



**Universidad Autónoma de Ciudad Juárez**

**Instituto de Ciencias Biomédicas**

**Departamento de Ciencias Veterinarias**

**Maestría en Ciencia Animal**

**Evaluación de la quercetina y  $\alpha$ -tocoferol en la  
maduración *in vitro* de ovocitos de bovino y su desarrollo  
embrionario**

Tesis para obtener el grado de

Maestra en Ciencia Animal

**MVZ. Theisy Patricia Acosta Pérez**

“Becada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología”

**Bajo la Dirección de**

**Dr. Andrés Quezada Casasola**

**Y la Codirección de**

**Dr. José Maria Carrera Chávez**

Ciudad Juárez, Chihuahua, noviembre de 2021

## **APROBACIÓN DE LA TESIS**

Evaluación de la quercetina y  $\alpha$ -tocoferol en la maduración *in vitro* de ovocitos de bovino y su desarrollo embrionario, reporte de investigación preparado por Theisy Patricia Acosta Pérez como requisito parcial para obtener el grado de

### **MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL**

ha sido aprobado y aceptado por:

---

**Dr. Andrés Quezada Casasola**  
DIRECTOR DE TESIS

---

**Dr. José María Carrera Chávez**  
CO-DIRECTOR DE TESIS

---

**Dr. José Alberto Núñez Gastélum**  
ASESOR

---

**Dr. Mateo Fabián Itzá Ortiz**  
ASESOR

---

**PhD. Ernesto Orozco Lucero**  
ASESOR

## **DECLARACIÓN INSTITUCIONAL**

### **EVALUACIÓN DE LA QUERCETINA Y $\alpha$ -TOCOFEROL EN LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS DE BOVINO Y SU DESARROLLO EMBRIONARIO**

Se permite el uso académico de información contenida en esta tesis, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente al autor. Para la reproducción parcial o total de este documento con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de las autoridades que avalan esta tesis.

---

**Dr. José María Carrera Chávez**

**COORDINADOR DE LA MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

---

**Dr. Ramón Rivera Barreno**

**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS VETERINARIAS**

---

**C.D. Salvador David Nava Martínez**

**DIRECTOR DEL INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS**

## DEDICATORIA

Este trabajo de investigación está dedicado primeramente a mi familia, a mis padres, Rosa y Crescencio, que me apoyaron en la decisión de estudiar un posgrado y que siempre estuvieron a mi lado dándome palabras de aliento. A mis hermanos, Selene, Ervey y Gregorio, que de una u otra forma siempre me apoyaron, que me ayudaron a mantener la calma en los momentos difíciles. A mis mejores amigos, Mónica, Diana, César, Armando y José Alfredo, que me dieron su apoyo incondicional, me ayudaron a tomar decisiones y me dieron ánimos durante todo el trayecto. A Edson, Cinthia y Julián, con quienes forme un gran equipo de trabajo y a pesar de las dificultades siempre encontrábamos la solución para poder seguir trabajando.

A mis directores, el Dr. Andrés Quezada y el Dr. José María Carrera, que en todo momento me guiaron y me apoyaron durante el estudio, me brindaron las herramientas necesarias para poder llevar a cabo mi proyecto, y que, a pesar de las dificultades y contratiempos del último año, siempre estuvieron al pendiente y ofreciéndome su apoyo.

A mis amigos, que a pesar de la distancia no dejaron de darme ánimos, con quienes compartí momentos de diversión que ayudaban a despejar mi mente, JorDel3426, Norvac666, Dejoe87, gracias por todo, y, por último, knighchaos, amigo me hubiera gustado mucho compartir este momento contigo, lamentablemente te nos adelantaste, espero volvernós a encontrar, gracias por el apoyo, te extraño mucho.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco principalmente a la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez por permitirme formar parte del programa de la Maestría en Ciencia Animal y contribuir en mi crecimiento y desarrollo profesional.

Así mismo, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para poder llevar a cabo mis estudios.

A mis directores y asesores, el Dr. Andrés Quezada, Dr. José María Carrera, Dr. Mateo Itzá, PhD. Ernesto Orozco y el Dr. José Núñez, por su apoyo durante la investigación, sus consejos, aportes y disposición para poder llevar a cabo el trabajo. Al Dr. Eduardo Pérez Eguía, quien desafortunadamente ya no está con nosotros, pero que al inicio de la investigación dedicó parte de su tiempo y consejos para guiarnos en el proceso.

Al personal del Rastro Municipal de Ciudad Juárez, a los MVZ. Corella y Andujo que nos permitieron la entrada a sus instalaciones para poder llevar a cabo la investigación, y nos apoyaron en todo momento durante el proceso.

También agradezco a mis mejores amigos, Mónica, César, Diana, Armando y José Alfredo, por darme ánimos y apoyo, y siempre estar disponibles cuando los necesitaba, así como a mis amigos y compañeros, Edson, Julián y Cinthia, por el gran equipo de trabajo que formamos durante el trayecto, por los momentos y conocimientos que compartimos.

Por último, agradezco a mi familia, de quienes tuve el apoyo incondicional desde el inicio y hasta el momento, y que de una u otra manera veían la forma de aportar para poder llevar a cabo mi investigación.

## RESUMEN

### EVALUACIÓN DE LA QUERCETINA Y $\alpha$ -TOCOFEROL EN LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS DE BOVINO Y SU DESARROLLO EMBRIONARIO

Por:

Theisy Patricia Acosta Pérez

La maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos es uno de los pasos más importantes durante la producción de embriones *in vitro* (PIV). La sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) durante la PIV pueden disminuir los porcentajes de blastocistos obtenidos, así como su calidad al final del proceso. Se propone la adición de antioxidantes al medio de maduración para evitar o disminuir los daños ocasionados por las ROS. En esta investigación se utilizaron dos antioxidantes en diferentes concentraciones:  $\alpha$ -tocoferol (0, 100, 200 y 400  $\mu$ M) y quercetina (0, 2, 4, 8 y 16  $\mu$ M) los cuales fueron añadidos al medio de MIV de ovocitos de bovino. Se recolectaron ovarios del matadero. Los ovocitos fueron recuperados mediante aspiración folicular, lavados en medio TCM-199 y clasificados en cuatro categorías, (1 siendo ovocitos de excelente calidad y 4, ovocitos de calidad pobre), distribuidos entre los tratamientos, y sometidos a maduración a 38.5 °C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 22 h. Posteriormente se evaluó el índice de expansión del *cumulus* (CEI) y se realizó la fertilización y el cultivo *in vitro*, los porcentajes de segmentación y blastocistos fueron evaluados 48 h y 7 días post cultivo, respectivamente. En el estudio 1 de  $\alpha$ -tocoferol no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos, CEI (P=0.7716), porcentaje de maduración (P=0.8715), de segmentación (P=0.8917) y blastocistos (P=0.5032) para los ovocitos clasificación 1 y 2. Para los ovocitos clasificación 3 y 4 se encontró diferencia significativa para el porcentaje de maduración (P=0.0129) y segmentación (P=0.0184), siendo el grupo de 100  $\mu$ M el que el mayor porcentaje obtuvo (77.36% y 16.12% respectivamente). En el estudio 2 de quercetina se observó una diferencia significativa entre los tratamientos para el porcentaje de maduración (P=0.0004) de los ovocitos clasificación 1 y 2, siendo el grupo de 16  $\mu$ M el que obtuvo el mayor porcentaje entre los tratamientos (78.33%), así mismo, en los grupos de los ovocitos clasificación 3 y 4, se observó una diferencia significativa en el porcentaje de maduración (P=0.0004), siendo el grupo de 2  $\mu$ M el que obtuvo el mayor resultado entre los tratamientos (95.23%). Además, se encontró diferencia significativa en el porcentaje de blastocistos (P=0.0409), siendo el grupo de 16  $\mu$ M el que presentó el mayor porcentaje (13.33%). Se concluye que

la adición de quercetina o  $\alpha$ -tocoferol al medio de maduración *in vitro* incrementa la maduración y el desarrollo hasta alcanzar la etapa de blastocistos de los ovocitos dado a sus propiedades antioxidantes.

Palabras clave: maduración *in vitro*; quercetina;  $\alpha$ -tocoferol; especies reactivas de oxígeno; embriones bovino.

## CONTENIDO

<b>INDICE DE TABLAS .....</b>	<b>X</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Producción de embriones <i>in vitro</i>.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Recolección y manejo de los ovarios.....</b>	<b>4</b>
<b>2.3 Técnicas de recuperación de los ovocitos.....</b>	<b>5</b>
<b>2.4 Selección y clasificación de los ovocitos .....</b>	<b>6</b>
<b>2.5 Maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos.....</b>	<b>8</b>
2.5.1 <i>Maduración citoplasmática .....</i>	10
2.5.1.1 <i>Redistribución de los organelos y su rol en la maduración .....</i>	10
2.5.2 <i>Maduración nuclear .....</i>	11
<b>2.6 Métodos de la evaluación de la maduración de COCs.....</b>	<b>12</b>
2.6.1 <i>Expansión de las células del cumulus.....</i>	12
2.6.2 <i>Índice de Expansión del Cúmulo.....</i>	13
2.6.3 <i>Expulsión del primer cuerpo polar .....</i>	14
2.6.4 <i>Evaluación de la actividad mitocondrial .....</i>	14
<b>2.7 Fertilización <i>in vitro</i> .....</b>	<b>15</b>
2.7.1 <i>Capacitación espermática <i>in vitro</i> .....</i>	16
2.7.2 <i>Métodos de selección de espermatozoides para fertilización <i>in vitro</i> .....</i>	17
2.7.2.1 <i>Método de Swim up .....</i>	17
2.7.2.2 <i>Gradiente de percoll .....</i>	18
<b>2.8 Cultivo <i>in vitro</i> de embriones .....</b>	<b>18</b>
2.8.1 <i>Evaluación morfológica de los embriones.....</i>	19
<b>2.9 Problemas durante la maduración <i>in vitro</i> .....</b>	<b>20</b>
2.9.1 <i>Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo durante la maduración <i>in vitro</i> .....</i>	20
2.9.1.1 <i>Estrés oxidativo y su efecto en los ovocitos y embriones .....</i>	21
2.9.2 <i>Producción de especies reactivas de oxígeno durante los procedimientos de colecta y maduración <i>in vitro</i> .....</i>	22
<b>2.10 Antioxidantes .....</b>	<b>24</b>

2.10.1 <i>Antioxidantes derivados de plantas</i> .....	25
2.10.2 <i>Quercetina</i> .....	26
2.10.2.1 <i>Uso de la quercetina en reproducción animal</i> .....	26
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>29</b>
<b>4 OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1 Objetivos específicos</b> .....	<b>29</b>
<b>5 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
<b>5.1 Área de estudio</b> .....	<b>30</b>
<b>5.2 Inicio y duración del estudio</b> .....	<b>30</b>
<b>5.3 Estudios</b> .....	<b>30</b>
5.3.1 <i>Estudio 1: antioxidante convencional</i> .....	30
5.3.1.1 <i>Tratamientos</i> .....	31
5.3.2 <i>Estudio 2: quercetina</i> .....	31
5.3.3 <i>Tratamientos</i> .....	31
<b>5.4 Colección de ovarios y recuperación de los ovocitos</b> .....	<b>32</b>
5.4.1 <i>Lavado y selección de los ovocitos</i> .....	32
<b>5.5 Maduración <i>in vitro</i></b> .....	<b>33</b>
5.5.1 <i>Evaluación post maduración</i> .....	34
5.5.1.1 <i>Índice de expansión del cúmulo</i> .....	34
<b>5.6 Fertilización <i>in vitro</i></b> .....	<b>34</b>
5.6.1 <i>Preparación de la caja de fertilización</i> .....	34
5.6.2 <i>Preparación de los ovocitos post maduración para la fertilización <i>in vitro</i></i> .....	35
5.6.3 <i>Preparación del medio para el semen</i> .....	35
5.6.4 <i>Manejo del semen para fertilización <i>in vitro</i></i> .....	35
5.6.4.1 <i>Cálculo del volumen de semen para fertilización <i>in vitro</i></i> .....	36
<b>5.7 Cultivo <i>in vitro</i></b> .....	<b>36</b>
5.7.1 <i>Preparación del medio de cultivo</i> .....	36
5.7.2 <i>Manejo de los ovocitos para el cultivo <i>in vitro</i></i> .....	37
<b>5.8 Análisis estadístico</b> .....	<b>37</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>38</b>

<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>46</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>47</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grados de expansión de los ovocitos de bovino.....	13
Tabla 2. Grados de clasificación de los complejos ovocito- <i>cummulus</i> de bovino.....	33
Tabla 3. Porcentajes de maduración, índice de expansión del <i>cumulus</i> (CEI), porcentaje de segmentación y blastocistos de ovocitos madurados con diferentes concentraciones de $\alpha$ -tocoferol.....	39
Tabla 4. Porcentajes de maduración, índice de expansión del <i>cumulus</i> (CEI), porcentaje de segmentación y blastocistos de ovocitos madurados con diferentes concentraciones de quercetina.....	42

## 1. INTRODUCCIÓN

La habilidad de generar grandes cantidades de embriones de bovino *in vitro* a un costo relativamente bajo ha sido un beneficio enorme para el estudio de su desarrollo temprano. Sin embargo, hay retos significativos asociados con la tecnología que gira en torno a cuestiones de la calidad de los ovocitos al final del proceso y la calidad de los embriones. La producción *in vitro* de los embriones (PIV) de rumiantes es un proceso de tres pasos que incluye la maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos, fertilización *in vitro* (FIV) y el cultivo *in vitro* (FIV) (Lonergan y Fair, 2014). La maduración de los ovocitos es un proceso largo y complejo durante el cual el gameto femenino adquiere la habilidad de ser fertilizado, así como mantener el desarrollo del embrión *in vitro* a la fase de blastocisto, y probablemente, el desarrollo a término *in vivo* (Nogueira da Costa *et al.*, 2015). Dos de los inconvenientes más importantes de los sistemas de maduración *in vitro* es la falta de antioxidantes y la alta concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en ingles). Las ROS son moléculas oxidantes poderosas que pueden alterar estructuralmente a muchas moléculas, llevando a un mal funcionamiento. Las ROS son consideradas responsables en parte de la baja eficiencia de producción de embriones bovinos *in vitro* (Khan *et al.*, 2017). En fisiología normal, las ROS están involucradas en procesos de señalización contribuyendo al desarrollo normal y función celular. Para alcanzar y mantener los niveles fisiológicos de ROS, hay un balance dinámico entre la generación de ROS y la actividad de antioxidantes para reducir las ROS (Schoot *et al.*, 2018). Cuando los ovocitos y embriones son cultivados *in vitro*, se enfrentan al estrés oxidativo ya que la recuperación y el cultivo involucra exposición a la luz, concentraciones elevadas de oxígeno y concentraciones alteradas de substratos metabólicos (Jeong *et al.*, 2006; Remião *et al.*, 2016; Chowdhury *et al.*, 2017). Además, entre los factores que pueden influenciar el ambiente de cultivo, el estrés oxidativo, el cual es inducido por la gran tensión de oxígeno ha recibido especial atención en los últimos años (Rocha-Frigoni *et al.*, 2016); ya que resulta en el envejecimiento prematuro de los ovocitos por la producción aumentada de las ROS (Chowdhury *et al.*, 2017). Si no se remueven rápida y efectivamente de las células, las ROS pueden dañar un gran rango de macromoléculas, llevando, posiblemente a la muerte celular. Por lo tanto, las ROS, deben ser inactivados continuamente para mantener niveles fisiológicamente tolerables que jueguen un papel normal en las funciones celulares (Jeong *et al.*, 2006). Un método que puede ayudar a sobrellevar este problema es

la suplementación del medio de maduración *in vitro* con compuestos antioxidantes. Se ha reportado que la adición de antioxidantes al medio de maduración *in vitro* disminuye los niveles de ROS y aumenta el rango de producción de blastocitos (Remião *et al.*, 2016). La vitamina E, un antioxidante liposoluble predominante en células animales, es considerada como un removedor mayor de ROS (Zhang *et al.*, 2012). Su forma activa homóloga es el  $\alpha$ -tocoferol el cual protege a las membranas celulares de la oxidación al reaccionar con las especies reactivas de oxígeno y los radicales lipídicos producidos en la peroxidación lipídica (Takahashi, 2007). Así mismo, la quercetina es un flavonoide natural encontrado en plantas, tiene propiedades terapéuticas y un potencial antioxidante, y su presencia ha promovido excelentes porcentajes de maduración y desarrollo de blastocitos mediante la reducción de los niveles intracelulares de ROS (Silva *et al.*, 2019). Con base en lo anterior, el objetivo de este estudio es la evaluación antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol y la quercetina sobre la maduración *in vitro* de los ovocitos y su desarrollo hasta blastocistos. Los resultados obtenidos de esta investigación podrán ser útiles para el incremento de la calidad de los ovocitos y de los embriones durante el manejo y procedimientos *in vitro*.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Producción de embriones *in vitro*

La producción de embriones *in vitro*, se refiere a los procedimientos llevados a cabo en el laboratorio, incluyendo maduración *in vitro*, fertilización y cultivo *in vitro*, requeridos para producir embriones de ovocitos inmaduros (Viana et al., 2012).

En el ganado bovino, el ciclo reproductivo natural lleva al nacimiento de una cría al año. Para incrementar el porcentaje de diseminación de animales con alto merito genético, se utilizan las técnicas de reproducción asistida, ya que pueden aumentar el número de crías por año. Los procedimientos estándar involucran el aumento de ovocitos fertilizables a través de la estimulación ovárica, recuperación de embriones a través de lavados uterinos y su transferencia. La producción de embriones *in vitro* representa un método para incrementar el número de embriones transferibles al realizar maduración, fertilización y crecimiento *ex vivo*, lo cual permite una colección rápida y frecuente de los gametos (Plourde et al., 2012).

La producción de embriones *in vivo*, así como *in vitro*, han destacado como unas de las mejores biotecnologías en el ganado, dada la ganancia genética que se obtiene en los hatos y por reflejar directamente la productividad del ganado en animales de leche y carne. Estas biotecnologías reproductivas se unieron para mejorar los programas de mejoramiento genético y se han posicionado como herramientas estratégicas para mejorar la producción animal. La producción de embriones *in vitro* ha sido la técnica que más se ha expandido en los años recientes, y que ofrece una amplia variedad de aplicación a una escala comercial (Cavalieri et al., 2017).

En la especie bovina, la criopreservación del semen y la inseminación artificial son actualmente las principales técnicas de reproducción asistida utilizadas. Sin embargo, la PIV ha surgido como una tecnología interesante para objetivos específicos de reproducción en el ganado (Martínez et al., 2019). Las técnicas de PIV son atractivas debido a las posibilidades de producción masiva de embriones de bovino para transferencia, diagnóstico embrionario, cultivo de células somáticas y clonación embrionaria, y para la producción de vacas transgénicas, así como la investigación básica de los mecanismos de fertilización y embriogénesis (Hoshi, 2003). Los protocolos de rutina de producción de embriones *in vitro* están caracterizados por el cultivo de ovocitos y embriones en grupos (Gooaverts et al., 2010).

Por lo anterior, el número de embriones producidos *in vitro* por año en la industria comercial de transferencia de embriones bovinos ha crecido, incrementando la demanda del mejoramiento de la

tecnología de fertilización *in vitro*. Sin embargo, la eficiencia de la PIV permanece baja, probablemente porque el ambiente *in vitro* no puede imitar el ambiente *in vivo* resultando en embriones con una calidad alterada (Sirard *et al.*, 2006; Lonergan y Fair, 2014; Maruri *et al.*, 2018).

La habilidad de generar grandes cantidades de embriones *in vitro* a un costo relativamente bajo ha sido un beneficio enorme para el estudio de su desarrollo temprano. Sin embargo, hay retos significativos asociados con la tecnología que gira en torno a cuestiones de la calidad de los ovocitos al durante o al final del proceso de maduración (Sirard *et al.*, 2006) y la calidad de los embriones. La PIV de rumiantes es un proceso de tres pasos que incluye la maduración *in vitro* de los ovocitos, fertilización *in vitro* y el cultivo *in vitro*. En términos de eficiencia, en ganado bovino lechero, aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros, generalmente recuperados de folículos en etapas desconocidas del ciclo estral, se someten a maduración nuclear *in vitro* de la profase I a la metafase II (la etapa en la cual hubieran sido ovulados *in vivo*) y a una maduración citoplasmática. Sin embargo, solo del 30% al 40% de tales ovocitos alcanzan la fase de blastocisto, en la cual pueden ser transferidos a una hembra receptora o ser congelados para su uso en un futuro (Lonergan y Fair, 2014; Lucas *et al.*, 2015; Martínez *et al.*, 2019).

En las técnicas de reproducción asistida, los ovocitos utilizados para MIV son obtenidos de folículos en diferentes etapas del desarrollo y por lo tanto constituyen una población heterogénea con diferentes niveles de competencia. Cuando estos ovocitos son removidos del ambiente folicular, reinician la meiosis automáticamente. Los ovocitos que aún no han completado la maduración citoplasmática son incapaces de convertirse en embriones viables. Por lo tanto, la remoción prematura de los ovocitos de los folículos y su condición subsecuente en la MIV son principalmente los factores responsables de la poca habilidad de desarrollo de los ovocitos que maduraron *in vitro*, comparados con aquellos que maduraron *in vivo* (Guimarães *et al.*, 2015).

En los últimos años, se ha intentado determinar cuáles condiciones son necesarias durante los procesos de MIV, FIV y CIV para mejorar la producción de embriones y optimizar la técnica, incrementando su uso en un futuro cercano (Fabjan *et al.*, 2014). El uso de suplementos químicos representa un método alternativo en el mejoramiento de la MIV. Estos aditivos incrementan la efectividad del medio de cultivo, por ejemplo, al actuar como antioxidantes, y permiten a los ovocitos inmaduros adquirir competencia para la fertilización y la embriogénesis (Lucas *et al.*, 2015).

## **2.2 Recolección y manejo de los ovarios**

La maduración de ovocitos *in vitro* se considera un paso fundamental para el avance de biotecnologías como la fecundación y PIV (Huanca *et al.*, 2007). Los ovocitos pueden provenir de

diferentes fuentes, incluyendo la recuperación *post mortem* de ovarios de sacrificio, así como la aspiración guiada por ultrasonido (OPU, por sus siglas en inglés), en repetidas ocasiones, de complejos cumulus-ovocito (COCs, por sus siglas en inglés) recuperados vía transvaginal en donadoras vivas (Gooaverts *et al.*, 2010). La obtención de ovarios provenientes de hembras sacrificadas en el matadero permite el suministro de una fuente abundante de ovocitos a bajo costo, los que pueden ser madurados, fertilizados y cultivados *in vitro* (una vez fecundados) hasta estados avanzados del desarrollo embrionario (Huanca *et al.*, 2007).

Algunos factores técnicos importantes para la PIV son la temperatura, el tiempo de almacenamiento y la manipulación de los ovarios obtenidos de sacrificio (Huanca *et al.*, 2007; Gooaverts *et al.*, 2010). Dado a que, bajo condiciones de campo no siempre es posible la rápida colecta y transporte de los ovarios de vuelta al laboratorio. Esto debido a la dependencia de los mataderos, ya que los animales no pueden ser sacrificados en un corto tiempo (los animales son recibidos en el matadero a diferentes horas durante el día), además de la distancia entre el matadero y el laboratorio (García-Álvarez *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2011). Debido a esto, se deben disminuir los efectos adversos, ya que los ovocitos inmaduros son particularmente sensibles a su ambiente. Las condiciones apropiadas durante el transporte de los ovarios son de gran importancia para mantener la viabilidad de los ovocitos, ya que, si se llegara a presentar inclusive un ligero cambio en la temperatura o la solución de preservación durante el transporte de los ovarios, puede tener un gran efecto en la competencia al desarrollo de los ovocitos durante los procedimientos *in vitro* (Wang *et al.*, 2011). Por lo anterior, algunos autores han reportado que los ovarios pueden permanecer en solución salina a una temperatura de 30 a 37 °C durante 8 h sin llegar a afectar su calidad ni los procesos MIV y FIV (Huanca *et al.*, 2007).

### **2.3 Técnicas de recuperación de los ovocitos**

Un programa de producción de embriones exitoso depende de muchos factores, uno de los cuales es la recuperación eficiente de los COCs. Un gran número de ovocitos de buena calidad son necesarios para una producción de embriones exitosa, ya que aproximadamente solo el 30% de los ovocitos de bovino recuperados pueden convertirse en blastocistos (Sirard *et al.*, 2006; Dadashpur *et al.*, 2012; Lonergan y Fair, 2014).

Durante varias décadas, la punción y aspiración de folículos ováricos han sido utilizadas para la recuperación de ovocitos para la PIV en bovinos. Varias actualizaciones completas revisando la producción *in vitro* y la transferencia de embriones en animales domésticos, indican que la disponibilidad de ovocitos de buena calidad es un prerrequisito para el éxito (Gooaverts *et al.*, 2010).

En la producción de embriones utilizando ovocitos colectados de ovarios obtenidos de sacrificio, es necesario desarrollar métodos para facilitar la recuperación de varios ovocitos de buena calidad por ovario (Dadashpur *et al.*, 2012). Se han empleado diferentes técnicas de colección de ovocitos para obtener el máximo de ovocitos de buena calidad. La disección de los ovarios y la aspiración folicular son técnicas usadas rutinariamente para la recuperación de los ovocitos de ovarios provenientes del matadero (Dinkar y Shankar, 2013).

Los porcentajes de recuperación de ovocitos varía, entre el 32 y 90% dependiendo del procedimiento de aspiración utilizado. Un método conveniente y económico para recolectar un gran número de ovocitos para los procedimientos *in vitro* es mediante la aspiración de los folículos visibles en la superficie de los ovarios (Dadashpour *et al.*, 2012). La aspiración folicular es un método ampliamente utilizado dado a la velocidad de operación (Mutha y Uma, 2012). En estudios anteriores, se ha reportado que, al incrementar el tamaño de las agujas en su diámetro interno de 0.6 mm a 0.7mm, la recuperación de los ovocitos podría aumentar de un 42 a un 58%, sugiriendo que las agujas más finas pudiesen ser muy pequeñas para permitir el paso de la masa de *cumulus* preovulatoria ya expandida. En bovinos, en ovarios *post-mortem*, los folículos son aspirados utilizando agujas de 18 a 22 G y jeringas de 3 a 20 mL, o agujas de 16 a 19 G cuando se utiliza presión de vacío desde 75 a 100 mmHg (Fry *et al.*, 1996).

## **2.4 Selección y clasificación de los ovocitos**

Hay muchos factores que pueden afectar la eficiencia de la producción de embriones *in vitro* en especies mamíferas. Sin embargo, la madurez y la calidad de los ovocitos posiblemente juegan un rol esencial en la determinación de su competencia de desarrollo. Mientras es relativamente fácil determinar la madurez meiótica, no hay un método rápido y económico para estimar la madurez citoplasmática de los ovocitos, la cual es predominantemente responsable por el resultado principal de la PIV, es decir, el rango de formación de blastocistos (Opiela y Kątska, 2013).

La selección de ovocitos inmaduros destinados para la maduración *in vitro* aún está basada en características morfológicas de los COCs, ya que es considerada como no invasiva y rápida de realizar. Adicionalmente, otras técnicas pueden causar muerte celular o son caras. Por otra parte, es bien sabido que solo utilizar el criterio morfológico no es un determinante efectivo de los factores de calidad (Alcoba *et al.*, 2017).

Antes de la MIV, los COCs son usualmente seleccionados basados en el tamaño del folículo del cual provienen y criterios morfológicos tales como la presencia de varias capas de células del *cumulus* compactas y citoplasma homogéneo. Estos criterios de selección permiten excluir a los

ovocitos en etapas tempranas de crecimiento folicular, pero no permiten discriminar entre ovocitos en etapas finales de desarrollo folicular y ovocitos que ya la han completado, ya que ambas poblaciones son morfológicamente indistinguibles (Toranzo *et al.*, 2018).

El criterio de selección de los COCs es extremadamente importante para una MIV exitosa. Como se mencionó, la morfología del citoplasma y células del *cumulus* alrededor de los ovocitos es el criterio principal para la calificación y selección de los ovocitos para la MIV (Alm *et al.*, 2005; Mirshamsi *et al.*, 2013). Los ovocitos normales deben tener células del cúmulo rodeando la zona pelúcida, ausencia de rompimientos en la zona pelúcida y ausencia de vesículas en el ooplasma (Dinkar y Shankar, 2013). Los ovocitos recuperados se podrían clasificar en calidad excelente, bueno, suficiente y pobre dependiendo del revestimiento del *cumulus* y la distribución citoplasmática. Los ovocitos de excelente calidad son los que poseen más de cuatro capas de células del *cumulus* compactas con el citoplasma granulado uniformemente. Los ovocitos buenos poseen al menos dos a cuatro capas de células del *cumulus* con el citoplasma granulado uniformemente. En cambio, los ovocitos de calidad suficiente tienen solo una capa de células del *cumulus* compactas con el citoplasma uniformemente granulado. Los ovocitos de calidad pobre no tienen células del *cumulus* o tienen una capa incompleta o células expandidas, con un citoplasma oscuro o granulado desordenadamente. Es deseable seleccionar ovocitos de calidad excelente o buena para el proceso de maduración, fertilización y cultivo *in vitro* (Dinkar y Shankar, 2013).

Cuando se utiliza un lote grande de ovarios provenientes del sacrificio, donde todos los COCs colectados están mezclados después de la aspiración, se pierde el conocimiento sobre el antiguo ambiente folicular (Jewgenow *et al.*, 2019). Estos COCs inmaduros necesitan ser ordenados según su calidad antes de la maduración. El objetivo es eliminar los ovocitos con un potencial de desarrollo deteriorado del sistema de producción desde el principio. Esto debería beneficiar la capacidad de desarrollo de los ovocitos restantes e incrementar la eficacia y eficiencia del procedimiento de PIV (Gooaverts *et al.*, 2010).

Uno de los problemas más importantes en la PIV es la necesidad de selección de los ovocitos y cigotos, un punto crucial para mantener un alto rendimiento en la producción *in vitro* (Mirshamsi *et al.*, 2013; Coello *et al.*, 2019). Es complicado encontrar un solo factor o característica que pueda ser utilizada como un indicador de la competencia del ovocito (Coello *et al.*, 2019). Asimismo, la selección de ovocitos competentes para el desarrollo basado en su morfología es comúnmente influenciada por juicio personal y por la falta de estándares universales (Mirshamsi *et al.*, 2013). Además, se conoce que la variación morfológica significativa que existe entre los ovocitos puede afectar el desarrollo y la implantación de los embriones derivados, así como su habilidad de llegar a

la etapa de blastocistos, siendo solo el 40% de los ovocitos seleccionados los que alcanzan esta etapa posterior a la fecundación (Balaban y Urman, 2006; Jackowska *et al.*, 2008; Samaniego *et al.*, 2017).

## 2.5 Maduración *in vitro* de los ovocitos

Durante el desarrollo fetal, los ovocitos de bovino se mantienen en profase I de la primera división meiótica, conocida como la fase de vesícula germinal (GV, por sus siglas en inglés). Antes de cada ovulación, la meiosis del ovocito en el folículo dominante se reanuda después del pico de LH; la mitad de los cromosomas son extruidos en la forma del primer cuerpo polar y el ciclo celular se pausa de nuevo, esta vez en la metafase de la segunda división meiótica. La reanudación de la primera división meiótica, progresión hasta la metafase II, y el acompañamiento de los cambios citoplasmáticos que son requeridos para que el ovocito sea capaz de una fertilización normal se llama colectivamente como maduración ovocitaria (Machaty *et al.*, 2012). La maduración de los ovocitos es un proceso largo y complejo durante el cual el gameto femenino adquiere la habilidad de ser fertilizado, así como mantener el desarrollo del embrión *in vitro* a la fase de blastocisto, y probablemente, el desarrollo a término *in vivo* (Nogueira da Costa *et al.*, 2015).

La MIV se ha convertido en una técnica de rutina realizada para producir ovocitos maduros para la investigación de embriones (Fanz *et al.*, 2017). Sin embargo, representa uno de los pasos clave que limitan la producción *in vitro* de embriones viables (Buroszewka *et al.*, 2015). Durante la MIV, los ovocitos retoman la meiosis después de ser liberados del ambiente folicular inhibitorio de la meiosis y en condiciones de cultivo apropiadas. Sin embargo, es reconocido que la capacidad de desarrollo de los ovocitos madurados *in vitro* se ve comprometida en comparación con aquellos madurados *in vivo*. Estudios previos han demostrado que el medio de MIV de ovocitos podría afectar el desarrollo embrionario, número de blastocistos, y la apoptosis (Fanz *et al.*, 2017). Los ovocitos bovinos son colectados cuando son inmaduros, y las etapas finales de maduración son completadas *in vitro* bajo la influencia de aditivos en el medio de cultivo incluyendo, pero no limitándose a, gonadotropina coriónica humana (hCG), hormona folículo estimulante (FSH) y/o hormona luteinizante (LH) (Walls y Harts, 2018), y posteriormente cultivados en condiciones de cultivo celular estándar durante 24-48 h hasta que alcancen la metafase II (Gilchrist y Thompson, 2007; Akar *et al.*, 2018). Una pequeña proporción (30% al 40%) de estos ovocitos madurados *in vitro* tienen desarrollo completo hasta el término alcanzando la etapa de blastocisto (Gilchrist y Thompson, 2007; Lonergan y Fair, 2014; Lucas *et al.*, 2015; Martínez *et al.*, 2019).

La eficiencia de las técnicas de MIV de los ovocitos está limitada por la competencia de desarrollo intrínseco del ovocito (Gilchrist y Thompson, 2007), y se puede definir como la habilidad

del ovocito para completar una serie de eventos (los cuales se describen más adelante) para poder generar descendencia saludable. Estos eventos comienzan con la habilidad del ovocito para completar su maduración y después pasar por una fertilización exitosa, segmentación y alcanzar la etapa de blastocisto produciendo un embrión de buena calidad. Aunque el tener éxito en uno de estos eventos no garantiza éxito en el siguiente, la maduración de los ovocitos es considerada un paso crucial que influye en el éxito de la fertilización y el desarrollo embrionario subsecuente (Marei *et al.*, 2014).

La MIV de los ovocitos se ha vuelto parte integral de la producción de embriones y una herramienta útil para entender los factores que influyen en la capacidad de desarrollo de los ovocitos. La adquisición de una capacidad completa de desarrollo por parte del ovocito depende de la comunicación bidireccional entre el vestimiento del *cúmulus* y el ovocito, y la interacción apropiada entre ambos tipos de células es indispensable para un desarrollo apropiado y el subsecuente desarrollo del embrión (Moussa *et al.*, 2018). Durante la maduración ovocitaria, las células del cúmulo pasan por un proceso de expansión, el cual es inducido por la estimulación de gonadotropinas *in vivo* o *in vitro* y lleva a una producción masiva de moco extracelular de la matriz (principalmente ácido hialurónico, AH). La maduración de los ovocitos también incluye cambios bioquímicos y moleculares que son importantes para activar la maquinaria del ciclo celular que regulan los eventos nucleares y citoplasmáticos durante la maduración. Estos mecanismos de regulación molecular son complejos y determinan la competencia de desarrollo intrínseco de los ovocitos (Marei *et al.*, 2014).

En la especie bovina, los porcentajes de desarrollo de la etapa de blastocistos *in vivo* casi duplican a aquellos obtenidos por ovocitos madurados *in vitro* (31.7 vs. 48.5%; Rizo *et al.*, 2002), limitando el potencial de la productividad de la PIV. La reducida habilidad de desarrollo de los ovocitos madurados *in vitro* puede explicarse como una consecuencia de las condiciones subóptimas para la maduración del ovocito, pero el crecimiento folicular incompleto de algunos ovocitos usados para la MIV, y una deficiente maduración nuclear, citoplasmática y molecular pueden ser también responsables (Toranzo *et al.*, 2018). La maduración funcional completa del ovocito, incluyendo la nuclear, citoplasmática, y componentes de membrana, es necesaria para que el ooplasma sea capaz de reprogramar el núcleo para el espermatozoide fertilizante, se logre promover la formación pronuclear del macho, y se dé inicio la primera división mitótica celular en el embrión recién formado (Machaty *et al.*, 2012).

### 2.5.1 Maduración citoplasmática

En años recientes, los esfuerzos se han intensificado para poder madurar y fertilizar exitosamente los ovocitos *in vitro*, y posteriormente cultivar los embriones asegurando las etapas transferibles de un gran número de especies de mamíferos. Para la mayoría de las especies, solo es posible obtener un desarrollo máximo de 40 – 50% de los cigotos a la etapa de blastocistos. La competencia de desarrollo reducida de los ovocitos se sugiere es la primera razón para el potencial reducido de embriones producidos *in vitro*, además de que la selección rutinaria de los COCs puede excluir ovocitos en etapas de crecimiento folicular temprano o no discriminar ovocitos que ya completaron su desarrollo (Toranzo *et al.*, 2018). La vasta mayoría de los ovocitos madurados *in vitro* son obtenidos de folículos antrales tempranos y estos son meióticamente competentes, sin embargo, muchos no obtienen un diámetro óptimo antes de la fertilización y además demuestran anomalías inducidas por el medio de cultivo en el desarrollo embrionario, número de blastocistos y apoptosis (Watson, 2015).

Los ovocitos adquieren su competencia de desarrollo durante el crecimiento y la maduración. (Marei *et al.*, 2012). La maduración citoplasmática incluye aquellos eventos que le dan al ovocito la capacidad de completar la maduración nuclear, fertilización, y embriogénesis temprana y así proporcionar una base para la implantación, iniciación de la preñez, y un desarrollo fetal normal. En términos generales, involucra la acumulación, uso y degradación selectiva de ARNm, proteínas, substratos y nutrientes que son requeridos para alcanzar el desarrollo competitivo del ovocito que abarca la competencia del desarrollo embrionario (Watson, 2015).

Aunque existen distintos procesos, la maduración nuclear y citoplasmática están entrelazadas en eventos que ocurren simultáneamente a tiempos determinados, aunque la programación molecular del citoplasma puede ya haber empezado durante la fase de crecimiento del ovocito (Ferreira *et al.*, 2009).

#### 2.5.1.1 Redistribución de los organelos: rol de la mitocondria en la maduración citoplasmática

Está bien establecido que se pueden observar severos cambios ultraestructurales en cuanto a la morfología y redistribución de los organelos citoplasmáticos durante la maduración de los ovocitos. El tráfico de los organelos citoplasmáticos durante la maduración ocurre a través de la acción de los microfilamentos citoesqueléticos y los microtúbulos, y el reposicionamiento de los organelos depende de las necesidades de la célula en cada etapa del desarrollo (Ferreira *et al.*, 2009).

La mitocondria juega un rol extremadamente importante dado a que es un componente clave de la maquinaria metabólica responsable del suplemento de energía que se consume durante el proceso de maduración. El movimiento de la mitocondria a áreas de alto consumo de energía es crucial para los ovocitos y el blastómero embrionario durante los periodos críticos del ciclo celular (Ferreira *et al.*, 2009), ya que la mitocondria provee energía/metabolitos a regiones específicas en el ovocito y está asociada a la producción de energía para asegurar el desarrollo subsecuente del embrión (Suzuki *et al.*, 2005).

En particular, la organización y continua actividad metabólica de la mitocondria son características necesarias de la maduración citoplasmática y reanudación de la meiosis afectando el desarrollo subsecuente después de la fertilización (Stojkovic *et al.*, 2001). En los ovocitos de bovino, la relocalización principal de la mitocondria ocurre durante la maduración *in vitro* y está influenciada por hormonas y substratos energéticos en el medio de maduración (Stojkovic *et al.*, 2001). Es importante que las mitocondrias se distribuyan uniformemente al final del tiempo de maduración para asegurar la misma división entre las células hijas durante la segmentación y el desarrollo embrionarios normal (Marei *et al.*, 2012).

### 2.5.2 Maduración nuclear

Una característica única de los ovocitos de mamíferos es su capacidad para mantener un detenimiento prolongado de la profase I que se extiende desde la vida fetal hasta la adultez. En este periodo el ovocito existe dentro del ovario como un folículo primordial rodeado de células de la granulosa inactivas. Este ciclo celular se mantiene conforme el folículo primordial entra en el grupo de folículos en crecimiento para incrementar su volumen. Antes del pico preovulatorio de gonadotropinas, los ovocitos de los mamíferos se encuentran detenidos en la fase diploteno de la primera profase meiótica dentro de los folículos ováricos. Estos están rodeados de capas compactas de células del *cumulus*, formando el complejo *cumulus*-ovocito, esta etapa también es conocida como etapa de VG. Una vez que su crecimiento está casi completo (aproximadamente al 80% de su tamaño final), el ovocito ha acumulado todos los transcritos requeridos para su progresión meiótica y fertilización, y ahora es conocido como meióticamente competente, durante este periodo, un complejo sistema regulatorio que involucra al ovocito y las células somáticas del folículo se asegura que el estado de VG se mantenga detenido hasta la ovulación. Bajo la estimulación del pico de la LH en la ovulación junto con una descarga de CDK1 (quinasa, también conocida como factor promotor de la maduración, que precipita la reanudación de los eventos de la meiosis), se lleva a cabo el rompimiento

del detenimiento de la fase de VG, teniendo como resultado la disolución de las láminas nucleares. Esto induce el rompimiento de la VG, el ovocito completamente crecido reinicia la meiosis, el núcleo prominente desaparece seguido de la condensación de los cromosomas y de la disolución de la membrana nuclear, indicado por la ruptura de la vesícula germinal (GVDB, por sus siglas en inglés). Conforme los microtúbulos se organizan en el huso bipolar y todos los cromosomas se alinean en el huso ecuatorial, la meiosis continúa con la segregación de los cromosomas, una división asimétrica de los ovocitos y la expulsión del primer cuerpo polar llegando a la metafase I, seguido de la entrada a la meiosis II en donde se da una segunda división y un segundo detenimiento en la metafase II (un ovocito ha madurado nuclearmente al alcanzar M II) hasta la fertilización. La finalización de estos eventos secuenciales nucleares generalmente se le conoce como maduración nuclear (Wang y Sun, 2007; Mlynářčiková *et al.*, 2009; Holt *et al.*, 2013). En condiciones *in vitro*, los ovocitos de mamífero pueden reiniciar la meiosis espontáneamente cuando se les libera de los folículos antrales y son cultivados bajo condiciones favorables (Liang *et al.*, 2007).

## **2.6 Métodos de evaluación de la maduración de COCs**

### *2.6.1 Expansión de las células del cumulus*

Las biotecnologías de la reproducción son disciplinas que están dinámicamente desarrollándose. En parte, su progreso depende de una suficiente cantidad de ovocitos de calidad que sean útiles para varios procedimientos, tales como fertilización *in vitro*, clonación mediante la transferencia nuclear de células somáticas y transgénesis. La calidad de los ovocitos es determinada por la terminación de la maduración nuclear y citoplasmática y la adquisición de la competencia de desarrollo. En estos procesos, se requiere la comunicación celular entre el ovocito y las células del *cumulus* que lo rodean, así como la expansión de las células del *cumulus* (Nevoral *et al.*, 2014).

Las células con una matriz extracelular adyacente constituyen el *cumulus*, un componente esencial de los COCs. El *cumulus* rodea al ovocito durante el crecimiento y la maduración meiótica consecutiva del ovocito, ovulación, fertilización y desarrollo embrionario temprano. Durante la maduración meiótica del ovocito, las células del *cumulus* cambian su morfología y actividad metabólica. Por lo tanto, las células del *cumulus* influyen significativamente en la maduración del ovocito y la adquisición de su competencia del desarrollo. Las células del *cumulus* son importantes en la síntesis de una gran cantidad de la matriz extracelular lo cual provoca el crecimiento de los complejos *cumulus*-ovocito. Este fenómeno se conoce como expansión del *cumulus*, la cual tiene lugar en el folículo poco antes de la ovulación *in vivo*, así como durante la maduración meiótica *in vitro* (Nevoral *et al.*, 2014).

Una de las formas de evaluar la maduración de los ovocitos es mediante la expansión de las células del *cumulus*. Después del pico de gonadotropinas, se inicia una diferenciación de la matriz extracelular (ECM) en el complejo *cumulus* ovocito. Durante este proceso, conocido como expansión del *cumulus*, las células del *cumulus* producen una gran cantidad de ácido hialurónico (AH), proteínas de la matriz extracelular y proteoglicanos. Los componentes activos del *cumulus* del ECM son sintetizados directamente por las células del *cumulus* bajo el control de factores endocrinos y derivados del ovocito, secretados por las células murales de la granulosa, o que entraron al folículo por el plasma sanguíneo. Una composición apropiada y la formación del EMC del *cumulus* es esencial para la ovulación, el paso del ovocito a través del oviducto y para la fertilización (Mlynarčíková *et al.*, 2009). Los grados de la expansión de las células del *cumulus* pueden ser utilizados como un indicador morfológico para la maduración de los ovocitos. Así que, se puede decir que las células del *cumulus* expandidas indican una probable maduración y ovocitos de buena calidad mientras que unas células del *cumulus* compactas caracterizan a los ovocitos inmaduros (Dinkar y Shankar, 2013).

### 2.6.2. Índice de Expansión del Cumulus

Diversos autores han evaluado la expansión de las células del *cumulus* como un indicador de maduración, asignándoles una calificación según su grado de expansión del 0 a 4 una vez concluido el periodo de MIV (Nagiová *et al.*, 2000). Los grados de expansión se describen en la Tabla 1 a continuación:

**Tabla 1.** Grados de expansión de los ovocitos de bovino de acuerdo con Nagiová et al., (2000).

CLASIFICACIÓN	CARACTERÍSTICAS
Grado 0	No hubo una respuesta detectable
Grado 1	Las células del <i>cumulus</i> periféricas tienen un aspecto brillante.
Grado 2	Expansión de las células periféricas del <i>cumulus</i>
Grado 3	Expansión de todas las células del <i>cumulus</i> excepto por las células de la corona radiada.
Grado 4	Expansión de las células del <i>cumulus</i> incluyendo las células de la corona radiada.

Funsho y Downs (1990), desarrollaron el índice de expansión del *cumulus* (CEI, por sus siglas en inglés), al igual que lo que realizan otros autores actualmente, se les designa una calificación a los ovocitos, sin embargo, el CEI permite el cálculo del valor promedio de expansión de un grupo en particular. Los COCs que muestran poca expansión tienen un CEI cercano a “0”, mientras que aquellos que tienen expansión completa y casi completa se estipula que tienen un CEI cercano a “4”; por ejemplo, si al final de un grupo de cultivo de 55 complejos, exhibieron las siguientes expansiones: “0”, 20; “+1”, 20; “+2”, 10; “+3”, 5; “+4”, 0; entonces el CEI de este grupo sería  $[(0 \times 20) + (1 \times 20) + (2 \times 10) + (3 \times 5) + (4 \times 0)] / 55 = 55 / 55 = 1.00$ . El valor “0.5” fue establecido como el valor que determina si la expansión del *cumulus* ha sido o no estimulada. Este valor fue elegido porque al menos una mitad de los complejos deberían haberse expandido en lo mínimo (puntaje “+1”). Se debe enfatizar que los puntajes de expansión es un proceso subjetivo, sin embargo, el CEI ha demostrado ser útil al hacer comparaciones cualitativas entre diferentes grupos de tratamientos (Funsho y Downs, 1990).

### 2.6.3 Expulsión del primer cuerpo polar

La expulsión del primer cuerpo polar es indicadora de la maduración nuclear de los ovocitos. La evaluación de la morfología del primer cuerpo polar es útil para distinguir la edad post ovulatoria del ovocito. Además, el rompimiento de la VG y la expulsión simultánea del primer cuerpo polar indica el término de la primera división meiótica. En adición, la expulsión del primer cuerpo polar es un marcador que indica que el ovocito está listo para sobrellevar el proceso de fertilización (Halvaei *et al.*, 2011). La evaluación de la expulsión del primer cuerpo polar se realiza mediante la remoción de las células del *cumulus*, mediante pipeteo constante o mediante el uso de un vórtex, utilizando hialuronidasa por un periodo de dos a tres minutos; posteriormente son lavados en medio de cultivo y son observados bajo el microscopio invertido o estereoscopio para determinar la presencia del primer cuerpo polar (Halvaei *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2018).

### 2.6.4 Evaluación de la actividad mitocondrial

Torner *et al.* (2004) y El-Raey *et al.* (2011) confirmaron en estudios previos que la reorganización mitocondrial y la alta actividad metabólica son características necesarias para la maduración citoplasmática y la reanudación de la meiosis en los ovocitos. Ellos concluyen que la MIV de los ovocitos está asociada a los cambios en la distribución de las mitocondrias activas, y que las condiciones *in vitro* pueden causar un movimiento incompleto de las mitocondrias al citoplasma interior y esto puede afectar la maduración citoplasmática, por lo cual la actividad y la distribución

de la mitocondria es evaluada para determinar la maduración citoplasmática de los ovocitos post maduración (Torner *et al.*, 2004; El-Raey *et al.*, 2011). Un método para evaluar la actividad de las mitocondrias es mediante la tinción MitoTracker Red<sup>®</sup>, la cual tiñe selectivamente las mitocondrias activas, las cuales acumulan la tinción dependiendo de la permeabilidad de su membrana y el potencial de retención después de la fijación. Esto se realiza mediante la denudación de los ovocitos por pipeteo constante en medio de cultivo, posteriormente son incubados en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS) conteniendo 5% de albumina sérica bovina (BSA) con 200 nM de MitoTracker Red<sup>®</sup>, por un periodo de 30 minutos bajo condiciones de cultivo. Una vez concluido este periodo de tiempo, los ovocitos son lavados tres veces con D-PBS sin BSA y son fijados con paraformaldehído al 2% (v/v) en D-PBS durante 15 minutos a 37°C. Una vez que fueron fijados, son lavados dos veces en D-PBS, montados en una laminilla bajo un cubreobjetos y son examinados inmediatamente a temperatura ambiente en un cuarto oscuro. La intensidad de fluorescencia se mide utilizando un microscopio de epifluorescencia, y posteriormente se toman fotografías de los ovocitos después de una excitación a una longitud de onda entre 510 a 560 nm (El-Raey *et al.*, 2011).

## **2.7 Fertilización *in vitro***

La fertilización *in vitro* (FIV) es el método *in vitro* que más asemeja la interacción gameto a gameto durante la fertilización *in vivo*. Se ha utilizado en repetidas ocasiones para determinar la fertilidad relativa de las muestras de semen en animales de granja, al evaluar diferentes puntos finales en etapas tempranas de desarrollo embrionario (Papadopoulos *et al.*, 2015).

Los ovocitos y espermatozoides están involucrados en el proceso de FIV. Los ovocitos y espermatozoides son dependientes del tiempo; en otras palabras, ambos tienen la habilidad de ser fertilizados o fertilizar los ovocitos con el tiempo limitado. Este tiempo limitado de los ovocitos y espermatozoides se conoce como periodo fértil. El periodo fértil corto o largo depende en gran parte de varios factores, tales como raza, temporada, edad del donador, estado nutricional del donador, calidad de los gametos, condiciones de cultivo y preservación incluyendo pH, osmolaridad, compuestos, gases, entre otras. El periodo fértil de los gametos es variable, incluso entre los mismos individuos. Por lo tanto, para una FIV exitosa, el tiempo es crítico. Los ovocitos y espermatozoides deben ser incubados juntos dentro de su periodo fértil, para asegurar que el número máximo de ovocitos maduros puedan ser fertilizados por espermatozoides apropiados y capacitados (Zhu *et al.*, 2018).

En general, la FIV se inicia entre 20 a 24 h después de la MIV, cuando es considerado que la mayoría de los ovocitos en el medio de maduración han alcanzado la metafase de la segunda división meiótica (MII) (Zhu *et al.*, 2018). Luego de un proceso de selección y capacitación espermática que permitirá a su vez deshacerse de componentes del plasma seminal, crioprotectores y espermatozoides muertos o con escasa vitalidad, esto se realiza mediante distintos sistemas de lavado e incubando a los espermatozoides en medios de composición comparables a la del fluido oviductal (Matás *et al.*, 2010). El semen congelado o refrigerado es utilizado en la mayoría de los laboratorios; sin embargo, algunos laboratorios aun prefieren utilizar semen fresco si está disponible por la calidad implícita en el semen fresco en comparación con el semen congelado (Zhu *et al.*, 2018).

### 2.7.1 Capacitación espermática *in vitro*

La capacitación espermática es un proceso anterior a la fertilización y es de importancia fundamental para generar un embrión viable de calidad superior (Maciel *et al.*, 2018). Se basa en cambios bioquímicos, biofísicos y moleculares del espermatozoide para penetrar y fertilizar exitosamente al ovocito, ocurren *in vivo*, durante el tránsito en el tracto reproductivo de la hembra, e *in vitro* en la presencia de un medio definido (Fábrega *et al.*, 2012; Maciel *et al.*, 2018).

En mamíferos, estos cambios fisiológicos en el espermatozoide incrementan la fluidez de la membrana plasmática e hiperpolarización, junto con la reorganización de las moléculas de la superficie (Maciel *et al.*, 2018). Durante la capacitación, los espermatozoides también presentan un incremento en la concentración intracelular de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y bicarbonato ( $\text{HCO}_3$ ), incremento del pH intracelular y fosforilación de proteínas, especialmente residuos de tirosina (Dalvit *et al.*, 1994; Naresh y Atreja, 2015; Maciel *et al.*, 2018). La hiperactivación mejora la motilidad espermática, la cual puede ser de ayuda cuando se liberan a los espermatozoides de los reservorios del oviducto y para penetrar la matriz extracelular del ovocito. Posteriormente, la reacción acrosomal comprende la exocitosis de los contenidos acrosomales que facilitan la penetración de la zona pelúcida y exponen los componentes de membrana requeridos para la fusión de los gametos (Naresh y Atreja, 2015).

En la mayoría de los casos, el medio de capacitación contiene sustratos energéticos (piruvato, lactato, glucosa), un aceptor de colesterol (normalmente albúmina),  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{HCO}_3$ , además de determinados electrolitos (Matás *et al.*, 2010). La inducción de la capacitación de los espermatozoides puede realizarse mediante el uso de sustancias fisiológicas como las células del *cumulus*, el fluido folicular, el fluido oviductal, la progesterona, las proteínas de la zona pelúcida y los glicosaminoglicanos como la heparina o cafeína (Gardón *et al.*, 2001).

Se conocen muchos factores que afectan la eficiencia de la FIV, tales como la calidad espermática, el macho, el ambiente, el tiempo apropiado de inseminación, y la capacitación apropiada de los espermatozoides descongelados. De hecho, los espermatozoides deben pasar bajo una capacitación para adquirir la habilidad de fertilizar. Este proceso, el cual ocurre *in vivo* en el tracto reproductor de la hembra, debe ser inducido *in vitro* (Boccia *et al.*, 2013).

Uno de los obstáculos iniciales en la rutina de FIV era la capacitación espermática *in vitro* (Parrish *et al.*, 1999), ya que una FIV exitosa tiene un mínimo de dos requerimientos básicos: espermatozoides capacitados y ovocitos maduros. Cuando los espermatozoides están completamente capacitados y son incubados con ovocitos maduros, la penetración del espermatozoide de la zona pelucida es rápida y sincronizada entre la población completa de ovocitos (Fraser y Quinn, 1981; Maciel *et al.*, 2018).

### 2.7.2 Métodos de selección de espermatozoides para fertilización *in vitro*

Los métodos de selección de semen son aplicados rutinariamente para preparar semen para la FIV en varias especies. Estos procedimientos son utilizados para mejorar la calidad en las características espermáticas y para remover el plasma seminal y crioprotectores, así como otro material de fondo y restos. Varios métodos están disponibles para la preparación de los espermatozoides para FIV, incluyendo: Swim-up, gradiente de Percoll, y lavado por centrifugación (Urrego *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2009).

#### 2.7.2.1 Método de Swim-up

Aunque el método de Swim-up es de los más antiguos, sigue siendo el método más simple y económico usado en laboratorios de PIV alrededor del mundo, particularmente en técnicas de reproducción asistida en humanos. El método está basado en el movimiento de los espermatozoides del pellet a la parte más alta del medio sobrenadante (Arias *et al.*, 2017). En Swim-up, los espermatozoides están en capas al fondo de una columna de medio. La naturaleza densa del semen en el diluyente y crioprotectores inicialmente mantienen a estos espermatozoides al fondo, pero con el tiempo, los espermatozoides viables comienzan a nadar hacia arriba, fuera del diluyente y el crioprotector hacia el medio que lo recubre. El aislar solo el medio que recubre provee una población de espermatozoides que está cerca al 100% de motilidad o viabilidad. Esta población de espermatozoides aislada por Swim-up simplemente se puede contar para añadir un número específico de espermatozoides para el sistema de FIV (Parrish, 2014). La técnica obtiene un alto porcentaje de espermatozoides móviles, después de la

separación, la mayoría con morfología normal. Sin embargo, el número de espermatozoides separados es muy bajo. Asimismo, se ha descrito que el método de Swim-up reduce significativamente el porcentaje de espermatozoides con una cromatina condensada normal, y que el contacto cercano entre las células en el pellet, remanentes celulares y leucocitos, producen altos niveles de ROS, las cuales son perjudiciales para los espermatozoides (Arias *et al.*, 2017).

#### 2.7.2.2 Gradiente de Percoll

El sistema de gradiente de Percoll similar al utilizado con semen humano se optimizó para el semen bovino entre 1989 y 1990 y se compartió con muchos laboratorios para su uso al preparar espermatozoides bovinos para FIV (Parrish, 2014). El Percoll es un medio comercial utilizado para separar células y partículas subcelulares mediante los gradientes de densidad, y ha sido ampliamente usado en la separación de espermatozoides de animales. El Percoll está compuesto de partículas coloidales de sílice recubierto con polivinilpirrolidona (PVP) no dializable. La centrifugación en los gradientes de densidad de Percoll 45 a 90% separa los espermatozoides de acuerdo con su estado de maduración e integridad de las células. En bovinos, la separación por gradientes de densidad ha mejorado la calidad del semen, principalmente en casos de alta viscosidad, baja calidad o semen criopreservado (Wolf *et al.*, 2008; Arias *et al.*, 2017).

### **2.8 Cultivo *in vitro* de embriones**

A los embriones de bovino que se desarrollan en el tracto reproductivo, la hembra les provee todos los nutrientes necesarios para el desarrollo embrionario temprano y un sistema para remover los materiales de desecho. En la PIV, una vez que los ovocitos de bovino son madurados y fertilizados *in vitro*, el paso final es el cultivo del embrión para llegar a la etapa de blastocisto, en la cual se puede transferir a una hembra receptora o criopreservarlo para su almacenamiento hasta que se requiera; estos embriones deben obtener todos los nutrientes del medio de cultivo (Gordon, 2003). Los embriones en etapa de preimplantación pueden desarrollarse en diferentes medios cuya composición varía desde simples soluciones salinas balanceadas y carbohidratos, fluido oviductal sintético (SOF, por sus siglas en inglés), y medio optimizado simple de potasio (KSOM), hasta medios con componentes más complejos, tales como medio de cultivo tisular (TCM-199), una mayor suplementación de suero y/o una capa de células somáticas (Rizos *et al.*, 2008). Durante la ventana de seis días post fertilización en el periodo de cultivo en bovinos entre el cigoto y la formación de blastocistos, ocurren varios eventos mayores del desarrollo, lo cual explica su importancia en la

determinación de la calidad de los blastocistos. Estos eventos incluyen: (1) la primera segmentación (24 ‘ 48 h de la fecundación), la cual se sabe es el momento crítico para determinar el desarrollo posterior del embrión; (2) la activación del genoma embrionario en la etapa de 8 a 16 células; (3) compactación de la mórula en el día 5, lo cual involucra el establecimiento del primer contacto íntimo de célula a célula en el embrión; (4) y la formación del blastocisto en los días 6 a 7, involucrando la diferenciación de los dos tipos de células que conforman el blastocito: el trofotodermo y la masa celular interna, y posteriormente la eclosión de la zona pelúcida (Rizos *et al.*, 2008).

La capacidad de segmentar es un potencial intrínseco en los ovocitos completamente desarrollados ya que puede ocurrir en la ausencia de fertilización por un estímulo simple de activación. Cuando la segmentación no ocurre, no está claro si es consecuencia de un espermatozoide disfuncional que falló al activar el ovocito o que el ovocito por sí mismo no tiene la habilidad de sobrellevar la primera división celular. La evaluación de cientos de presuntos cigotos que no segmentaron en las 36 horas postinseminación indica que la mayoría de ellos no fueron fertilizados y solo una pequeña proporción tuvo un espermatozoide descondensado incompleto o un pronúcleo desincronizado, lo cual indica que una pequeña subpoblación de ovocitos completamente desarrollados obtenidos de ovarios de matadero son incompetentes para desencadenar los procesos en cadena después de la fertilización y la segmentación (Sirard *et al.*, 2006). Un ovocito bovino fertilizado debe alcanzar la etapa de blastocisto en los 6 a 9 días de cultivo en condiciones apropiadas para tener una oportunidad significativa de inducir la preñez y producir descendencia (Sirard *et al.*, 2006).

### 2.8.1 Evaluación morfológica de los embriones

La evaluación de la calidad de los embriones producidos involucra su habilidad para establecer y mantener la preñez después de la transferencia. Sin embargo, por razones prácticas y económicas, solo es posible transferir un grupo de embriones. Por lo tanto, se han desarrollado métodos alternativos para evaluar la calidad de los embriones. El método más utilizado para la selección de embriones antes de la transferencia en reproducción asistida tanto en animales domésticos como en humanos es la evaluación mediante la morfología. Las características morfológicas tales como el color de los blastómeros, el grado de compactación, cinéticas del desarrollo y tiempos de la formación del blastocisto y expansión, el diámetro del embrión al eclosionar puede estar relacionado con la calidad del embrión (Rizos *et al.*, 2008). En bovinos el diámetro de los blastocitos es entre 150 a 190  $\mu\text{m}$ , incluyendo un grosor de la zona pelúcida entre 12 a 15  $\mu\text{m}$ . Un embrión ideal es compacto y esférico; los blastómeros deberían tener un tamaño similar con un color y textura uniforme; el citoplasma no debe ser granular o vesiculado; el espacio

perivitelino debería ser claro y no debe contener restos celulares. Asimismo, la zona pelúcida debe ser uniforme, sin rupturas ni colapsada, y sin poseer restos en su superficie (Bó y Mapletoft, 2013).

Es importante poder reconocer las etapas del desarrollo para compararlas con la etapa de desarrollo en la que el embrión se debería encontrar dependiendo del día de desarrollo. Se han escrito códigos estandarizados para describir las etapas del desarrollo embrionario. Se utiliza un código numérico, que va desde “1”, siendo un ovocito sin fertilizar o un embrión de una célula, hasta el “9”, un blastocisto expandido y eclosionando. A continuación, se describen las etapas que Bó y Mapletoft (2013) indican son más comunes de encontrar al día 7:

- Mórula (Código 3): una masa de al menos 16 células es difícil distinguir entre blastómeros individuales, la masa celular del embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.
- Mórula compacta (Código 4): los blastómeros individuales se han unido, formando una masa compacta; la masa embrionaria ocupa entre 60 al 70% del espacio perivitelino.
- Blastocisto temprano (Código 5): un embrión que ha formado una cavidad llena de líquido o blastocele y da una apariencia general de un anillo de sello. El embrión ocupa entre 70 al 80% del espacio perivitelino. En un periodo temprano de esta etapa el embrión puede verse de una calidad cuestionable dado a la dificultad para diferenciar las células de la masa interna de las células del trofoblasto.
- Blastocisto (Código 6): se puede realizar la diferenciación pronunciada de la capa exterior del trofoblasto y de la más oscura, la masa celular interna es evidentemente más compacta. El blastocele es prominente, con el embrión ocupando la mayoría del espacio perivitelino. La diferenciación visual del trofoblasto y la masa de celular interna es posible en esa etapa de desarrollo.
- Blastocisto expandido (Código 7): el diámetro general del embrión incrementa dramáticamente con un adelgazamiento concurrente de la zona pelúcida, aproximadamente a un tercio de su grosor original.
- Blastocisto eclosionado (Código 8): los embriones recuperados en esta etapa pueden estar pasando por el proceso de eclosión o pueden ya haber perdido la zona pelúcida. Los blastocistos eclosionados pueden ser esféricos con un blastocele bien definido o puede estar colapsado. La identificación de los blastocistos eclosionados puede ser difícil a menos que se vuelvan a expandir cuando la apariencia de anillo es obvia (Bó y Mapletoft, 2013).

## **2.9 Problemas durante la producción de embriones *in vitro***

### *2.9.1 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo durante la maduración *in vitro**

Uno de los principales inconvenientes de los sistemas de MIV es la falta de antioxidantes y la alta concentración de ROS. Las ROS son poderosas moléculas oxidantes que pueden alterar estructuralmente a muchas moléculas, llevando a un mal funcionamiento de las mismas. Las ROS son consideradas responsables en parte de la baja eficiencia de producción de embriones bovinos *in vitro*. Esta ineficiencia está relacionada con la inducción de arresto mitótico en los ovocitos y embriones por las ROS (Khan *et al.*, 2017).

La formación de ROS es el resultado de la reducción del oxígeno molecular, y las ROS pueden ser generadas por la fosforilación oxidativa en la membrana mitocondrial. En fisiología normal, las ROS están involucrados en procesos de señalización contribuyendo al desarrollo normal y función celular. Para alcanzar y mantener los niveles fisiológicos de ROS, hay un balance dinámico entre la generación de ROS y la actividad de antioxidantes para reducir los ROS (Schoot *et al.*, 2018). Sin embargo, si la capacidad de sintetizar nuevos antioxidantes no es suficiente para reducir las cantidades excedentes de ROS, el estrés oxidativo resulta en daño al ADN, peroxidación lipídica y daño a proteínas, este último, es resultado de la oxidación lo cual lleva a un desdoblamiento anormal en el retículo endoplasmático o una pérdida en la función de enzimas y receptores. La peroxidación lipídica afecta la función celular por la pérdida de fluidez de membrana. Estos efectos pueden llevar a daño y muerte celular (Schoot *et al.*, 2018), así como cambios en los patrones de expresión de genes, disfunción mitocondrial en los gametos y embriones, lo cual puede inhibir la fusión del espermatozoide al ovocito (Remião *et al.*, 2016).

#### 2.9.1.1 Estrés oxidativo y su efecto en los ovocitos y embriones

La producción de ROS es un proceso normal que ocurre dentro de las células, incluyendo embriones, células del *cumulus* y ovocitos (Rocha-Frigoni *et al.*, 2016). Generalmente, la dinámica ovárica resulta en la sobreproducción de ROS durante las fases finales del desarrollo folicular y en el momento de la ovulación. La sobreproducción de ROS es detenida por el sistema enzimático antioxidante activo en las células. Un ligero incremento en las ROS es necesario para la reanudación meiótica posterior al arresto diploteno en los ovocitos de los mamíferos; sin embargo, el flujo de ROS en el ovario o el desbalance en el estado REDOX lleva a un estado de estrés oxidativo. El incremento en el estrés oxidativo lleva a cambios irreversibles en el citoplasma y regiones nucleares del ovocito encerrado en el folículo, que posteriormente afectará la capacidad de fertilización de los ovocitos (Naseer *et al.*, 2017).

Bajo condiciones fisiológicas, la mayor fuente de ROS es la fosforilación oxidativa en la mitocondria. Las ROS son producidos a través de la reacción de transferencia de electrones al oxígeno, que están involucrados en muchos procesos fisiológicos relacionados con la actividad ovárica y la gametogénesis; así como la capacidad de fertilización de los espermatozoides bovinos y la interacción entre espermatozoides y ovocitos. Los ROS son extremadamente reactivos e inestables y por lo tanto pueden interactuar con varias moléculas para adquirir electrones en un intento de convertirse en estables. Estas interacciones pueden, a su vez, inducir una cascada de reacciones en cadena que pueden eventualmente llevar a daño celular, incluyendo peroxidación lipídica (principalmente fosfolípidos de membrana) y la oxidación de aminoácidos y ácidos nucleicos. Asimismo, niveles altos de ROS causan daño al ADN por la ruptura de las membranas mitocondriales y llevan a la liberación consecuyente de citocromo C y la activación de las cascadas de caspasa (Rocha-Frigoni *et al.*, 2016), así como la desestabilización del factor promotor de maduración, reducción de los factores de supervivencia y activación de la apoptosis mediada por la mitocondria (Luo *et al.*, 2018). Estos eventos culminan en muerte celular y en un desarrollo embrionario fallido, disminuyendo la viabilidad de los embriones producidos *in vitro*. Para evitar estos efectos dañinos, los sistemas biológicos han desarrollado mecanismos para controlar los niveles de ROS, incluyendo agentes antioxidantes enzimáticos (por ejemplo, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa) y no enzimáticos (por ejemplo,  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno, entre otros) (Jeong *et al.*, 2006; Rocha-Frigoni *et al.*, 2016; Goodarzi *et al.*, 2017). Así que, dado la constante amenaza a la viabilidad celular impuesta por la acción de las ROS, los antioxidantes han sido aplicados a los sistemas de cultivo de la PIV utilizados para producir embriones bovinos, con el objetivo de mejorar la producción y la calidad de los ovocitos y embriones (Rocha-Frigoni *et al.*, 2016).

### 2.9.2 Producción de especies reactivas de oxígeno durante los procedimientos de colecta y maduración *in vitro* de ovocitos

La integración del transporte de ovarios a los protocolos de PIV ha sido un reto importante en países extensos y/o en casos de bajos recursos en las cuales el matadero está localizado lejos del laboratorio. La larga distancia del transporte de ovarios al laboratorio tiene efectos adversos en la calidad de los ovocitos en términos de maduración nuclear y capacidad de desarrollo después de la MIV y la FIV. Los ovarios necesitan ser colectados y transportados al laboratorio inmediatamente después del sacrificio para poder hacer un uso efectivo de los ovocitos que contiene. El tipo del medio de transporte, el tiempo de almacenamiento, así como la temperatura durante el transporte de los

ovarios, entre varios factores, afectan la supervivencia folicular y del ovocito, y su capacidad de desarrollo (Goodarzi *et al.*, 2017).

Durante el transporte de los ovarios al laboratorio, el paro del flujo sanguíneo reduce el suministro de oxígeno y energía, y pone a los ovarios bajo condiciones de isquemia. La isquemia daña la viabilidad folicular y función lútea en los ovarios; en particular, los radicales libres de oxígeno son los mayores contribuyentes al daño al órgano durante la preservación. Además, el sistema antioxidante de las células del ovario se ve comprometida durante la preservación (Goodarzi *et al.*, 2017).

Muchos estudios han reportado que el ambiente de cultivo en el cual los ovocitos y embriones son expuestos puede afectar su calidad. Cuando los ovocitos y embriones son cultivados *in vitro*, se enfrentan al estrés oxidativo, ya que la recuperación y el cultivo involucra exposición a la luz, concentraciones alteradas de substratos metabólicos en relación al ambiente *in vivo* y concentraciones elevadas de oxígeno (Jeong *et al.*, 2006; Remião *et al.*, 2016; Chowdhury *et al.*, 2017); esta última ha recibido especial atención en la última década, ya que la alta tensión de oxígeno induce al estrés oxidativo (Rocha-Frigoni *et al.*, 2016) resultando en el envejecimiento prematuro de los ovocitos por la producción aumentada de las ROS. El envejecimiento prematuro de los ovocitos antes de la etapa MII es perjudicial para los procesos de maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos causando una baja fertilización y un desarrollo retardado de los embriones (Chowdhury *et al.*, 2017).

La tensión de oxígeno usada rutinariamente en los sistemas de cultivo de maduración *in vitro* es comúnmente más alta que lo que se encuentra en el microambiente del tracto reproductivo de la hembra (~20% y 3% a 9% O<sub>2</sub>, respectivamente), y se cree que la alta tensión de oxígeno induce a una generación excesiva de ROS (Rocha-Frigoni *et al.*, 2016), las cuales pueden ser responsables del daño a los embriones, y de inducir bloqueos del desarrollo temprano de los embriones (Kang *et al.*, 2016). Además de la tensión de oxígeno incrementada, otros factores exógenos capaces de inducir la generación de ROS pueden encontrarse en el mismo medio de cultivo, incluyendo restos de cationes metálicos (tales como el Fe y Cu) que están presentes comúnmente en el agua y/o productos químicos utilizados para preparar el medio de cultivo, y la amino oxidasa, la cual se encuentra en el suero fetal bovino (Rocha-Frigoni *et al.*, 2016).

De acuerdo con Jeong *et al.* (2006), los ovocitos y embriones también producen ROS endógenos por varias acciones enzimáticas y rutas metabólicas. Si no se remueven rápida y efectivamente de las células, las ROS pueden dañar un gran rango de macromoléculas, llevando posiblemente a la muerte celular. Por lo tanto, las ROS deben ser inactivados continuamente para mantener niveles fisiológicamente tolerables que jueguen un rol normal en las funciones celulares, como en la maduración de los ovocitos.

Un método que puede ayudar a sobrellevar este problema es la suplementación del medio de MIV con compuestos antioxidantes. Se ha reportado que la adición de antioxidantes al medio de MIV disminuye los niveles de ROS y aumenta el porcentaje de producción de blastocitos (Remião *et al.*, 2016; dos Santos *et al.*, 2019).

## 2.10 Antioxidantes

Los antioxidantes bloquean la formación de radicales libres o protegen contra sus efectos dañinos, reducen la apoptosis o la muerte celular al inhibir la peroxidación de lípidos y lipoproteínas, y contribuyen a las defensas contra el daño oxidativo en el embrión. La suplementación de antioxidantes al medio de cultivo es efectiva para apoyar el desarrollo de embriones bovinos *in vitro* (Chowdhury *et al.*, 2017), ya que pueden ayudar a proteger contra el desarrollo defectuoso de los embriones; además, es muy importante que los antioxidantes sean añadidos en los cultivos de ovocitos durante sus fases de desarrollo y maduración, no solo como parte del proceso de maduración sino también del tiempo en el que las fases iniciales del desarrollo embrionario en donde ocurre la activación del genoma cigótico. La suplementación con antioxidantes al medio de cultivo puede incrementar el desarrollo potencial de los ovocitos o embriones; sin embargo, la adición de altas concentraciones de antioxidantes al medio de MIV disminuyó el porcentaje de formación de blastocitos comparado con tratamientos con bajas concentraciones, sugiriendo que la concentración apropiada de antioxidantes puede contribuir a la generación de embriones de alta calidad. Además, las mejoras pueden llevarse a cabo cambiando las condiciones de cultivo para la maduración de ovocitos y desarrollo embrionario, incluyendo el control de la concentración de oxígeno externo (Chowdhury *et al.*, 2017).

Los antioxidantes no enzimáticos agrupan ampliamente a vitaminas, minerales o agentes quelantes. Las vitaminas antioxidantes tales como la  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -carotenos, y la vitamina C son los antioxidantes contenidos en la dieta que mayormente remueven las ROS de forma directa y proveen una condición de protección ante los efectos dañinos de las ROS (Takahashi, 2012). Además, las vitaminas son uno de los componentes de los varios medios definidos. Los efectos de las vitaminas han sido probados en los sistemas de cultivo de embriones preimplantación y son benéficos para el desarrollo embrionario. En roedores, se ha encontrado que las vitaminas C y E incrementan el desarrollo de los blastocitos e incrementan el porcentaje de blastocitos que eclosionan de la zona pelúcida (Borman *et al.*, 2003).

La vitamina E, un antioxidante liposoluble predominante en células animales, es considerada como un removedor mayor de ROS (Zhang *et al.*, 2012), es una molécula natural, altamente tolerable

y económica, el término vitamina E es un término genérico utilizado para los tocoferoles y tocotrienoles que consisten en dos anillos y una cadena de hidrocarburos (Engin, 2009). La forma activa homóloga de la vitamina E es el  $\alpha$ -tocoferol el cual protege a las membranas celulares de la oxidación al reaccionar con las ROS y los radicales lipídicos producidos en la peroxidación lipídica (Takahashi, 2012), interrumpiendo las reacciones en cadena de los radicales al capturar al radical libre. Esto le imparte su propiedad antioxidante, siendo el grupo hidroxilo en el anillo aromático el responsable de esta propiedad (Engin, 2009) por lo tanto, se considera que mejora el desarrollo de embriones producidos mediante PIV al suprimir los daños causados en la membrana celular por parte de las ROS (Zhang *et al.*, 2012).

La actividad antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol en la prevención de los daños al tejido por la peroxidación iniciada por radicales libres es aceptada por la mayoría de los investigadores, y se cree que es el removedor primario de radicales libres en la membrana celular en mamíferos (Jeong *et al.*, 2006). En un estudio realizado en porcinos por Jeong *et al.* (2006), se obtuvo un porcentaje más alto de blastocitos utilizando 50  $\mu$ M (28.6%) y 100  $\mu$ M (32.4%) de  $\alpha$ -tocoferol comparado con el control (0  $\mu$ M tocoferol, 17.6%) y 200  $\mu$ M (21.4%)  $\alpha$ -tocoferol.

### 2.10.1 Antioxidantes derivados de plantas

Estudios previos se han enfocado en el uso de las vitaminas C y E como potentes antioxidantes en la criopreservación de semen de mamíferos; sin embargo, se ha encontrado que los polifenoles, metabolitos secundarios de las plantas, exhiben mayor actividad antioxidante y menor toxicidad que los antioxidantes sintéticos (Gülşen *et al.*, 2007; Seddiki *et al.*, 2017). Dos tercios de las especies de plantas del mundo tienen valor medicinal, en particular, muchas plantas tienen un gran potencial antioxidante (Ardeshirnia *et al.*, 2017), por lo cual se ha tenido un creciente interés en el uso de sustancias bioactivas de plantas. Los compuestos derivados de las plantas y su capacidad para mejorar la fertilidad se han examinado previamente a través del consumo en la dieta de suplementos en humanos y animales. Las tecnologías de reproducción asistida, tales como la criopreservación y la PIV, pueden también involucrar el uso de suplementos antioxidantes en el medio de cultivo (Seddiki *et al.*, 2017); recientemente se obtuvo una mejora en la calidad de los embriones al enriquecer el medio de cultivo con antioxidantes naturales (Zullo *et al.*, 2016).

En años recientes, numerosos estudios exploraron las propiedades terapéuticas de los extractos de diferentes partes de varias plantas medicinales (Jia *et al.*, 2011). Los polifenoles son una amplia variedad de moléculas orgánicas contenidas en los vegetales, frutas y bebidas derivadas de las

plantas, tales como el té, vino rojo, y aceite de oliva extra virgen. Se caracterizan por la presencia de varios grupos involucrados en estructuras fenólicas e incluyen a los flavonoides y ácidos fenólicos (Takahashi, 2012). Los flavonoides son una clase de compuestos fenólicos naturales, presentes en células fotosintéticas (Boots *et al.*, 2008) y que además exhiben una actividad antioxidante significativa en varios modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* (Mickstacka *et al.*, 2010), ya que estos limitan los efectos negativos de los radicales libres a través de la transferencia rápida de átomos de hidrógeno a los radicales (Alrawaiq y Abdullah, 2014).

### *2.10.2 Quercetina*

La quercetina, un miembro de la familia de flavonoides está ampliamente distribuida en frutas, vegetales, hierbas, granos de soya, té, vino, entre otros, y que además es fácil de extraer (Jia *et al.*, 2011, Alrawaiq y Abdullah, 2014, Naseer *et al.*, 2017). Se ha demostrado que la quercetina es un excelente antioxidante *in vitro*. Entre la familia de los flavonoides, la quercetina es el removedor más potente de ROS. Estas capacidades antioxidantes de la quercetina están atribuidas a la presencia de fármacos antioxidantes en la molécula que tienen la configuración óptima para la remoción de radicales libres (Boots *et al.*, 2008) y para mejorar la actividad de las enzimas antioxidantes como el superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa (Udo *et al.*, 2017). Gracias a su estructura química, la quercetina reduce el estrés oxidativo generado por las ROS. La función de la quercetina para prevenir el daño oxidativo inducido por metales y no metales es atribuida en parte a su sustituyente libre 3-OH, el cual se cree incrementa la estabilidad del radical flavonoide. El grupo catecol también está directamente conectado a la acción quelante de la quercetina, y ha sido demostrado que la quercetina suprime la peroxidación lipídica debido a su acción removedora de su radical libre (Alrawaiq y Abdullah, 2014). La quercetina reacciona con un radical desemparejado al donar un protón y convertirse a sí misma en un radical libre (Naseer *et al.*, 2017). La acción antioxidante se da en tres diferentes etapas: mediante la iniciación con la interacción con iones superóxidos, durante la formación de radicales de hidroxilo al remover iones de hierro y la peroxidación lipídica al reaccionar con radicales de peróxido lipídico (Sovernigo *et al.*, 2017).

#### 2.10.2.1 Uso de la quercetina en reproducción animal

Resultados de varios estudios indican que hay acciones de la quercetina en las funciones ováricas: la alimentación con quercetina redujo la apoptosis celular ovárica, promovió la proliferación, e incremento el peso ovárico, calidad del ovocito, y el tamaño de camadas en algunos

animales (porcinos y bovinos; Ditoikin *et al.*, 2019). También se han observado efectos positivos de la adición de quercetina en la MIV en bovinos (Guemra *et al.*, 2013); la presencia de quercetina promovió porcentajes excelentes de maduración y desarrollo de blastocistos en porcinos al reducir los niveles de ROS intracelulares (Orlovschi *et al.* 2014). Además, se ha demostrado que la quercetina beneficia la maduración nuclear durante la MIV y el desarrollo embrionario subsecuente de los ovocitos de porcino al reducir los niveles de ROS (Kang *et al.*, 2013). En un estudio realizado por Silva *et al.* (2019), se determinaron que la adición de 4  $\mu\text{M}$  de quercetina en el medio de maduración de ovocitos de cabra funciona como una alternativa al uso de cisteamina como antioxidante.

De la misma forma, en un estudio llevado a cabo por Banihosseini *et al.* (2018), en ovocitos de ratón, evaluaron el efecto de la adición de quercetina en el medio de maduración y su efecto en la maduración nuclear, contenido intracelular de glutatión (GSH) y ROS postmaduración. Se encontró que la adición de 10  $\mu\text{g/mL}$  de quercetina al medio de maduración incrementó el número de ovocitos en MII, además que los porcentajes de fertilización y blastocistos en el grupo fueron significativamente más altos en comparación con los otros grupos, así como cantidades más elevadas de GSH intracelular comparado con las otras concentraciones de quercetina (0, 5 y 20  $\mu\text{g/mL}$ ) y el grupo control. Además, los niveles de ROS intracelulares fueron los más bajos en los grupos de quercetina 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$ , lo cual sugirió que la adición de quercetina al medio de maduración es dosis dependiente y mejora la maduración nuclear y el desarrollo embrionario, esto al reducir el estrés oxidativo intracitoplasmático en los ovocitos maduros.

En un estudio realizado por Wang *et al.* (2017), encontraron que la quercetina redujo el porcentaje de defectos morfológicos en ovocitos en etapa MII cultivados *in vitro* cuando fueron tratados con 1, 5 o 10  $\mu\text{M}$  de quercetina, después de 12 y 24 h de incubación, los ovocitos en el grupo control mostraron varios defectos morfológicos dependientes del tiempo, incluyendo degeneración, fragmentación y activación partenogénica. En cambio, en los ovocitos en etapa MII que fueron expuestos a 1  $\mu\text{M}$  de quercetina, aunque el porcentaje de los defectos morfológicos no fue significativamente bajo comparado con los ovocitos del grupo control. Sin embargo, el porcentaje de defectos morfológicos disminuyó significativamente después del tratamiento con 5 o 10  $\mu\text{M}$  de quercetina, por lo cual concluyeron que los efectos preventivos de la quercetina sobre los cambios morfológicos inducidos mediante el envejecimiento de los ovocitos fueron dependientes de la dosis, por lo cual sugieren que la quercetina previene el envejecimiento postovulatorio de los ovocitos de ratón. Además, al evaluar el efecto protector de la quercetina contra el estrés oxidativo durante el envejecimiento postovulatorio, los ovocitos demostraron un descenso en la acumulación de ROS dependiente de la dosis, encontrando que 10  $\mu\text{M}$  de quercetina mostró el mejor efecto preventivo en

cuanto a los cambios morfológicos inducidos por el envejecimiento y la acumulación de ROS, por consiguiente, utilizaron la concentración de 10  $\mu$ M durante todos sus experimentos.

### **3. HIPÓTESIS**

La adición de 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{M}$  de quercetina y 100, 200 y 400  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -tocoferol en el medio de maduración de los ovocitos de bovino mejora el proceso de producción de embriones *in vitro*.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la adición de quercetina y el  $\alpha$ -tocoferol sobre la maduración de ovocitos de bovino y su desarrollo para alcanzar la etapa de blastocistos.

#### **4.1 Objetivos específicos**

- Evaluar la tasa de maduración, segmentación y blastocistos de los ovocitos madurados con  $\alpha$ -tocoferol
- Evaluar la tasa de maduración, segmentación y blastocistos de los ovocitos madurados con quercetina

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 5.1 Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación y Reproducción Animal del Departamento de Ciencias Veterinarias del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICB), perteneciente a la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ). El Municipio de Ciudad Juárez se encuentra ubicado en las coordenadas geográficas 31°44'22" N 106°29'13" O y a una altitud de 1,120 metros sobre el nivel del mar (INEGI, 2017).

### 5.2 Inicio y duración del estudio

El estudio inició desde el mes de agosto del 2018 con una duración de 22 meses. Durante los meses de agosto del 2018 a marzo del 2019 se llevó a cabo la capacitación para la producción de embriones *in vitro* (PIV). En los meses de junio del 2019 a marzo del 2020 se realizó el trabajo experimental, así como pruebas experimentales para seleccionar los tratamientos y las concentraciones a utilizar, además de ajustes a los procedimientos.

### 5.3 Estudios

Se realizaron dos estudios para evaluar los antioxidantes seleccionados, los cuales se describen a continuación.

#### 5.3.1 Estudio 1: antioxidante convencional

El objetivo fue evaluar diferentes concentraciones del antioxidante convencional ( $\alpha$ -tocoferol) en el medio de maduración *in vitro*; el proceso de MIV se describe en la sección 5.5. Se realizaron cinco repeticiones de maduración *in vitro*, puncionando 22-25 ovarios por repetición, para obtener un total de 1,377 ovocitos, utilizando el medio de maduración comercial como tratamiento control, tres concentraciones de antioxidante convencional (100, 200 y 400  $\mu$ M) y un grupo testigo (etanol). Una vez transcurrido el tiempo para la maduración, se evaluó la expansión de las células del *cumulus* de los ovocitos, se realizó la fertilización *in vitro* (FIV) y el cultivo *in vitro* (CIV), evaluando porcentaje de segmentación, blastocistos, blastocistos expandidos y eclosionados.

### 5.3.1.1 Tratamientos en el estudio 1

- Tratamiento control: Se utilizó el medio de maduración desarrollado por la Universidad Politécnica Estatal de California (UPEC).
- Tratamiento testigo: Se utilizó el medio de maduración UPEC adicionado con 0.1% (v/v) de etanol. Esto debido a que la quercetina adicionada en otros tratamientos fue diluida en la misma cantidad de etanol para su dilución.
- Tratamiento 100  $\mu\text{M}$ .: Se utilizó el medio de maduración UPEC y se adicionó antioxidante ( $\alpha$ -tocoferol) (T3251-5G, Sigma Aldrich, Alemania) a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ .
- Tratamiento 200  $\mu\text{M}$ .: Se utilizó el medio de maduración UPEC y se adicionó antioxidante ( $\alpha$ -tocoferol) a una concentración de 200  $\mu\text{M}$ .
- Tratamiento 400  $\mu\text{M}$ .: Se utilizó el medio de maduración UPEC y se adicionó antioxidante ( $\alpha$ -tocoferol) a una concentración de 400  $\mu\text{M}$ .

### 5.3.2 Estudio 2: quercetina

El objetivo fue evaluar diferentes concentraciones de quercetina en el medio de MIV. El proceso de MIV se describe en la sección 5.5. Se realizaron cinco repeticiones de maduración *in vitro*, puncionando 22-25 ovarios por repetición, para obtener un total de 1,409 ovocitos, utilizando el medio de maduración convencional como tratamiento control y cuatro concentraciones de quercetina (2, 4, 8 y 16  $\mu\text{M}$ ). Una vez transcurrido el tiempo para la maduración, se evaluó la expansión de las células del *cumulus* de los ovocitos, se realizó la FIV y CIV, evaluando segmentación, porcentaje de blastocistos, blastocistos expandidos y eclosionados.

#### 5.3.2.1 Tratamientos en el estudio 2

- Tratamiento control: Se utilizó el medio de maduración UPEC.
- Tratamiento 2  $\mu\text{M}$ : Se utilizó medio de maduración UPEC y se añadió quercetina (Q4951) a una concentración de 2  $\mu\text{M}$ .
- Tratamiento 4  $\mu\text{M}$ : Se utilizó medio de maduración UPEC y se añadió quercetina (Q4951) a una concentración de 4  $\mu\text{M}$ .

- Tratamiento 8  $\mu\text{M}$ : Se utilizó medio de maduración UPEC y se añadió quercetina (Q4951) a una concentración de 8  $\mu\text{M}$ .
- Tratamiento 16  $\mu\text{M}$ : Se utilizó medio de maduración UPEC y se añadió quercetina (Q4951) a una concentración de 16  $\mu\text{M}$ .

#### 5.4 Colección de ovarios y recuperación de los ovocitos

Los ovarios fueron recolectados por personal del Rastro Municipal de Ciudad Juárez en solución salina de cloruro de sodio al 0.9% (v/v) a una temperatura de 37 °C, se removió el tejido excesivo y se enjuagaron dos veces en solución salina, y fueron transportados en la misma en un tiempo máximo de 2 h al laboratorio. Una vez en el laboratorio, los folículos antrales entre 2 a 8 mm de diámetro fueron puncionados utilizando una jeringa de 10 mL (BD, Estados Unidos) y aguja de 18 g (BD PrecisionGlide, Estados Unidos) y se aspiró el fluido folicular (Nogueira da Costa *et al.*, 2015). El líquido folicular fue depositado en un tubo Falcon de 50 mL (Cat. 5100050, Capp Dinamarca) que contenía 10  $\mu\text{l}$  de heparina (5,000 UI/mL, Inhepar, PiSA Farmacéutica, México), a una temperatura de 37 °C; se dio un tiempo de 5-10 min para que las células decantaran al fondo del tubo Falcon.

##### 5.4.1 Lavado y selección de los ovocitos

El medio de lavado se preparó con 2.28 mL de TCM-199 (M4530, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania), 0.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de FSH (500 UI/mL) (Laboratorios Calier, Argentina), 5% de SFB (suero fetal bovino) (F4135, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), y 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de gentamicina (160 mg/2 mL) (Farmacéuticos Rayere, México). Se prepararon cuatro pocillos (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), que contenían 650  $\mu\text{L}$  cada uno de medio para el lavado de los ovocitos. El lavado de los ovocitos se realizó pasándolos del pocillo 1 al pocillo 4. Al pasar los ovocitos del pocillo 2 al 4, se realizó de uno por uno para tomar la menor cantidad posible de medio de lavado de los pocillos anteriores. Asimismo, durante el lavado se realizó la selección y clasificación de los ovocitos que serían sometidos a la MIV, la cual se realizó según la clasificación descrita en la Tabla 2 a continuación:

**Tabla 2.** Grados de clasificación de los complejos ovocito-*cummulus* de bovino.

CLASIFICACIÓN	CARACTERÍSTICAS
Grado 1	El citoplasma esta homogéneo y completo, compacto y con múltiples capas de células del <i>cumulus</i> .
Grado 2	El citoplasma esta homogéneo con solo pocas áreas irregulares, las células del <i>cumulus</i> son menores que en el grado I, pero con más de cinco capas compactas de células del <i>cumulus</i> .
Grado 3	Citoplasma heterogéneo/vacuolado, la zona pelúcida está cubierta por tres a cinco capas de células del <i>cumulus</i> excepto por pequeñas áreas desnudas.
Grado 4	El citoplasma es heterogéneo y las células del <i>cumulus</i> están completamente o en parte ausentes o expandidas.

Stojkovic *et al.* (2001).

### 5.5 Maduración *in vitro*

Se utilizó medio proporcionado y desarrollado en la Universidad Politécnica Estatal de California, en el Departamento de Ciencia Animal (UPEC). Se prepararon cuatro pocillos de 500  $\mu$ l (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), conteniendo 10  $\mu$ L de medio por estructura, utilizando un promedio de 350  $\mu$ L por pozo por repetición, así como la concentración seleccionada de quercetina y  $\alpha$ -tocoferol correspondiente según el estudio. Se colocó la caja en la incubadora (Thermo Scientific, Heracell VIOS 160i CO<sub>2</sub> Incubator, Waltham, Massachusetts) para su estabilización mientras se llevaba a cabo la colecta, lavado y selección de los ovocitos.

Una vez lavados y clasificados los ovocitos, se repartieron en cantidades iguales entre los cuatro pocillos de la caja y se colocó nuevamente en la incubadora a 38.5 °C con 5% de CO<sub>2</sub> en atmosfera humidificada (21% de O<sub>2</sub>) durante 22 h. La evaluación de la maduración se realizó 22 h después de haber introducido los COCs en la incubadora.

### 5.5.1 Evaluación postmaduración

Una vez transcurridas las 22 h del periodo de maduración *in vitro*, se evaluaron los ovocitos para determinar si estos habían completado su maduración. Para esto se tomaron en cuenta sus características morfológicas, realizando una comparación de los grupos mediante fotografías tomadas antes y después del periodo de MIV, basándose en la evidente o no expansión de las células del *cumulus*, además del estado del citoplasma, es decir, si este se seguía observando homogéneo o hubo cambios significativos en su apariencia (Dinkar y Shankar, 2013).

#### 5.5.1.1 Índice de expansión del cumulus

Después de transcurridas las 22 h de maduración, se realizaron los cálculos para obtener el índice de expansión del *cumulus* (CEI) establecido por Funsho y Downs (1990), descrito anteriormente (sección 2.6.2). Brevemente, se asignó una calificación del 0 al 4 a los ovocitos por pozo, siendo clasificación 0 nula expansión y clasificación 4 ovocitos con expansión de las células del *cumulus* más notable. Una vez asignadas las clasificaciones, estas se multiplicaron por el total de ovocitos con esa calificación y fueron sumadas y divididas por el total de los ovocitos contenidos en el pozo y se obtuvo el promedio de expansión de ese mismo grupo, por ejemplo, si al final de un grupo de cultivo de 55 COCs, exhibieron las siguientes expansiones: “0”, 20; “+1”, 20; “+2”, 10; “+3”, 5; “+4”, 0; entonces el CEI de este grupo sería  $[(0 \times 20) + (1 \times 20) + (2 \times 10) + (3 \times 5) + (4 \times 0)] / 55 = 55 / 55 = 1.00$ . Este procedimiento se realizó con cada uno de los grupos por tratamiento.

## **5.6 Fertilización *in vitro***

Se realizó según el protocolo establecido por el fabricante de los medios utilizados (IVF Bioscience, Reino Unido), el cual se describe a continuación.

### 5.6.1 Preparación de la caja de fertilización

Se preparó una caja de 35x10 mm (430165, Corning Incorporated, Estados Unidos) conteniendo microgotas de medio BO-IVF (71004, IVF Bioscience, Reino Unido) a un volumen ajustado de 1  $\mu$ L por ovocito, en grupos no mayores a 30 ovocitos. Después fueron cubiertas con 3 mL de aceite mineral (M8410, Sigma Aldrich), posteriormente fueron introducidas en la incubadora a 38.8°C y 6.5% CO<sub>2</sub> en una atmósfera de aire humidificado para su estabilización durante 2 h previas al tiempo de fertilización.

Adicionalmente se precalentaron a 37.5 °C en una termoplatina (Minitube HT 300, Ref. 12055/0301, Alemania), 200 µL de medio BO-IVF para el lavado de los ovocitos y 100 µL de medio BO-IVF para la reconstitución del semen post centrifugación.

#### *5.6.2 Preparación de los ovocitos postmaduración para la fertilización in vitro*

Una vez concluidas las 22 h de maduración *in vitro*, los ovocitos fueron tomados por cada tratamiento con una micropipeta y lavados en 200 µL de medio BO-IVF precalentado. Posteriormente fueron depositados en la microgota correspondiente al tratamiento de la caja de fertilización previamente equilibrada; una vez lavados y depositados los ovocitos en el medio de fertilización, se colocó la caja nuevamente en la incubadora manteniendo las mismas condiciones descritas anteriormente, mientras se realizó la preparación del semen.

#### *5.6.3 Preparación del medio para el semen*

Se preparó un tubo para centrifuga conteniendo 1 mL de medio BO-SemenPrep (71003, IVF Bioscience, Falmouth, UK) y se precalentó a 37°C en termoplatina (Minitube HT 300, Ref. 12055/0301), así mismo, se precalentó 1 mL adicional de BO-SemenPrep, esto por cada pajilla de semen a utilizar.

#### *5.6.4 Manejo del semen para fertilización in vitro*

Se descongeló una pajilla de semen de un toro de probada fertilidad (ABS Global, México) a baño María (Thermo Scientific, Precision Water Bath 282, USA) a 37°C durante 30 a 40 s. Se secó y se cortó la pajilla depositando el contenido en un microtubo de 1.5 mL. Se evaluaron 3 µL del semen colocándolos en un portaobjetos y fueron cubiertos con un cubreobjetos para el análisis microscópico del semen mediante el uso del análisis de semen asistido por computadora (CASA; AndroVision, Minitube, Alemania). Se evaluó la motilidad y la concentración del semen; una vez que se determinó que el semen estaba apto para utilizarse (motilidad masal mayor a 50%), se depositó el resto del contenido del semen en el tubo de centrifuga conteniendo el medio BO-SemenPrep previamente precalentado y se centrifugó durante 5 minutos a  $328 \times g$  (IEC HN-SII Centrifuge, Estados Unidos). Una vez concluido el tiempo, se removió cuidadosamente el sobrenadante dejando aproximadamente 250 µL del sobrenadante y evitando remover el pellet. A continuación, el pellet se resuspendió con el

medio BO-SemenPrep adicional previamente precalentado (1 mL) y se volvió a centrifugar durante 5 minutos a  $328 \times g$ . Una vez concluido el tiempo de centrifugación se removió el sobrenadante y se reconstituyó el pellet añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de medio BO-IVF previamente precalentado. Por último, se añadieron 3 – 7  $\mu\text{L}$  de la suspensión de espermatozoides a cada gota de fertilización según el volumen calculado con base a la concentración del semen y se devolvió la caja de fertilización a la incubadora durante 18-20 h.

#### *5.6.4.1 Cálculo del volumen de semen para fertilización in vitro*

Una vez realizados los dos lavados del semen mediante centrifugación, y la posterior reconstitución del pellet, se evaluó una gota de 3  $\mu\text{L}$  en el sistema CASA con el fin de obtener la concentración de la muestra. Posteriormente, se llevó a cabo la siguiente fórmula para determinar el volumen de semen filtrado a utilizar en cada gota de fertilización a una concentración final de  $2 \times 10^6$  millones de espermatozoides por mL, considerando la concentración del semen y el volumen de la gota de fertilización:

$$\text{Volumen} = 2 \times 10^6 \text{ espermatozoides} * 50 \mu\text{L} / \text{Concentración espermática de la preparación del semen}$$

### **5.7 Cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* se llevó a cabo siguiendo el protocolo establecido por el fabricante de los medios utilizados (IVF Bioscience, Reino Unido), el cual se describe a continuación:

#### *5.7.1 Preparación del medio de cultivo*

Se preparó una caja de 35x10mm (430165, Corning Incorporated, Estados Unidos) con microgotas de medio BO-IVC (71005, IVF Bioscience, Reino Unido) a un volumen ajustado de 1  $\mu\text{L}$  por presunto cigoto, en grupos no mayores a 30 presuntos cigotos y fueron cubiertas con 3 mL de aceite mineral (M8410, Sigma Aldrich, México). Posteriormente fueron introducidas en la incubadora a 38.8 °C y 6.5%  $\text{CO}_2$  en una atmósfera de aire humidificado para su equilibramiento durante dos horas previas al tiempo de cultivo.

Adicionalmente, se precalentaron 200  $\mu\text{L}$  de medio BO-IVC en termoplatina a  $37^{\circ}\text{C}$  para el lavado de los presuntos cigotos, así como 500  $\mu\text{L}$  de medio BO-Wash (51002, IVF Bioscience, Reino Unido) para el lavado de los presuntos cigotos; además, se precalentó 1 mL de medio BO-Wash en criotubos de 9 mL, un tubo por cada microgota (tratamiento).

#### 5.7.2 Manejo de los presuntos cigotos para el cultivo *in vitro*

Una vez transcurridas 18 a 20 horas post FIV, se procedió a llevar a cabo el cultivo *in vitro*. Los presuntos cigotos de la caja de fertilización fueron depositados utilizando una micropipeta en el criotubo conteniendo 1 mL de medio BO-Wash precalentado, y posteriormente fueron colocados en el vórtex (Maxi-Mix I, Thermofisher) durante 90 segundos para el desnudado de los presuntos cigotos. El contenido del tubo fue depositado en una caja de  $35\times 10\text{mm}$  y se observó bajo el estereoscopio para la recuperación de los presuntos cigotos desnudos los cuales fueron depositados en una caja que contenía 500  $\mu\text{L}$  de medio BO-Wash precalentado, llevando a cabo el primer lavado de los presuntos cigotos. Posteriormente, se tomaron los presuntos cigotos del primer lavado y fueron depositados en una caja conteniendo 200  $\mu\text{L}$  de medio BO-IVC precalentado para llevar a cabo el segundo lavado de los presuntos cigotos. Por último, se recuperaron los presuntos cigotos desnudos del segundo lavado y fueron colocados en la microgota de medio de cultivo (correspondiente a su tratamiento). Se repitió el procedimiento con cada pozo de presuntos cigotos. Una vez terminado el manejo de los presuntos cigotos, se colocó la caja de cultivo en una microcámara (Modular Incubator Chamber, MIC-101, Billups-Rothenberg, Inc, Estados Unidos) la cual contenía una mezcla de gases (6%  $\text{O}_2$ , 6%  $\text{CO}_2$ , 88%  $\text{N}_2$ ) y se introdujo en la incubadora para mantener una temperatura de  $38.5^{\circ}\text{C}$  durante 7 días en una atmosfera humidificada.

### 5.8 Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico SAS (SAS, 2009 / STAT versión 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC). Las variables para maduración, segmentación y desarrollo de blastocitos se analizaron mediante Chi Cuadrada, mientras que las variables para el Índice de Expansión del *Cumulus*, se analizaron con un ANOVA y se compararon con una prueba de Tukey cuando se observaron diferencias entre los tratamientos ( $P\leq 0.05$ ).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos en el Estudio 1 (antioxidante convencional), en el cual se evaluaron diferentes concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol en el medio de maduración de los ovocitos. En el Estudio 1, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de maduración (P=0.8715), CEI (P=0.7716), porcentaje de segmentación (P=0.8917) y porcentaje de blastocistos (P=0.5032) para los ovocitos grado 1 y 2. Debido a las características morfológicas que presentaban los ovocitos pertenecientes a este grupo (ovocitos grado 1 y 2), siendo estas las deseables para la selección de ovocitos que serán sometidos a los procedimientos de maduración *in vitro*, las cuales son la presencia de cuatro o más capas de células del *cumulus* compactas, además de un citoplasma uniforme, y sin la presencia de rompimientos y vesículas (Dinkar y Shankar, 2013). Se esperaba una maduración y desarrollo hasta blastocistos de la mayoría de los ovocitos pertenecientes a estas categorías, la cual fue obtenida independientemente de la concentración de  $\alpha$ -tocoferol utilizada, sin embargo, mediante la adición del  $\alpha$ -tocoferol al medio de maduración *in vitro* se esperaría un aumento de los porcentajes de maduración, segmentación y blastocistos así como el CEI, lo cual no ocurrió. Lo anterior porque como se mencionó previamente, la suplementación de antioxidantes al medio de maduración y cultivo es efectiva para apoyar el desarrollo de embriones bovinos *in vitro*, ya que pueden ayudar a proteger contra el desarrollo defectuoso de los embriones ocasionado por el estrés oxidativo (Chowdhury *et al.*, 2017),

En cuanto a los ovocitos clasificados como 3 y 4, se encontró una diferencia significativa para el porcentaje de maduración (P=0.0129), siendo el grupo de 100  $\mu$ M el que obtuvo los mejores resultados (77.36%), lo que también sucedió para el porcentaje de segmentación (P=0.0184), siendo el grupo de 200  $\mu$ M el que obtuvo el resultado más alto (25.00%). Contrario a lo esperado para los ovocitos clasificados como calidad 1 y 2, debido a sus características morfológicas, se esperaría que los ovocitos clasificación 3 y 4 no presentasen altos porcentajes de maduración debido a la poca presencia o ausencia total de las células del *cumulus*, las cuales influyen significativamente en su maduración, así como en la adquisición de su competencia para su desarrollo debido a la comunicación celular entre el ovocito y las células del *cumulus* que lo rodean (Nevoral *et al.*, 2014). Además, estas características son indicadores morfológicos para la maduración de los ovocitos, ya que los ovocitos que presentan una expansión de las células del *cumulus* son de buena calidad y alcanzaron su maduración mientras que aquellos con células compactas se caracterizarían como ovocitos inmaduros (Dinkar y Shankar, 2013). Por lo anterior, se puede interpretar como un efecto positivo el adicionar 100  $\mu$ M  $\alpha$ -tocoferol al medio de MIV sobre el porcentaje de maduración de los ovocitos clasificación 3 y 4.

**Tabla 3.** Porcentajes de maduración, índice de expansión del *cumulus* (CEI), porcentaje de segmentación y blastocistos de ovocitos de bovino madurados con diferentes concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol.

	Tratamiento	Maduración n (%)	CEI <sup>1</sup> M $\pm$ E.E	Segmentación n (%) <sup>2</sup>	Blastocistos n(%) <sup>3</sup>
Clasificación	Control <sup>4</sup>	242/261 (92.72) <sup>a</sup>	1.64 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	57/255 (22.35) <sup>a</sup>	18/132 (13.64) <sup>a</sup>
1 y 2*	Testigo <sup>5</sup>	243/260 (93.46) <sup>a</sup>	1.63 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	62/260 (23.85) <sup>a</sup>	16/136 (11.76) <sup>a</sup>
	100 $\mu$ M	226/244 (92.62) <sup>a</sup>	1.53 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	57/242 (23.55) <sup>a</sup>	21/114 (18.42) <sup>a</sup>
	200 $\mu$ M	280/300 (93.33) <sup>a</sup>	1.65 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	78/300 (26.00) <sup>a</sup>	38/152 (25.00) <sup>a</sup>
	400 $\mu$ M	285/312 (91.35) <sup>a</sup>	1.49 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	77/312 (24.68) <sup>a</sup>	16/118 (3.56) <sup>a</sup>
Clasificación	Control	85/130 (65.38) <sup>B</sup>	0.82 $\pm$ 0.12 <sup>A</sup>	18/132 (13.64) <sup>B</sup>	6/132 (4.55) <sup>A</sup>
3 y 4**	Testigo	82/135 (60.74) <sup>B</sup>	0.72 $\pm$ 0.13 <sup>A</sup>	16/136 (11.76) <sup>B</sup>	16/134 (11.76) <sup>A</sup>
	100 $\mu$ M	82/106 (77.36) <sup>A</sup>	0.92 $\pm$ 0.11 <sup>A</sup>	21/114 (18.42) <sup>B</sup>	15/114 (13.16) <sup>A</sup>
	200 $\mu$ M	95/152 (62.50) <sup>B</sup>	0.72 $\pm$ 0.11 <sup>A</sup>	38/152 (25.00) <sup>A</sup>	16/152 (10.53) <sup>A</sup>
	400 $\mu$ M	65/117 (55.56) <sup>B</sup>	0.70 $\pm$ 0.11 <sup>A</sup>	16/118 (3.56) <sup>B</sup>	12/118 (3.56) <sup>A</sup>

<sup>1</sup> Índice de expansión del *cumulus*

<sup>2</sup> La diferencia entre el número total de ovocitos en maduración y presuntos cigotos se debe a que por la manipulación algunos ovocitos se extraviaron.

<sup>3</sup> La diferencia entre el número total de presuntos cigotos y blastocistos se debe a que en algunas corridas se presentó contaminación bacteriana en el CIV, por lo cual fueran descartadas del estudio.

<sup>4</sup> Tratamiento Control: medio de maduración desarrollado por la Universidad Politécnica Estatal de California (UPEC).

<sup>5</sup> Tratamiento Testigo: medio de maduración UPEC adicionado con 0.1% (v/v) de etanol.

<sup>a</sup> Diferentes literales dentro de la misma columna indican diferencia ( $P < 0.05$ ) en los ovocitos grado 1 y 2.

<sup>A, B</sup> Diferentes literales dentro de la misma columna indican diferencia ( $P < 0.05$ ) en los ovocitos grado 3 y 4.

\*Valor de P para los ovocitos madurados con diferentes concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol grado 1 y 2.

Porcentaje de maduración ( $P=0.8715$ ).

Índice de Expansión del *Cumulus* ( $P=0.7716$ ).

Porcentaje de segmentación ( $P=0.8917$ ).

Porcentaje de blastocistos ( $P=0.5032$ ).

\*\*Valor de P para los ovocitos madurados con diferentes concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol grado 3 y 4.

Porcentaje de maduración ( $P=0.0129$ ).

Índice de Expansión del *Cumulus* ( $P=0.7396$ ).

Porcentaje de segmentación ( $P=0.0184$ ).

Porcentaje de blastocistos ( $P=0.1821$ ).

Si bien, el efecto del  $\alpha$ -tocoferol sobre los espermatozoides está bien establecido durante los procesos de criopreservación de espermatozoides (siendo el mayor protector de membrana, inhibiendo la peroxidación lipídica eliminando los radicales derivados de lípidos) (de Vasconcelos *et al.*, 2016), su efecto y funcionamiento sobre los ovocitos no es lo suficientemente claro (dos Santos *et al.*, 2019). El  $\alpha$ -tocoferol se encuentra presente en las células animales protegiéndolas de la oxidación,

reaccionando con las ROS y los radicales lipídicos que se producen durante la peroxidación lipídica, evitando las reacciones en cadena de los radicales, proporcionando su propiedad antioxidante (Enging, 2009; Takahashi, 2012). Por lo anterior, algunos investigadores consideran al  $\alpha$ -tocoferol como un removedor de ROS y ha sido utilizado en diferentes estudios; tal es el caso de los resultados obtenidos por Vázquez *et al.* (2014), en el cual se utilizó  $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico ambos a una concentración de 100  $\mu$ M en el medio de MIV de ovocitos de bovino y se evaluó su efecto sobre la producción de ROS en el medio de cultivo, observaron que en el medio tratado con  $\alpha$ -tocoferol disminuyó la producción de ROS en comparación con el ácido ascórbico. Así mismo, en el estudio llevado a cabo por Olson y Seidel (2000), en el cual se evaluó el efecto de la vitamina E y vitamina C a una concentración de 100  $\mu$ M en el cultivo de embriones de bovino, se encontró que un mayor número de cigotos se desarrollaron hasta blastocistos expandidos cuando el medio de cultivo contenía vitamina E (17%) en comparación con el grupo control (11%), además, el desarrollo de blastocistos tempranos, expandidos y eclosionados fue menor en los grupos en los que se combinaron ambas vitaminas que en el grupo con solo vitamina E (15%, 9% y 2%, contra 24%, 17% y 5% respectivamente). Los autores indican que, aunque se esperaba que la combinación de las vitaminas mejorara las condiciones de desarrollo embrionario, ya que separadamente, la vitamina E y la vitamina C protegen al ADN contra el daño oxidativo, pero en combinación el daño fue mayor que en el tratamiento sin vitaminas; ambas vitaminas son fuertes agentes reductores y pueden actuar como prooxidantes por el mantenimiento del hierro y otros metales en un estado reducido, promoviendo la peroxidación lipídica (Olson y Seidel, 2000).

Por otra parte, estudios en porcinos han demostrado que la adición de 100  $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol en el cultivo de embriones a las 48 h del comienzo del periodo de cultivo o en el periodo completo de cultivo arrojó mayor porcentaje de blastocistos comparados con el control o con la adición a las 96 o 120 h de iniciado el periodo de cultivo (Hosseini *et al.*, 2007). De la misma forma, en otro estudio llevado a cabo en embriones de porcino por Jeong *et al.* (2006), en el cual se añadió al medio de cultivo diferentes concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol o ácido L-ascórbico (0, 50, 100 y 200  $\mu$ M), se obtuvo un mayor porcentaje de blastocistos en el grupo de 50  $\mu$ M (28.6%) y 100  $\mu$ M (32.4%) de  $\alpha$ -tocoferol comparado con el grupo control (17.6%) y el grupo de 200  $\mu$ M (21.4%), además, reportan un aumento significativo en el número de células de la masa de celular interna, células del trofotodermo y células totales, en el grupo con 100  $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol comparado con el grupo control. Así mismo, se encontró un aumento en el número de células del trofotodermo y células totales del grupo cultivado con 50  $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol comparado con el control, aunque el número de células fue más bajo que el grupo con 100  $\mu$ M. En cuanto al efecto sobre los embriones derivados mediante transferencia nuclear de células somáticas (SCNT), el porcentaje de formación de blastocistos fue

significativamente más alto para el grupo de 100  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -tocoferol comparado con el grupo control y los otros tratamientos. Por último, el efecto antiapoptótico de la adición de 100  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -tocoferol, disminuyó el índice de apoptosis, comparado con el grupo control o con la combinación con ácido L-ascórbico (Jeong *et al.*, 2006).

Con base en la revisión de literatura, se esperaría que los ovocitos clasificación 1 y 2, los cuales cumplían con lo necesario para su completo desarrollo *in vitro*, la adición de  $\alpha$ -tocoferol beneficiaría aún más el desarrollo de los ovocitos (en comparación con los ovocitos clasificación 3 y 4) hasta alcanzar la etapa de blastocistos, obteniendo resultados similares a los obtenidos por los autores antes mencionados anteriormente. Esto debido a que se esperaría que el efecto antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol protegiera a los ovocitos y presuntos embriones durante los procesos *in vitro*, reduciendo los efectos negativos y la producción de ROS durante el manejo, exposición a la luz y diferentes concentraciones de oxígeno. Resultados similares obtuvieron Reis *et al.* (2003), en el cual evaluaron las consecuencias de la exposición de los blastocistos de bovino en SFB suplementado con o sin vitamina E, evaluando los contenidos de ácidos grasos y viabilidad, encontraron que la suplementación con vitamina E incrementó el total y la calidad de los blastocistos ( $P < 0.01$ ); sin embargo, no alteró el contenido de ácidos grasos ni el rendimiento de los blastocistos. No obstante, en cuanto a los resultados obtenidos en los ovocitos clasificación 3 y 4, se notó un efecto positivo de la adición de  $\alpha$ -tocoferol al medio de maduración. Lo anterior en cuanto al porcentaje de maduración, el cual se vio reflejado en los porcentajes de segmentación de los ovocitos de la misma categoría y mismo grupo. Como se mencionó anteriormente, los ovocitos clasificación 3 y 4 poseen menos probabilidad de obtener un desarrollo completo, aun así, los resultados mostraron que la adición de  $\alpha$ -tocoferol benefició su maduración, lo cual influyó en la obtención de una fertilización y segmentación exitosa (Marei *et al.*, 2014). Lo anterior pudo deberse a un efecto protector del  $\alpha$ -tocoferol en la membrana de los ovocitos. La membrana celular del ovocito está compuesta de una mezcla de proteínas y membranas lipídicas; los lípidos desempeñan un papel en la flexibilidad de la membrana, mientras que las proteínas regulan el contenido en las células y regulan el transporte químico de la membrana (Widjiati *et al.*, 2020). Entonces, al ser los fosfolípidos el principal componente en las membranas celulares, los ovocitos clasificación 3 y 4 pudieran tener afectaciones en la membrana que pueden ser beneficiadas del efecto antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol, protegiendo a los fosfolípidos del estrés oxidativo, mejorando la maduración de esos ovocitos, y el subsiguiente desarrollo embrionario.

Otro aspecto que es importante mencionar, es que las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol utilizadas durante el estudio son seguras de utilizar, ya que a pesar de no encontrar un efecto positivo tampoco se observaron efectos negativos en los ovocitos, ya que basados en la literatura y en los

estudios realizados por otros autores, se ha reportado que concentraciones superiores a los 400  $\mu\text{M}$  pueden presentar citotoxicidad (Wang *et al.*, 2002).

**Tabla 4.** Porcentajes de maduración, índice de expansión del *cumulus* (CEI), porcentaje de segmentación y blastocistos de ovocitos madurados con diferentes concentraciones de quercetina.

	Tratamiento	Maduración n (%)	CEI <sup>1</sup> M $\pm$ E.E	Segmentación n (%) <sup>2</sup>	Blastocistos n (%) <sup>3</sup>
Clasificación	CONTROL <sup>4</sup>	155/254 (61.02) <sup>b</sup>	0.88 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>	8/255 (3.14) <sup>a</sup>	8/255 (3.14) <sup>a</sup>
1 y 2*	2 $\mu\text{M}$	143/192 (74.48) <sup>b</sup>	1.21 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	2/192 (1.04) <sup>a</sup>	9/192 (4.69) <sup>a</sup>
	4 $\mu\text{M}$	269/376 (71.54) <sup>b</sup>	1.03 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	12/378 (3.17) <sup>a</sup>	11/376 (2.93) <sup>a</sup>
	8 $\mu\text{M}$	224/324 (64.14) <sup>b</sup>	1.10 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	2/323 (0.62) <sup>a</sup>	8/323 (2.48) <sup>a</sup>
	16 $\mu\text{M}$	206/263 (78.33) <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	7/263 (2.66) <sup>a</sup>	3/263 (1.14) <sup>a</sup>
Clasificación	CONTROL	15/45 (33.33) <sup>A</sup>	0.35 $\pm$ 0.17 <sup>A</sup>	2/46 (4.35) <sup>B</sup>	2/46 (4.35) <sup>B</sup>
3 y 4**	2 $\mu\text{M}$	20/41 (48.78) <sup>A</sup>	0.43 $\pm$ 0.18 <sup>A</sup>	1/42 (2.38) <sup>B</sup>	2/42 (4.76) <sup>B</sup>
	4 $\mu\text{M}$	20/57 (35.09) <sup>A</sup>	0.25 $\pm$ 0.09 <sup>A</sup>	1/57 (1.75) <sup>B</sup>	2/57 (3.51) <sup>B</sup>
	8 $\mu\text{M}$	15/51 (29.41) <sup>A</sup>	0.34 $\pm$ 0.21 <sup>A</sup>	0/55 (0.00) <sup>B</sup>	0/55 (0.00) <sup>B</sup>
	16 $\mu\text{M}$	11/43 (25.58) <sup>A</sup>	0.21 $\pm$ 0.13 <sup>A</sup>	5/45 (11.11) <sup>A</sup>	6/45 (13.33) <sup>A</sup>

<sup>1</sup> Índice de expansión del *cumulus*

<sup>2</sup> La diferencia entre el número total de ovocitos en maduración y presuntos cigotos se debe a que por la manipulación algunos ovocitos se extraviaron.

<sup>3</sup> La diferencia entre el número total de presuntos cigotos y blastocistos se debe a que en algunas corridas se presentó contaminación bacteriana en el CIV, por lo cual fueran descartadas del estudio.

<sup>4</sup> Tratamiento Control: medio de maduración desarrollado por la Universidad Politécnica Estatal de California (UPEC).

<sup>a</sup> Diferentes literales dentro de la misma columna indican diferencia ( $P < 0.05$ ) en los ovocitos grado 1 y 2.

<sup>A, B</sup> Diferentes literales dentro de la misma columna indican diferencia ( $P < 0.05$ ) en los ovocitos grado 3 y 4.

\*Valor de P para los ovocitos madurados con diferentes concentraciones de quercetina clasificación 1 y 2

Porcentaje de maduración ( $P=0.0004$ )

Índice de Expansión del *Cumulus* ( $P=0.9821$ )

Porcentaje de segmentación ( $P=0.0942$ )

Porcentaje de blastocistos ( $P=0.2413$ )

\*\*Valor de P para los ovocitos madurados con diferentes concentraciones de quercetina clasificación 3 y 4

Porcentaje de maduración ( $P=0.2107$ )

Índice de Expansión del *Cumulus* ( $P=0.6488$ )

Porcentaje de segmentación ( $P=0.4165$ )

Porcentaje de blastocistos ( $P=0.0409$ )

Los resultados del Estudio 2 (Tabla 4), en el cual se evaluaron diferentes concentraciones de quercetina en el medio de maduración de los ovocitos, mostraron una diferencia altamente

significativa entre los tratamientos en el porcentaje de maduración ( $P=0.0004$ ) de los ovocitos clasificación 1 y 2, siendo el grupo de  $16 \mu\text{M}$  el que obtuvo el mayor porcentaje entre los tratamientos (78.33%). Así mismo, en los grupos de los ovocitos clasificación 3 y 4 se encontró diferencia significativa en el porcentaje de blastocistos ( $P=0.0409$ ), siendo el grupo de  $16 \mu\text{M}$  el que presentó el mayor porcentaje (13.33%). Dado a que la calidad de los ovocitos es muy importante para una maduración óptima, así como la fertilización y el desarrollo embrionario *in vitro* (Orlovski *et al.*, 2014), esto debido a que la presencia de células del *cumulus* son necesarias para el desarrollo durante la maduración y el crecimiento de los ovocitos; el número de capas de células del *cumulus*, la calidad y la expansión de las mismas son decisivas en el éxito de la maduración *in vitro*, además de que son requeridas para la viabilidad y fertilización de los ovocitos (Nevoral *et al.*, 2014).

Por lo anterior, se esperaba que el efecto de la quercetina en los ovocitos clasificación 1 y 2 hubiese sido aún más notorio, al igual que en el estudio llevado a cabo por Silva *et al.* (2019), en el cual utilizaron ovocitos de cabra clasificación 1 y 2, sometiéndolos a maduración *in vitro* en un medio de maduración con cisteamina a  $10 \mu\text{l/ml}$  y dos grupos utilizando quercetina a una concentración de 4 y  $8 \mu\text{M}$ . En ese estudio encontraron que el grupo de ovocitos con cisteamina y el grupo de quercetina de  $4 \mu\text{M}$  obtuvieron resultados iguales en el porcentaje de expansión de las células del *cumulus*. Sin embargo, el grupo de  $8 \mu\text{M}$  obtuvo un porcentaje significativamente más bajo ( $P<0.05$ ), además, el porcentaje de ovocitos en MII fue más alto en el grupo de quercetina  $4 \mu\text{M}$  que en el grupo de cisteamina ( $P<0.05$ ), mientras que los porcentajes entre el grupo de cisteamina y quercetina  $8 \mu\text{M}$  fueron similares. El porcentaje de apoptosis fue más alto en el grupo de cisteamina que en los otros grupos. Asimismo, encontraron que los ovocitos madurados con  $4 \mu\text{M}$  de quercetina mostraron una mayor actividad mitocondrial que los ovocitos madurados con cisteamina y  $8 \mu\text{M}$  de quercetina ( $P<0.05$ ), concluyendo que la adición de  $4 \mu\text{M}$  de quercetina puede ser utilizado como alternativa económica (la cisteamina es más costosa que la quercetina, incrementando el costo de los medios de MIV) a la cisteamina en la MIV de los ovocitos de cabra.

Con base en lo anterior y en los estudios realizados por otros autores, así como en la revisión de literatura, en donde se ha reportado que la quercetina puede prevenir una disfunción mitocondrial al remover los productos de la oxidación, remover radicales libres y estimulando las enzimas antioxidantes, además de que se ha demostrado que puede mejorar los porcentajes de maduración en cabras y porcinos (Cao *et al.*, 2020), se esperaba que en el presente estudio se observara una mejoría más notoria en la maduración y desarrollo embrionario de los ovocitos sometidos a maduración *in vitro*. Sin embargo, se conoce que existen diferentes retos asociados con la producción de embriones *in vitro*. Estos incluyen o se derivan, del hecho de que, al menos en el caso de ovarios derivados del

matadero, el origen de los ovocitos utilizados (identificación o merito genético de la donadora, etapa del ciclo estral, etapa de la onda folicular) es comúnmente desconocida, por lo cual la calidad de los ovocitos es muy variable, además, la capacidad de los espermatozoides colectados de diferentes sementales para fertilizar a los ovocitos *in vitro*, y los cambios en las condiciones de cultivo postfertilización pueden alterar dramáticamente la calidad de los embriones (Lonergan y Fair, 2015). Estos, y otros factores pudiesen haber influido en las tasas de segmentación y de blastocistos de los ovocitos calidad 1 y 2 obtenidas en el estudio. Asimismo, otro factor que influyó en este aspecto fue que en algunas sesiones de PIV se presentó contaminación microbiológica de los medios de CIV, con lo cual los presuntos cigotos y embriones generados debieron ser desechados.

No obstante, los resultados del estudio 2 (Quercetina) demostraron que a pesar de la calidad de los ovocitos clasificados como 3 y 4, el porcentaje de blastocistos fue más alto al añadir la quercetina al medio de maduración en comparación con el tratamiento control, interpretándose como una mejora en la MIV, la cual se reflejó en los porcentajes de blastocistos obtenidos. Con base en los resultados obtenidos, el uso de antioxidantes representa un método alternativo en el mejoramiento de la MIV. Estos aditivos mejoran la efectividad del medio de cultivo y permiten a los ovocitos inmaduros adquirir competencia para la fertilización y la embriogénesis (Lucas *et al.*, 2015). Aunado a lo anterior, se ha encontrado los metabolitos secundarios de las plantas, exhiben mayor actividad antioxidante y una menor toxicidad que los antioxidantes sintéticos, tal es el caso de la quercetina, perteneciente a los polifenoles (Seddiki *et al.*, 2017). Es conocido que las plantas poseen valor medicinal, particularmente muchas de ellas poseen un gran potencial antioxidante (Ardeshirnia *et al.*, 2017), haciendo que el interés por el uso de las sustancias bioactivas procedentes de las plantas vaya en aumento. Dado a la configuración molecular de la quercetina le es posible remover las ROS, trabajando como un fuerte antioxidante, convirtiéndose en un radical libre al reaccionar con un radical desemparejado, donando un protón (Naseer *et al.*, 2017). Sus efectos positivos han sido observados en la maduración *in vitro* en bovinos. En un estudio realizado por Guemra *et al.* (2013), se observó que el porcentaje de blastocistos fue mayor en los grupos madurados con 0.4, 2, 10 y 50  $\mu\text{M}$  de quercetina (56.9, 59.5, 53.6 y 49.6% respectivamente) comparados con el grupo control (42.3%), además, al hacer la comparación de la quercetina contra otro antioxidante (cisteamina), los grupos de quercetina 0.4 y 2  $\mu\text{M}$  fueron superiores en cuanto a la producción de embriones (56.9 y 59.5%) comparado con el grupo de cisteamina (50.4%) (Guemra *et al.*, 2013).

Igualmente, en un estudio realizado por Orlovski *et al.*, (2014) en la maduración *in vitro* de ovocitos de porcino, encontraron que la adición de 5  $\mu\text{g/mL}$  de quercetina aumentó significativamente la expansión de las células del *cumulus* de los ovocitos ( $P < 0.001$ ), mientras que al utilizar 25  $\mu\text{g/mL}$

de quercetina en el medio de maduración incremento el porcentaje de los embriones en la etapa de mórula comparado con el control, así mismo, en todos los grupos de quercetina (5, 15, 25 y 35  $\mu\text{g/mL}$ ), los porcentajes de embriones en estado de mórula resultaron más altos que el control, por lo cual mostraron que la adición de quercetina durante la maduración *in vitro* tiene un efecto positivo en el desarrollo de los embriones.

Un aspecto importante a considerar que influye durante la maduración *in vitro*, es el manejo desde la recolección y transporte de los ovarios, la recuperación y el cultivo de los ovocitos lo cual involucra exposición a la luz, a altas concentraciones de substratos metabólicos y concentraciones elevadas de oxígeno, lo cual en conjunto conlleva a la inducción del estrés oxidativo, el cual resulta en el envejecimiento prematuro de los ovocitos por un incremento en la producción de ROS, siendo uno de los principales factores perjudiciales para los procesos de maduración nuclear y citoplasmática, que a su vez causan una baja fertilización y un desarrollo tardío de los embriones (Jeong *et al.*, 2006; Remião *et al.*, 2016; Chowdhury *et al.*, 2017; Goodarzi *et al.*, 2017). En fisiología normal, las ROS están involucrados en procesos de señalización contribuyendo al desarrollo normal y función celular. Para alcanzar y mantener los niveles fisiológicos de ROS, hay un balance dinámico entre la generación de ROS y la actividad de antioxidantes para reducir las ROS. Sin embargo, si la capacidad de sintetizar nuevos antioxidantes no es suficiente para reducir las cantidades excedentes de ROS, el estrés oxidativo resulta en daño al ADN, peroxidación lipídica y daño a proteínas (Schoot *et al.*, 2018). Por lo cual, las ROS deben ser inactivados continuamente para mantener niveles fisiológicamente tolerables, de esta manera jugaran un rol normal en las funciones celulares de los ovocitos (Jeong *et al.*, 2006), para esto, la suplementación de antioxidantes al medio de maduración *in vitro* ayuda a disminuir los niveles de ROS bloqueando su formación y protegiendo contra sus efectos dañinos (Remião *et al.*, 2016; Chowdhury *et al.*, 2017; dos Santos *et al.*, 2019); lo anterior fue confirmado en el presente estudio, en el cual se observó que la adición de 16  $\mu\text{M}$  de quercetina incrementó los porcentajes de MIV de los ovocitos de bovino.

Los resultados de ambos estudios, aun cuando en algunas variables no se encontró diferencia significativa se pueden interpretar como el efecto antioxidante positivo que proveen la quercetina y el  $\alpha$ -tocoferol al ser añadidos al medio de maduración, ya que como se mencionó anteriormente, la adición de un antioxidante al medio de maduración de los ovocitos en concentraciones apropiadas puede prevenir los efectos ocasionados por las ROS y el estrés oxidativo, de tal forma que los ovocitos puedan llevar a cabo su maduración de forma normal para poder sobrellevar los procesos de fertilización y el desarrollo embrionario.

## 7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos mostraron que la adición de antioxidantes al medio de maduración *in vitro* de los ovocitos favorece la maduración *in vitro* y el desarrollo hasta blastocistos, siendo 100  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -tocoferol, y 2 y 16  $\mu\text{M}$  de quercetina las concentraciones que mostraron mayores porcentajes en las variables evaluadas entre los tratamientos utilizados. Se recomienda profundizar en la investigación sobre estos antioxidantes en la producción *in vitro* de embriones, evaluando otras concentraciones o combinaciones entre estos antioxidantes.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akar Y., Ahmad N., Khalid M. 2018. The effect of cadmium on the bovine *in vitro* oocyte maturation and early development. *Int J Vet Sci Med.* 6:573-577
- Alcoba D. D., Schneider J., Arruda L., Martiny P. B., Capp E., Corleta E. von E., Brum I. S. 2017. Brilliant cresyl blue staining does not present cytotoxic effects on human luteinized follicular cells, according to gene/protein expression, as well as to cytotoxicity tests. *Reprod Biol.* 17:60-68
- Alm A., Torner H., Lohrke T., Ghoneim I. M., Kanitz W. 2005. Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliantcresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6- phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology* 63:2194-2205
- Alrawaiq N. S., Abdullah A. 2014. A review of flavonoid quercetin: metabolism, bioactivity and antioxidant properties. *Int J Pharmtech Res* 6:933-941
- Arias M. E., Andara K., Briones E., Felmer R. 2017. Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reprod Biol.* 17:126-132
- Balaban B., Urman B. 2006. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod BioMed Online.* 12:608-615
- Banihosseini S. Z., Novin M., G., Nazarian H., Piryaei A., PArvardeh S., Eini F. 2018. Quercetin improves developmental competence of mouse oocytes by reducing oxidative stress during *in vitro* maturation. *Ann Anim Sci* 18:87-98
- Bó G. A., Mapletoft R. J. 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim Reprod.* 10:344-348
- Boccia L., Francesco S. D., Neglia G., Blasi M., Longobardi V., Campanile G., Gasparini B. 2013. Osteopontin improves sperm capacitation and *in vitro* fertilization efficiency in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 80: 212-217.
- Boots A. W., Haenen G. R. M. M., Bast A. 2008. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol* 585:325-337
- Bormann C. L., Onger E. M., Krisher R. L. 2003. The effect of vitamins during maturation of caprine oocytes on subsequent developmental potential *in vitro*. *Theriogenology* 59:1373-1380

- Buroszewska D., Sinderewicz E., Zieba K. I., Grycmacher K., Potocka W. I. 2015. The effect of lysophosphatidic acid during *in vitro* maturation of bovine *cumulus*-oocyte complexes: *cumulus* expansion, glucose metabolism and expression of genes involved in the ovulatory cascade, oocyte and blastocyst competence. *Reprod Biol Endocrinol.* 13:44
- Cao Y., Zhao H., Wang Z., Zhang C., Bian Y., Liu X., Zhang C., Zhan X., Zhao Y. 2020. Quercetin promotes *in vitro* maturation of oocytes from humans and aged mice. *Cell Death Dis* 11:965
- Cavalieri F. L. B., Morotti F., Seneda M. M. Colombo A. H. B., Andreazzi M. A., Emanuelli I. P., Rigolon L. P. 2017. Improvement of bovine *in vitro* embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology* 117:57-60
- Chowdhury M. M. R., Choi B. H., Khan I., Lee K. L., Mesalam A., Song S. H., Xu L., Joo M. D., Afrin F., Kong I. K. 2017. Supplementation of lycopene in maturation media improves bovine quality *in vitro*. *Theriogenology.* 103:173-184
- Coello A., Sanchez E., Vallejo B., Meseguer M., Remohí J., Cobo A. 2019. Effect of the oocyte morphology on post-warming survival and embryo development in vitrified autologous oocytes. *Reprod BioMed Online* 38:313-320
- Dadashpour D. N., Zeinoaldini S., Kohram H. 2012. A novel ovine oocyte recovery method from slaughterhouse material. *Small Rum Res.* 106:168-172
- Dalvit G. C., Miragaya M. H., Chaves M. G., Beconi M. T. 1994. Energy requirement of bovine spermatozoa for *in vitro* capacitation. *Theriogenology* 44:1051-1056
- Dinkar K. S., Shankar B. H. 2013. Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for *in vitro* embryo production: A review. *Adv Biosci Biotechnol.* 4:170-182
- Ditoykin A. V., Hrabovszká S., Štochmal'ová A., Grossmann R., Alwasel S., Harrath H. A. 2019. Effect of quercetin on ovarian cells of pigs and cattle. *Anim Reprod Sci* 205:44-51
- dos Santos E. C., Varcheta R., de Lima C. B., Ispada J., Martinho H. S., Fontes P. K., Nogueira M. F. G., Gasparini B., Milazzotto M. P. 2019. The effects of crocetin supplementation on the blastocyst outcome, transcriptomic and metabolic profile of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology* 123:30-36

- El-Raey M., Geshi M., Smfai T., Kaneda M., Hirako M., Abdel-Ghaffar A. E., Sosa G. A., Abou E. R. M. E. A., Nagai T. 2011. Evidence of melatonin synthesis in the *cumulus* oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation *in vitro* in cattle. *Mol Reprod Dev* 78:250-262
- Engin K. N. 2009. Alpha-tocopherol: looking beyond and antioxidant. *Mol Vision* 15:855-860
- Fabjan S. J. M. G., Locatelli Y., Duffard N., Corbin E., Touzé J. L., Perreau C., Beckers J. F., Freitas F. V. J., Mermillod P. 2014. *In vitro* embryo production in goats: Slaughterhouse and laparoscopic ovum pick up-derived oocytes have different kinetics and requirements regarding maturation media. *Theriogenology* 81:1021-1031
- Fábrega A., Puigmulé M., Bonet S., Pinart E. 2012. Epididymal maturation and ejaculation are key events for further *in vitro* capacitation of boar spermatozoa. *Theriogenology* 78:867-877
- Fan Z., Yang M., Regouski M., Polejaeva I. A. 2017. Effects of three different media on *in vitro* maturation and development, intracellular glutathione and reactive oxygen species levels, and maternal gene expression of abattoir-derived goat oocytes. *Small Rum Res.* 147:106-114
- Ferreira E. M., Vireque A. A., Adona P. R., Meirelles F. V., Ferriani R. A., Navarro P. A. A. S. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 71:836-848
- Fraser L. R., Quinn P. J. 1981. *In vitro* capacitation and fertilization. *J Reprod Fertil* 61:239-253
- Fry R. C., Niall E. M., Simpson T. L., Squires T. J., Reynolds J. 1996. The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology* 47:977-987
- Funsho F. C., Downs S. M. 1990. Maturation of the mouse oocyte-*cumulus* cell complex: stimulation by lectins. *Biol Reprod.* 42:413-423
- García -Álvarez O., Maroto-Morales A., Berlinguer F., Fernández-Santos M. R., Estes M. C., Mermillod P., Ortiz J. A., Ramon M., Pérez-Guzmán M. D., Garde J. J., Soler A. J. 2011. Effect of storage temperatura during transport of ovaries on *in vitro* embryo production in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Theriogenology* 75:65-72
- Gardón J. C., Matás C., Gadea J. 2001. Efecto del protocolo de preparación de los espermatozoides bovinos sobre el patrón de reacción acrosómica. *An Vet Murcia* 17:19-26

- Gilchrist R. B., Thompson J. G. 2007. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. *Theriogenology*. 67:6-15
- Gooaverts I. G. F., Leroy J. L. M. R., Jorssen E. P. A., Bols P. E. J. 2010. Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. *Theriogenology*. 74:1509-1520.
- Goodarzi A., Shahneh A. Z., Kohram H., Sadeghi M., Moazenizadeh M. H., Fouladi-Nashta A., Davachi N. D. 2017. Effect of melatonin supplementation in the long-term preservation of the sheep ovaries at different temperatures and subsequent *in vitro* embryo production. *Theriogenology*. 106:265-270
- Gordon I. 2003. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Chapter 4: Maturing the Bovine Oocyte. 2nd Ed. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Guemra S., Monzani P. S., Santos E. S., Zanin R., Ohashi O.M., Miranda M. S., Adona P. R. 2013. In vitro maturation of bovine oocytes in médium supplemented with quercetin, and its effect on embryonic development. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 65:1616-1624
- Guimarães A. L. S., Pereira S. A., Leme L. O., Dode M. A. N. 2015. Evaluation of the stimulated physiological oocyte maturation system for improving bovine *in vitro* embryo production. *Theriogenology* 83:52-57
- Gülşen A., Makris D. P., Kefalas P. 2007. Biomimetic oxidation of quercetin: isolation of a naturally occurring quercetin heterodimer and evaluation of its *in vitro* antioxidant properties. *Food Res Int* 40:7-14
- Halvaei I., Khalili M. A., Soleimani M., Hossein R. M. 2011. Evaluating the role of first polar body morphology on rates of fertilization and embryo development in ICSI cycles. *Int J Fertil Steril* 5:110-115
- Holt J. E., Lane S. I. R., Jones, K. T. (2013). The control of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Curr Top Dev Biol*. 102: 207–226.
- Hoshi H. 2003. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 59:675-685
- Huanca W., Palomino J. M., Cervantes M., Cordero A., Huanca T. 2007. Efecto de temperaturas de transporte (35°, 4°C), sobre la calidad morfológica de ovocitos colectados desde ovarios de alpacas. *Memorias XX Reunión ALPA*. Cusco, Perú. 1-3

- INEGI. 2017. Calendario GPS y Coordinadas RGNA ITRF08. Marzo 2017, de INEGI Sitio web: [http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/geodesia/doc/cale2017\\_itrf2008.pdf](http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/geodesia/doc/cale2017_itrf2008.pdf)
- Jackowska M., Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Budna J., Lianeri M., Rosinska E., Wozna M., Jagodzinski P. P., Jaskowski M. J. 2008. The morphology of porcine oocytes is associated with zona pellucida glycoprotein transcript contents. *Reprod Biol.* 9:79-85
- Jeong Y. W., Park S. W., Hossein M. S., Kim S., Kim J. H., Lee S. H., Kang S. K., Lee B. C., Hwang W. S. 2006. Antiapoptotic and embryotrophic effects of  $\alpha$ -tocopherol and  $\iota$ -ascorbic acid on porcine embryos derived from *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology.* 66:2104-2112
- Jewgenow K., Gonzalez F. K., Jänsch S., Viertel D., Zahmel J. 2019. Brilliant cresyl blue staining allows the selection for developmentally competent immature feline oocytes. *Theriogenology* 126:320-325
- Jia Y., Lin J., Mi Y., Zhang C. 2011. Quercetin attenuates cadmium-induced oxidative damage and apoptosis in granulosa cells from chicken ovarian follicles. *Reprod Toxicol.* 31:477-485
- Kang J. T., Kwon D. K., Park S. J., Kim S. J., Moon H. J., Koo K. J., Jang G., Lee B. C. 2013. Quercetin improves the *in vitro* development of porcine oocytes by decreasing reactive oxygen species levels. *J. Vet. Sci.* 14:15-20
- Kang J. T., Moon J. H., Choi J. Y., Park S. J., Kim S. J., Saadeldin I. M., Lee B. C. 2016. Effect of antioxidant flavonoids (quercetin and taxifolin) on *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Asian Australas J Anim Sci* 29:352-358
- Khan I., Chowdhury M. M. R., Song S. H., Mesalam A., Zhang S., Khalil A. A. K., Jung E. H., Kim J. B., Jafri L., Mirza B., Kong I. K. 2017. Lupeol supplementation improves the developmental competence of bovine embryos *in vitro*. *Theriogenology.* 107:203-210
- Liang C. G., Su Y. Q., Fan H. Y., Schatten H., Sun Q. Y. 2007. Mechanisms regulatin oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol* 21:2037-2055
- Lonergan P., Fair T. 2014. The ART of studying early embryo development: Progress and challenges in ruminant embryo culture. *Theriogenology.* 81:49-55
- Lonergan P., Fair T. 2015. Maturation of Oocytes *in Vitro*. *Annu Rev Anim Biosci* 4:10.1-10.14

- Lucas C. G., Remião M. H., Komninou E. R., Domingues W. B., Haas C., de Leon P. M. M., Campos V. F., Ourique A., Guterres S. S., Pohlmann A. R., Basso A. C., Seixas F. K., Beck R. C. R., Collares T. 2015. Tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules decrease reactive oxygen species levels and improve bovine embryonic development during *in vitro* oocyte maturation. *Reprod Toxicol.* 58:131-139
- Luo Y., Che M. J., Liu C., Liu H. G., Fu W. X., Hou Y. P. Toxicity and related mechanisms of dihydroartemisinin on porcine oocyte maturation *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 341:8-15
- Machado G. M., Carvalho J. O., Siqueira Filho E., Caixeta E. S., Franco M. M., Rumpf R., Dode M. A. N. 2009. Effect of Percoll volumen, duration and forcé of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology.* 71:1289-1297
- Machaty Z., Peippo J., Peter A. 2012. Production and manipulation of bovine embryos and terminology. *Theriogenology* 78:937-950
- Maciel J. V. L., Bussiere C. M. C., Silveira V., Reis R. S., Rios A. F. L., Carvalho P. C. S. 2018. L- arginine alters the proteome of frozen-thawed bovine sperm during *in vitro* capacitation. *Theriogenology* 119:1-9
- Marei W. F., Abayasekara D. R. E., Wathes D. C., Fouladi-Nashta A. A. 2014. Role of PTGS2-generated PGE<sub>2</sub> during gonadotrophin-induced bovine oocyte maturation and *cumulus* cell expansion. *Reprod BioMed Online* 28:388-400
- Marei W. F., Wathes D. C., Fouladi-Nashta A. A. 2012. Differential effects of linoleic and alpha-linolenic fatty acid on spatial and temporal mitochondrial distribution and activity in bovine oocytes. *Reprod Fertil Dev* 24:679-690
- Martinez G., Hograindleur P. J., Jemmet L., Blévec L. E., Coutton C., Mermillod P., Lambeau G., Schmitt E., Ray F. P., Arnoult C. 2019. Enzymatic activity of mouse group X-sPLA2 improves *in vitro* production of preimplantation bovine embryos. *Theriogenology* 131:113-122
- Maruri A., Cruzans P. R., Lorenzo M. S., Tello M. F., Teplitz G. M., Carou M. C., Lombardo D. M. 2018. Embryotrophic effect of a short-term embryo coculture with bovine luteal cells. *Theriogenology.* 119:143-149

- Matás C., Sansegundo M., Ruiz S., Vázquez G. F. A., Gadea J., Romar R., Coy P. 2010. Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration ability of ejaculated and epididymal boar spermatozoa. *Theriogenology* 74:1327-1340
- Mirshamsi S. M., KaramiShabankareh H., Hamedani A. M., Soltani L., Hajarian H., Abdolmohammadi A. R. 2013. Combination of oocyte and zygote selection by brilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental potential to the blastocyst in cattle. *Anim Reprod Sci.* 136:245-251
- Mlynarčíková A., Nagyová E., Ficková M., Scsuková S. 2009. Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, *cumulus* expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte-*cumulus* complexes. *Toxicol In Vitro* 23:371-377
- Moussa M., Li M. Q., Zheng H. Y., Yang C. Y., Yan S. F., Yu N. Q., Huang J. X., Shang J. H. 2018. Developmental competence of buffalo (*Bubalus bubalis*) denuded oocytes cocultured with *cumulus* cells: Protective role of *cumulus* cells. *Theriogenology.* 120:40-46
- Mutha R. M., Uma M. Y. 2012. Efficacy of different harvesting techniques on oocyte retrieval from buffalo ovaries. *Buffalo Bulletin* 31:209-213
- Nagyová E., Vanderhyden B. C., Procházka R. 2000. Secretion of paracrine factors enabling expansion of *cumulus* cells is developmentally regulated in pig oocytes. *Biol Reprod* 63:1149-1156
- Naresh S., Atreja K. S. 2015. The protein tyrosine phosphorylation during *in vitro* capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Cryobiology* 70:211-216
- Naseer Z., Ahmad E., Epikmen T. E., Uçan U., Boyacioglu M., Ipek E., Akosy M. 2017. Quercetin supplemented diet improves follicular development, oocyte quality, and reduces ovarian apoptosis in rabbits during summer heat stress. *Theriogenology* 96:136-141
- Nevoral J., Orsál M., Klein P., Petr J., Dvořáková M., Weingartová I., Vyskočilová A., Zámotná K., Krejčová T., Jílek F. 2014. Cumulus cell expansion, its role in oocyte biology and perspectives of measurement: a review. *Sci Agric Bohem.* 45:212-225
- Nogueira da Costa N., Brito K. N. L., Santana P. P. B., Cordeiro M. S., Silva T. V. G., Santos A. X., Ramos P. C., Santos S. S. D., King W. A., Miranda M. S., Ohashi O. M. 2015. Effect of cortisol on bovine oocyte maturation and embryo development *in vitro*. *Theriogenology.* 85:323-329
- Olson S. E., Seidel G. E. 2000. Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. *Biol Reprod.* 62:248-252

- Opiela J., Książkiewicz L. K. 2013. The utility of Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for *in vitro* embryo production (IVP). *Reprod Biol.* 13:177-183
- Orlovski D., Miclea I., Zahan M., Miclea V., Pernes A. 2014. Quercetin efficacy on *in vitro* maturation of porcine oocytes. *J Anim Sci Biotechnol* 47:113-115
- Papadopoulos S., Theodosiadou E., Kantas D., Valasi I. 2015. The application of *in vitro* fertilization techniques for the evaluation of ram fertility. *J Hellenic Vet Med Soc.* 66:63-69
- Parris J. J. 2014. Bovine *in vitro* fertilization: *In vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology.* 81:67-73
- Parrish J. J., Parrish S. J. L., Graham J. K. 1999. *In vitro* capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. *Theriogenology* 51:461-472
- Pezler E. S., Harris J. E., Allan J. A., Waterhouse M. A., Ross T., Beagley K. W., Knox C. L. 2013. TUNEL analysis of DNA fragmentation in mouse unfertilized oocytes: The effect of microorganisms within human follicular fluid collected during IVF cycles. *J Reprod Immunol.* 99:69-79.
- Plourde D., Vigneault C., Laflamme I., Blondin P., Robert C. 2012. Cellular and molecular characterization of the impact of laboratory setup on bovine *in vitro* embryo production. *Theriogenology* 77:1767-1778
- Reis A., Rooke J. A., McCallum G. J., Staines M. E., Ewen M., Lomax M. A., McEvoy T. G. 2003. Consequences of exposure to serum, with or without vitamin E supplementation, in terms of the fatty acid content and viability of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 15:275-284
- Remião M. H., Lucas C. G., Domingues W. B., Silveira T., Barther N. N., Komninou E. R., Basso A. C., Jornada D. S., Beck R. C. R., Pohlmann A. R., Junior A. S. V., Seixas F. K., Campos V. F., Guterres S. S., Collares T. 2016. Melatonin delivery by nanocapsules during *in vitro* bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. *Reprod Toxicol.* 63:70-81
- Rizos D., Clemente M., Bermejo-Alvarez P., de la Fuente J., Lonergan P., Gutiérrez-Adán A. 2008. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Dom Anim* 43:44-50

- Rizos D., Ward F., Duffy P., Boland M. P., Lonergan P. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev.* 61: 234-248.
- Rocha-Frigoni N. A. S., Leao B. C. S., Dall'Acqua P. C., Mingoti G. Z. 2016. Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured *in vitro* with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development. *Theriogenology.* 86:1897-1905
- Samaniego J. X., Ayala L. E., Nieto P. E., Rodas E. R., Vazquez J. M., Murillo Y. A., Dután J. B., Calle G. R., Argudo D. E., Perea F. P. 2017. Competencia del ovocito bovino obtenido por Ovum pick-up valorado mediante el azul brillante de cresilo. *Maskana* 8:77-80
- Schoots M. H., Gordijn S. J., Scherjon S. A., van Goor H., Hillebrands J. L. 2018. Oxidative stress in placental pathology. *Placenta.* 69:153-161
- Silva A. A. A., Silva M. N. P., Figueiredo L. B. F., Goncalves J. D., Silva M. J. S., Loiola M. L. G., Bastos B. D. M., Oliveira R. A., Ribeiro L. G. M., Barnerino R. S., Gouveia B. B., Monte A. P. O., Nogueira D. M., Cordeiro M. F., Matos M. H. T., Lopes Júnior E. S. 2019. Quercetine influences *in vitro* maturation, apoptosis and metabolically active mitochondria of goat oocytes. *Zygote* 1-6
- Sirard M. A., Francois R., Blondin P., Claude R. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65:126-136
- Stojkovic M., Machado S. A., Stojkovic P., Zakhartchenko V., Hutzler P., Goncalves P. B., Wolf E. 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biol Reprod.* 64:904-909
- Suzuki H., Satoh M., Toyokawa K. 2005. Changes in distribution of active mitochondria during oocyte maturation and fertilization in the hamster. *J Mamm Ova Res* 22:163-169
- Takahashi Y., Nagano M., Hishinuma M., Katagiri S. 2007. The relationship between oocyte morphology and ovarian status in cattle. *J Reprod Develop* 53:953-958
- Toranzo L. I., Pericuesta E., Álvarez B. P. 2018. Mitochondrial and metabolic adjustments during the final phase of follicular development prior to IVM of bovine oocytes. *Theriogenology.* 119:156-162

- Torner H., Brüssow K. P., Alm H., Ratky J., Pöhland R., Tuchscherer A., Kanit W. 2004. Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding *cumulus* cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology* 61:1675-1689
- Udo N. V., Zayyanu U. U., Oleba O. Emmanuel., Udofia O. D. 2017. Quercetin exerts preventive, ameliorative and prophylactic effects on cadmium chloride – induced oxidative stress in the uterus and ovaries of female Wistar rats. *Food Chem Tox* 102:143-155
- Urrego R., Tarazona A., Oliveria A. M., Camargo O. 2008. Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Rev Colomb Cienc Pecu* 21:398-405
- Walls M. L., Hart R. J. 2018. *In vitro* maturation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 1-13
- Wang H. Y., Jo Y. J., Su Oh J., Kim N. H. 2017. Quercetin delays postovulatory aging of mouse oocytes by regulating SIRT expression and MPF activity. *Oncotarget* 8:38631-38641
- Wang Q., Sun Y. Q. 2007. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reprod Fert Develop* 19:1-12
- Wang Y. S., Zhao X., Su J. M., An Z. X., Xiong X. R., Wang L. J., Liu J., Quan F. S., Hua S., Zhang Y. 2011. Lowering storage temperature during ovary transport is beneficial to the developmental competence of bovine oocytes used for somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci* 124:48-54
- Watson A. J. 2015. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J Anim Sci.* 85:E1-E3
- Widjiati, Faizah Z., Darsini N., Hendrawan V. F., Luqman E. M., Sumitro S. B. 2020. The role of cumulus in the *in vitro* maturation process towards the maturation level of Kacang Goats (*Capra Aegagrushircus*). *J Int Dent Med Res.* 13: 1211-1216
- Wolf C. A., Brass K. E., Rubin M. I. B., Pozzobon S. E., Mozzaquatro F. D., De La Corte F. D. 2008. The effect of sperm selection by Percoll or swim-up on the sex ratio of *in vitro* produced bovine embryos. *Anim Reprod.* 5:110-115
- Zhang W., Yi K., Yan H., Xu Z. 2012. Advances on *in vitro* production and cryopreservation of porcine embryos. *Anim Reprod Sci.* 132:115-122

Zhao X. M., Wang N., Hao H. S., Li C. Y., Zhao Y. H., Yan C. L., Wang H. Y., Du W. H., Wang D., Liu Y., Pang Y. W., Zhu H. B. 2018. Melatonin improves the fertilization capacity and developmental ability of bovine oocytes by regulation cytoplasmic maturation events. *J Pineal Res* 64:1-15

Zhu J., Moawad A. R., Wang C. Y., Li H. F., Ren J. Y., Dai Y. F. 2018. Advances in *in vitro* production of sheep embryos. *IJVSM*. 6:S15-S26

Zullo G., De Canditiis C., Pero M. E., Albero G., Salzano A., Neglia G., Campanile G., Gasparrini B. 2016. Crocetin improves the quality of *cum*-produced bovine embryos: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and apoptosis. *Theriogenology* 86:1879-1885