zhang. 2018. Energy and Protein Requirements for Maintenance of Hu Sheep during Pregnancy. *Journal of Integrative Agriculture* 17 (1): 173-83. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61691-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61691-5).
- Zhou, M., N.J. Sng, C.E. LeFrois, A.L. Paul, and R.J. Ferl. 2019. Epigenomics in an extraterrestrial environment: organ-specific alteration of DNA methylation and gene expression elicited by spaceflight in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 20, 205. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5554-z>.

CONCLUSIONES GENERALES

Con base en los estudios realizados, se concluye lo siguiente:

En los últimos 16 años hay un incremento en la publicación de artículos que analizan la relación de los IGF con la reproducción ovina. Existe una tendencia en aumentar la probabilidad de publicar en revistas evaluadas con puntuación CiteScore elevados, si se usan técnicas en genética molecular.

Se identificaron los exones 5 y 10 del gen *IGF2* y exón 3 del gen *IGF1* en todas las ovejas Suffolk con CCB y CCA, y alimentadas con 100 y 70 % de sus requerimientos nutricionales, respectivamente, sin encontrar diferencias en la secuencia de su ADN. Asimismo, la CC no afectó el tiempo a estro, incidencia de estro, gestación, fecundidad, prolificidad y niveles plasmáticos de P4. Sin embargo, la CCA aumentó el número de folículos >6mm a las 12 h después de retirar el dispositivo intravaginal con progestágenos, y la CCB aumentó el porcentaje de retornos al día 34 después de la IAi en la época reproductiva con ovejas Suffolk. Además, una dieta baja en nutrientes para ovejas con 70 % de los requerimientos para mantenimiento durante las etapas de sincronización, empadre y postempadre, la MN y las etapas de implantación y gestación temprana durante la época reproductiva, tuvo un efecto negativo en los niveles séricos de insulina e *IGF1* y el porcentaje de gestación. Pero no hubo efecto en incidencia de estro y retorno a estro.

Los estudios de la presente tesis se consideran como los primeros en su tipo que proporcionan información inicial y esencial del efecto del *IGF1* e *IGF2* en ovejas de raza Suffolk y son un punto de partida para el desarrollo de futuras investigaciones referente al tema, e incluso de líneas de investigación. Para futuras investigaciones se recomienda aumentar el número de ovejas por cada tratamiento, y búsqueda de transcritos de ARN en tejidos específicos como folículos ováricos y placenta. En la nutrición de las ovejas, realizar una restricción de nutrientes por mayor tiempo durante la gestación de las ovejas y agregar un tratamiento para un total de tres: ovejas con

restricción nutricional, ovejas con 100 % de requerimientos, y ovejas con un porcentaje mayor de sus requerimientos nutricionales.