



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA**



**Rol del Ácido Alfa Lipoico durante el desarrollo embrionario
preimplantacional de embriones de mamífero**

TESIS DOCTORAL

Licenciada Mariana Carolina Fabra

DIRECTORES:

Dra. Noelia Nikoloff

Dra. Cecilia Cristina Furnus

Facultad de Ciencias Naturales y Museo.

Universidad Nacional de La Plata.

2025

Agradecimientos...

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi directora Noelia, por su apoyo y acompañamiento incondicional durante todo trabajo de mi tesis doctoral, a quien admiro y considero gran maestra y mentora. A mi directora Cecilia, por su orientación, su guía y todos sus consejos en este camino. A Anita, quien siempre me guió con el mismo compromiso, predisposición y dedicación como una directora más, participando en cada corrección y cada debate. A Anabella, quien trabajó codo a codo conmigo, y siempre estuvo ayudándome y apoyándome en cada experimento, en cada nuevo desafío, avanzando en cada etapa, siempre juntas.

Al equipo de trabajo del laboratorio, Pato, Mateo y Nico, por su compromiso con la parte experimental a campo y por ayudarme a cumplir esos objetivos.

A mis mejores amigas, Ailen y Bianca, por sostenerme cada vez que creía no poder. Por su amor incondicional y su contención infinita.

A mi hermana, Sabrina, quien es mi persona-refugio y mi cable a tierra, siempre.

A mis padres, Sandra y José, quienes continuamente me brindaron las herramientas que necesité para poder estudiar una carrera de grado, y siguieron brindándome su contención y apoyo incondicional incluso en la carrera de posgrado.

A mi compañero Jere, por haberme acompañado en este último tiempo, por su amor, su contención, su ayuda y su impulso a cada momento.

Finalmente, a la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, quien fue mi casa de estudios en toda mi formación como profesional, y a CONICET, quien me otorgó la beca doctoral a partir de la cual pude llevar a cabo mis estudios para alcanzar el título de Doctora.

¡Muchas Gracias!

Mariana.

Índice:

Abreviaturas.....	7
i. Introducción General.....	9
i.1. Producción in vitro de embriones (PIV). Reseñas históricas.....	9
i.1.1. Etapas de la PIV.....	18
i.2. Metabolismo del embrión y requerimientos energéticos en el CIV.....	32
i.3. EROs y Antioxidantes en la PIV.....	35
i.4. Ácido Alfa Lipoico.....	39
i.5. Objetivos específicos.....	44
i.6. Hipótesis.....	45
m. Materiales y Métodos General.....	46
m.1. Técnica de PIV de embriones bovinos.....	46
m.1.1. Maduración <i>in vitro</i> (MIV).....	47
m.1.1.1. Obtención de ovocitos de matadero.....	47
m.1.1.2. Obtención de ovocitos mediante OPU.....	49
m.1.2. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV).....	51
m.1.2.1. Preparación de medio y placas de FIV.....	51
m.1.2.2. Preparación de los COCs.....	52
m.1.2.3. Procesamiento de semen.....	52
m.1.3. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	53

m.1.3.1. Preparación de las placas y proceso de CIV	53
m.2. Técnicas empleadas.....	54
m.2.1. Evaluación de la calidad de los complejos ovocito-cúmulus (COCs).....	54
m.2.2. Evaluación visual del desarrollo y calidad embrionaria.....	55
m.2.3. Número total de células embrionarias. Tinción de Hoescht 33342.....	59
m.2.4. Viabilidad embrionaria.....	60
m.2.5. Evaluación de parámetros de estrés oxidativo embrionario mediante técnicas colorimétricas.....	60
m.2.6. Cuantificación de EROs intracelular en cigotos y embriones usando la sonda H2DCFDA.....	63
m.2.7. Cuantificación intracelular de GSH en embriones usando la sonda Thiol Tracker TM Violet.....	64
m.2.8. Evaluación de apoptosis celular. Ensayo TUNEL.....	64
m.2.9. Evaluación de la criopreservación embrionaria.....	64
1. Capítulo 1.....	67
1.1. Introducción.....	67
1.2. Diseño Experimental.....	69
1.2.1. Experimento 1.....	69
1.2.2. Experimento 2.....	69
1.3. Materiales y Métodos.....	71
1.3.1. PIV.....	71
1.3.2. Análisis Estadístico.....	73

1.4. Resultados.....	73
1.4.1. Experimento 1.....	73
1.4.2. Experimento 2.....	75
1.5. Conclusión.....	79
2. Capítulo 2.....	80
2.1. Introducción.....	80
2.2. Diseño Experimental.....	83
2.3. Materiales y Métodos.....	85
2.3.1. PIV.....	85
2.3.2. Análisis Estadístico.....	87
2.4. Resultados.....	87
2.4.1. Etapa I.....	87
2.4.2. Etapa II.....	88
2.4.3. Etapa III.....	90
2.5. Conclusión.....	94
3. Capítulo 3.....	95
3.1. Introducción.....	95
3.2. Diseño Experimental.....	99
3.2.1. Experimento 4.....	99
3.2.2. Experimento 5.....	99
3.3. Materiales y Métodos.....	100

3.3.1. PIV.....	100
3.3.2. Análisis del número total de células de los blastocistos.....	102
3.3.3. Ensayos de H2DCFDA y GSH.....	102
3.3.4. Peroxidación lipídica.....	103
3.3.5. Análisis estadístico.....	103
3.4. Resultados.....	103
3.4.1. Experimento 4.....	104
3.4.2. Experimento 5.....	107
3.5. Conclusión.....	109
4. Discusión final.....	110
5. Conclusiones.....	126
Anexo I.....	129
Anexo II.....	130
Anexo III.....	134
<i>Bibliografía</i>.....	136
Publicaciones.....	179

Abreviaturas

- ácido alfa lipoico (AAL)
- ácido dihidrolipoico (ADHL)
- ácido tiobarbitúrico (TBA)
- activación del genoma embrionario (AGE)
- albúmina sérica bovina (ASB)
- aminoácidos (aa)
- b-Nicotinamida adenina dinucleótido 2'-fosfato reducido tetra-sodio sal hidrato (NADPH)
- complejo ovocito-cúmulus (COCs)
- cultivo *in vitro* (CIV)
- dimetilsulfóxido (DMSO)
- especies reactivas de oxígeno (EROs)
- etanol (ETOH)
- etilenglicol (EG)
- fecundación *in vitro* (FIV)
- fluido oviductal sintético (SOF)
- glutatión oxidado (GSSG)
- glutatión reducido (GSH)
- hormona folículo estimulante (FSH)

- hormona luteinizante (LH)
- macizo celular interno (MCI)
- maduración *in vitro* (MIV)
- malondialdehído (MDA)
- medio esencial mínimo con aminoácidos esenciales (MEM-EAA)
- medio esencial mínimo con aminoácidos No esenciales (MEM-NEAA)
- metafase I (MI)
- metafase II (MII)
- ovum pick-up (OPU)
- piruvato de lactato de albúmina de Tyrode (TALP)
- producción in vitro de embriones (PIV)
- suero fetal bovino (SFB)
- superóxido dismutasa (SOD)
- transferencia de embriones por ovulación múltiple tradicional (MOET)
- trofoectodermo (TE)
- vesícula germinal (VG)

i. Introducción General

i.1. Producción *in vitro* de embriones (PIV). Reseñas históricas

El proceso de fecundación en los mamíferos ha despertado el interés de los científicos incluso antes del siglo XX, donde comenzaron a probarse diversas tecnologías con el objetivo de comprender la biología de la reproducción. A lo largo del tiempo, distintos investigadores han trabajado en aportar datos sobre las gametas, el ovocito y el espermatozoide, de distintas especies, con el fin de establecer las bases que permitieran llevar a cabo el desarrollo embrionario *in vitro*. En primer lugar, resultaba claro que el espermatozoide debía atravesar distintas barreras antes de penetrar en el ovocito y cumplir su función. La primera barrera que obtuvo especial interés por aquellos años fue la establecida por las células que rodean al ovocito, llamadas células del cúmulus. Otra de las barreras, fue la zona pelúcida. En 1842, H. Mayer (1842) observó que la zona que rodea al ovocito se disolvía en una solución de hidróxido de potasio, y concluyó que se trataba de una sola membrana sólida. Wallraff & Beckert (1939) realizan las primeras descripciones de su naturaleza, detectando polisacáridos en ella mediante la reacción de Bauer. Luego, Leach E. (1947) consideró a la zona como una mucoproteína, mientras que Wislocki et al., (1947) la describieron como un mucopolisacárido. Por otra parte, Harter B. (1948) afirmó que se podía demostrar la presencia de glicoproteínas en la zona. Finalmente, su estructura completa se describió en ratones, definiéndose como zona pelúcida, una matriz de glicoproteínas que contenía proteínas específicas que funcionaban como receptores de superficie para los espermatozoides, y estableciéndose el principio de que la zona pelúcida es una barrera importante para prevenir la fecundación interespecífica, siendo específica para cada especie (Chang M., 1968; Florman & Wassarman P., 1985; Wassarman P., 1988). En cuanto a las células del cúmulus, fue en el año 1878 que comenzaron

a realizarse las primeras descripciones. L. Schenk observó que las células del cúmulus de ovocitos de coneja y de cobaya se rompían cuando se añadía una suspensión de espermatozoides *in vitro*. Esa reacción fue analizada exhaustivamente y descrita como una reacción proteolítica, identificándose a la enzima hialuronidasa, que tenía el efecto de despolimerizar el ácido hialurónico, la sustancia aglutinante de las células del cúmulus (Yamane J., 1930; 1935; Pincus & Enzmann 1932; 1935; McClean & Rowlands, 1942; Fekete & Duran-Reynals, 1943; Leonard & Kurzrok; 1945). Se describió al espermatozoide como el responsable de transportar la hialuronidasa, creyendo que desnudaba al ovocito como paso previo a la entrada en éste (Swyer G., 1946; 1947). Si bien muchos investigadores de principios del siglo XX realizaron la fecundación *in vitro* (FIV) manifestando su éxito mediante la obtención de dos cuerpos polares, la principal dificultad radicaba en distinguir entre los efectos resultantes de la penetración de los espermatozoides, y los debidos a la activación partenogénica (Austin C., 1951). Fueron Pincus G. (1930; 1939) y Pincus y Enzmann (1934; 1935) quienes realizan los experimentos más extensos y comprobables en fecundación, con ovocitos de conejo obtenidos de ovario, afirmando la fecundación de muchos de ellos y obteniendo dos pronúcleos, segmentación del cigoto, nacimiento vivo, y señalando que para que ocurra la penetración, los espermatozoides debían estar en una cantidad relativamente alta. Se estableció, además, que la eliminación de las células del cúmulus no es necesaria para la fecundación (Lewis & Wright, 1935; Leonard et al., 1947; Austin C. 1948a; 1948b; Blandau & Odor 1949). En 1951, C. Austin describe que los espermatozoides penetran en cualquier punto de la zona pelúcida de ovocitos de ratas y conejos, y que al cabo de unos minutos se produce la formación del pronúcleo masculino, aportando además que los espermatozoides recién obtenidos del epidídimo eran incapaces de penetrar la zona y debían permanecer dentro del tracto femenino durante un período antes de que puedan penetrar los ovocitos, concluyendo así que necesitaban algún tipo de preparación o capacitación,

producida más específicamente en los oviductos. Además, no era necesario que tengan el cúmulus intacto para ser penetrados. En 1975, ya resultaba claro que los espermatozoides eyaculados de conejo podían ser capacitados *in vitro* para permitir la FIV y el desarrollo de los embriones resultantes en crías vivas (Bracken & Oliphant, 1975).

En el año 1977, se logró con éxito la fecundación de ovocitos bovinos madurados *in vitro* (Iritani & Niwa, 1977; Brackett et al., 1977). Años más tarde, se registró el nacimiento del primer ternero producido mediante FIV de ovocitos ovulados y recuperados del oviducto (Brackett et al., 1981; Lambert et al., 1983). Luego, Hanada et al., (1986) informaron nacimientos a partir de ovocitos madurados y fecundados *in vitro*. Finalmente, un año más tarde, Lu et al., (1987) lograron obtener terneros a partir de un procesamiento completo de maduración, fecundación y cultivo *in vitro* (MIV, FIV y CIV, respectivamente) (Thompson J., 1997). Estos progresos rápidamente comenzaron a repercutir en porcinos, ovinos, cérvidos, caprinos y equinos, además de generar progresos en humanos. En este proceso, se fueron identificando las similitudes, diferencias y dificultades de cada especie, con un especial interés en aquellas en vías de extinción.

Todas las investigaciones concluían en que era necesario desarrollar condiciones *in vitro* similares a aquellas encontradas en el oviducto *in vivo*, que permitieran mantener el ovocito y el espermatozoide en estado funcional. Con esa premisa, comienzan a definirse y diseñarse medios de cultivo que fueran capaces de sostener un desarrollo normal, al mismo tiempo que se analizaba el metabolismo de los embriones cultivados y sus necesidades, generando debates sobre la correcta suplementación de los medios, como ser la utilización de suero (siendo la opción más común suero fetal bovino (SFB)), aminoácidos (aa), albúmina, diversos protectores contra el estrés oxidativo, y combinando esfuerzos por dilucidar las preferencias de sustratos para el desarrollo del embrión con estudios metabólicos.

Además, recibe especial interés el papel del pH en la regulación del desarrollo y el metabolismo, así como también la concentración óptima de O₂ a la cual debían estar expuestos los embriones en desarrollo. Los insumos utilizados adquieren gran relevancia, testeando y utilizando solamente material estéril no embriotóxico (Biggers & Sem, 1973; Rexroad & Powell 1986; Gandolfi & Moor 1987; Boone & Shapiro, 1990; Yoshida M., 1993; Gandolfi F., 1994; Satoh et al., 1994; Bavister B., 1995; Jones G., 1998).

PIV de embriones bovinos

Desde los comienzos de la PIV, el bovino ha sido, sin duda, la especie que más ha contribuido al desarrollo y perfeccionamiento de la técnica. Hoy en día, no solo es aplicada comercialmente en la producción animal (Mucci et al., 2006; Urrego et al., 2014), sino que también se utiliza ampliamente como modelo experimental en estudios de embriología de mamíferos no roedores incluido el humano, ya que los embriones preimplantacionales de bovinos y muchos mamíferos presentan notables similitudes en términos de procesos bioquímicos y reguladores paterno-materno, así como en las interacciones entre el embrión y el cuerpo lúteo (Ménézo & Hérubel, 2002). La optimización de la técnica de PIV en bovinos tiene una enorme importancia por su impacto económico en América del Norte, América del Sur y Europa, en donde en los últimos años se registró un cambio entre los productores de ganado que pasaron de la transferencia de embriones por ovulación múltiple tradicional (MOET) hacia la PIV. (Berglund B., 2008; Ferré et al., 2020). Nuestro país se encuentra entre los principales productores de carne y leche bovina a nivel mundial, y la adopción de la técnica de PIV ha crecido exponencialmente desde el año 2016 (International Embryo Transfer Society - IETS).

Las principales ventajas que ofrece la PIV como biotecnología de la reproducción incluyen un mayor número de embriones y preñeces por unidad de tiempo, con una gama más amplia de donantes (incluidas novillas y hembras de hasta tres meses de gestación), la utilización de animales de alto valor genético, el uso de un número reducido de espermatozoides y la posibilidad de obtener el sexo deseado en la descendencia mediante el empleo de semen sexado (Ferré et al., 2020). En 2021, se generaron más de 1,5 millones de embriones bovinos mediante PIV (Nemcova et al., 2023). Sin embargo, aún hay aspectos no resueltos que incluyen una calidad ovocitaria reducida luego de la MIV, una menor calidad embrionaria, y una criotolerancia más baja, lo que resulta en tasas de preñez reducidas en comparación con los embriones producidos *in vivo*.

De los ovocitos seleccionados y madurados, entre el 20-30 % se desarrollaban hasta llegar a la etapa de blastocisto a día 7-8 posterior a la fecundación. En los últimos años, ese porcentaje sólo ha aumentado al 30-40 % (Lonergan et al., 2001; Rizos et al., 2008; Ferré et al., 2020). Por lo tanto, el desafío es tratar de cerrar la brecha cualitativa y cuantitativa entre los embriones producidos *in vivo* e *in vitro*.

Como se mencionó previamente, el primer ternero nacido producido por PIV nació en el año 1981, y desde entonces se ha puesto un énfasis sustancial en mejorar la eficiencia de la técnica. A partir de la década del 90, además de la tasa de embriones que experimentaban división y desarrollo hasta la etapa de blastocisto, comienza a tener relevancia la calidad de los blastocistos producidos, siendo el método más utilizado el análisis de las características morfológicas, tales como el color de sus células (llamadas blastómeras), el grado de compactación del estadio de mórula, la cinética del desarrollo, el momento de la formación y expansión del blastocisto, y el diámetro del embrión en el momento de la eclosión, es decir, el momento en el que abandona la zona pelúcida, así como también su criotolerancia (Walker et al. 1992; Bavister B., 1995; Abe et al., 1999; Rizos et al., 2002c; Moore et al., 2007). Estas

características junto a nuevos estudios como la expresión génica y los nuevos avances en las evaluaciones mediante inteligencia artificial siguen siendo indicadores de la eficacia del sistema de PIV en los estudios actuales (Mikkola et al., 2024; Rizos et al., 2002; Rocha et al., 2017; Urrego et al., 2014).

En la práctica, la apariencia de un embrión en el día 7 de cultivo es el primer parámetro que cuenta para la selección de embriones, ya sea para transferencia inmediata a una hembra receptora o criopreservación para uso posterior (Rizos et al., 2008). Para la criopreservación de embriones bovinos se utilizan dos tipos de procedimientos: la congelación lenta o convencional, y la vitrificación. La congelación lenta emplea una baja concentración de crioprotectores, la inducción de la formación de cristales de hielo fuera de las células embrionarias y una reducción lenta de la temperatura para que estos cristales de hielo crezcan y absorban agua de las células embrionarias sin que se formen cristales de hielo en su interior. Este proceso continúa hasta que la concentración de crioprotectores en las células alcanza un nivel suficiente como para permitir la formación de una estructura vítrea. La vitrificación, por otro lado, emplea altas concentraciones de crioprotectores y velocidades de enfriamiento muy rápidas para que se forme inmediatamente una estructura vítrea en el interior de las células sin la formación de cristales de hielo (Bondioli K., 2014). Independientemente del método de criopreservación utilizado, la selección de los embriones a criopreservar es siempre un factor clave para el éxito del procedimiento. Sin lugar a duda, las condiciones de cultivo tienen una influencia directa en la supervivencia y el desarrollo de los embriones producidos *in vitro*. Los embriones producidos *in vitro* son más sensibles a la criolesión (Leibo S., 1986; Hasler et al., 1995, Rizos et al, 2008), debido a que tienen más contenido lipídico (Crosier et al., 2001; Fair et al., 2001; Abe et al., 2002), y una zona pelúcida más frágil (Duby et al., 1997). Más aún, está bien documentado que la competencia de desarrollo y la calidad embrionaria disminuye en aquellos embriones obtenidos *in*

vitro con respecto a los obtenidos *in vivo*. Se sugiere que la razón principal por la que los embriones *in vitro* tienen una competencia de desarrollo inferior se debe a una deficiencia de la maquinaria asociada con la transcripción y la traducción (Corcoran et al., 2006), teniendo una expresión reducida de los dispositivos de comunicación intercelular (Boni et al., 1999), diferencias en el metabolismo (Khurana & Niemann, 2000) y una mayor incidencia de anomalías cromosómicas (Viuff et al., 1999; Slimane et al., 2000). Además, se han descrito numerosas diferencias a nivel ultraestructural (Crosier et al., 2000; Fair et al., 2001; Rizos et al., 2002c) así como a nivel de expresión génica (Rizos et al., 2002b; Lonergan et al., 2003a; Wrenzycki et al., 2005; 2007). Hay evidencia de que los embriones obtenidos por PIV tienen menos células, y proporciones más bajas de células en el macizo celular interno (MCI) a células del trofoectodermo (TE) que los embriones *in vivo* en la misma etapa de desarrollo. Esta variación puede estar relacionada con diferentes sistemas de cultivo (Goto et al., 1994; Rieger et al., 1995). En cuanto a la tasa de desarrollo embrionario, dentro de un medio de CIV determinado, los embriones que se desarrollan más rápido con frecuencia son de mayor calidad en función del número de células, la etapa final del desarrollo y la tasa de preñez después de la transferencia (Abe et al., 2004; Lim et al., 2007; Rizos et al., 2008; Ahumada et al., 2013).

En el proceso de PIV, el período más crítico del desarrollo es la etapa de CIV, siendo el periodo más largo y en el que se produce el mayor descenso en el desarrollo embrionario, entre las etapas de dos células y blastocisto. En promedio, un laboratorio pierde entre el 60 % y el 70 % de los ovocitos madurados *in vitro* debido a la incapacidad del embrión para segmentarse y desarrollarse adecuadamente hasta el estadio de blastocisto (Lequarre et al., 2003). La mayor parte del bloqueo embrionario en bovinos ocurre entre la cuarta y quinta transición del ciclo celular (Memili & First, 2000). Este bloqueo del desarrollo, que surge en el embrión bovino

en el estadio de ocho células, es un fenómeno que aún no está completamente comprendido, y probablemente esté correlacionado con la calidad citoplasmática del ovocito. Los ovocitos albergan todos los ARNm y las proteínas necesarias producidas y almacenadas durante la ovogénesis para alcanzar el cuarto o quinto ciclo celular (Barnes & First, 1991; Tadros & Lipshitz, 2009). A medida que avanza el desarrollo, el control cambia de las transcripciones y proteínas maternas a las derivadas del embrión. Este proceso se ha denominado transición materno-embriónica (TME) e implica el agotamiento de las transcripciones maternas por degradación y traducción, el reemplazo de las transcripciones maternas almacenadas en los ovocitos por transcripciones embrionarias, por ejemplo, ARN ribosómicos, y la generación de nuevas transcripciones específicas del embrión (Sirard M., 2010). Se ha demostrado que los microARN específicos (miARN) producidos por el embrión están involucrados en la destrucción de las transcripciones maternas, y se sugirió un papel de miARN específicos en MET para embriones bovinos (Mondou et al., 2012).

El inicio de la expresión génica, basado en gran medida en los productos de un embrión, se conoce como activación del genoma embrionario (AGE) y, como parte de TME, es el evento más importante en el desarrollo preimplantacional de los mamíferos. Se cree que los mecanismos que regulan el inicio de la AGE están ampliamente conservados en los mamíferos, con diferencias específicas de cada especie en el momento de la mayor o principal AGE, que abarca desde la etapa de 8 a 16 células en embriones bovinos (Telford et al., 1990; De Sousa et al., 1998a; Sirard M., 2012), pero actualmente se conoce que existen eventos previos conocidos como menor AGE que ocurren en embriones de 2 a 4 células por lo que podemos considerar dos etapas, una de menor y otra de mayor AGE (Kanka et al., 2009; Sirard M., 2011).

En esta etapa se produce un aumento de la actividad de transcripción (King et al., 1988; Pavlok et al., 1993), organización funcional del nucléolo (Laurincik et al., 2000) y cambio en la síntesis de proteínas (Frei et al., 1989). Sin embargo, los embriones que no logran transcribir su propio genoma no logran desarrollarse más allá de 16 células (Meirelles et al., 2004).

En resumen, en bovinos, durante la ventana de 6 días del período de cultivo posterior a la fecundación, es decir, entre la formación del cigoto y el blastocisto, ocurren varios eventos de desarrollo importantes, lo que determina la calidad del blastocisto. Estos eventos incluyen:

(i) la primera división de segmentación, crítica para determinar el desarrollo posterior del embrión (Lonergan et al., 1999);

(ii) la mayor activación del genoma embrionario en la etapa de 8 a 16 células (Memili y First 2000);

(iii) la compactación de la mórula el día 5, estableciéndose los primeros contactos íntimos entre células en el embrión (van Soom et al., 1997);

(iv) la formación del blastocisto los días 6 y 7, lo que implica la diferenciación de dos poblaciones celulares, el TE y el MCI (Watson A., 1992).

Cualquier modificación del entorno de cultivo, que pudiera afectar a alguno o a todos estos procesos, podría tener un efecto importante en la calidad del embrión. Estas observaciones resaltan la importancia del ambiente de cultivo posterior a la fecundación para la calidad del blastocisto resultante (Rizos et al., 2008). Se ha trabajado en la optimización y perfeccionamiento de esta etapa de PIV a lo largo del tiempo, con el fin de mejorar su eficacia y aplicabilidad. Se han propuesto sistemas de co-cultivo con células somáticas, siendo las elegidas generalmente células de la granulosa bovina, o epiteliales del oviducto bovino, argumentando que de esa forma se agregan al medio factores facilitadores de promoción del crecimiento (muy

probablemente factores de crecimiento peptídico y/o citocinas). Por otro lado, se inician los sistemas de cultivo sin soporte de células somáticas los cuales se denominan comúnmente sistemas "semidefinidos" o "definidos" (Thompson J., 1996), dependiendo de si se utiliza suero (y proteína) o suplementos de macromoléculas sintéticas. En estos sistemas la concentración de cada componente principal se establece previamente a la adición de embriones (a menos que se utilice suero), esto permite la evaluación de los efectos de nuevos componentes adicionados al medio en el desarrollo embrionario (Bavister B., 1995; Leese et al., 1995; Thompson J., 1996). El medio fluido sintético para oviductos (SOF: Tervit et al., 1972), a menudo suplementado con aa y albúmina sérica bovina (SOFaa, ASB: Gardner et al., 1994), y el medio CR1aa (medio CR1 adicionado con aminoácidos esenciales y no esenciales) (Rozenkrans & First, 1994) son dos ejemplos ampliamente utilizados aún en la actualidad en bovinos. De los componentes añadidos al medio para aumentar el desarrollo, la proteína (normalmente ASB) y el SFB parecen tener la mayor influencia en el desarrollo, la morfología y el metabolismo del embrión (Thompson et al., 1998).

i.1.1. Etapas de la PIV

El embrión bovino obtenido por PIV atraviesa procesos biológicos claves que tienen lugar durante la maduración de los ovocitos y el período de desarrollo embrionario entre la fecundación y la formación del blastocisto. Estos procesos se organizan en tres etapas consecutivas que, en su conjunto, forman el proceso completo de PIV.

MIV

Para realizar el proceso de MIV, los ovocitos pueden ser extraídos mediante aspiración de ovarios de matadero o de una hembra donante empleando la técnica de *Ovum pick up* (OPU). En el primer caso, el procedimiento es más sencillo y no

necesita equipamiento sofisticado. Los folículos son directamente aspirados de la superficie del ovario por medio de una aguja acoplada a una jeringa. Por otro lado, para la OPU se necesita equipamiento especializado, personal capacitado y manejo de animales. Sin embargo, la OPU es una herramienta que permite acelerar los programas genéticos en bovinos al propagar los genes deseados de animales con alta calidad genética, por lo que ha cobrado un impulso significativo en los últimos años (Seneda et al., 2020). Para realizar la OPU, el técnico por un lado debe introducir su mano en el recto para poder palpar los ovarios y guiar la aguja para recolectar los ovocitos y por el otro lado, debe introducir una aguja guiada por ultrasonido en la vagina, posterior a la sedación de la zona con anestesia epidural, hasta llegar al ovario. Luego, los ovocitos son aspirados con una bomba de aspiración y recolectados.

Para comprender el proceso de MIV de ovocitos, es fundamental conocer primero la estructura y función del aparato reproductor bovino. La anatomía del sistema reproductor de la vaca (**Figura i.1**) se divide funcionalmente en los componentes encargados de la producción y transporte de ovocitos, y aquellos involucrados con la cópula y la gestación. El aparato reproductor de la hembra está compuesto por dos ovarios, que son los órganos sexuales primarios, cada uno de los cuales se continúa a dos oviductos, dos cuernos uterinos, y un cuerpo uterino. El útero termina en un cérvix, que se extiende hacia la vagina, y finalmente la vulva, que es la apertura externa del aparato reproductor.

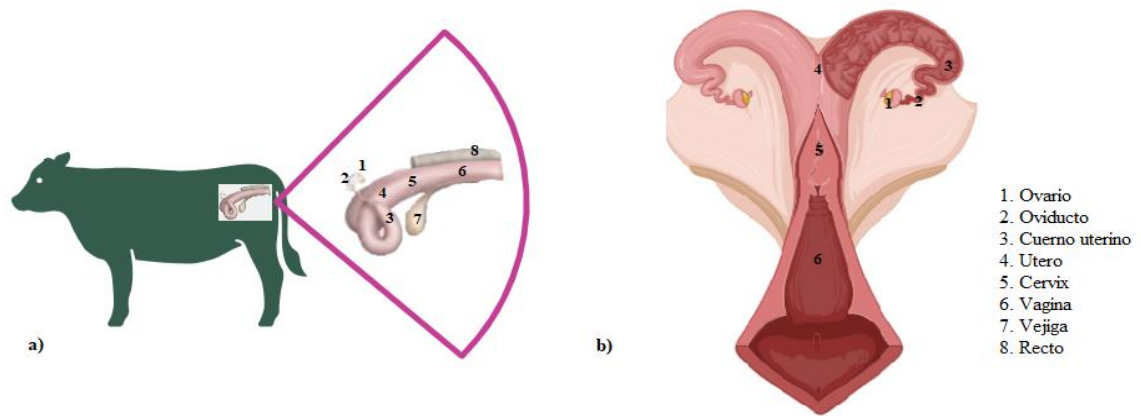


Fig. 1. Aparato reproductor de la hembra bovina. a) Vista lateral. b) Vista dorsal.
Creado con BioRender

Figura i.1. Aparato reproductor de la hembra bovina. a) Vista lateral. b) Vista dorsal. Creado con BioRender.

El ovario consta de una corteza y una médula. La médula tiene una posición interna, y está compuesta de tejido conectivo, vasos linfáticos, vasos sanguíneos y nervios. Alrededor de la médula se encuentra la corteza, que contiene los folículos ováricos inmersos en el estroma del tejido conectivo, dentro de los cuales se encuentra el ovocito rodeado por células foliculares (**Figura i.2 y i.3**). Por fuera de la corteza, el ovario está cubierto por la túnica albugínea fibrosa densa y un epitelio superficial. Debido a que el ovario de la vaca desciende más lejos de su origen embrionario cerca del riñón que en otras especies, se encuentra ubicado más cerca de la pelvis. La consecuencia de esta ubicación ovárica y la inserción del ligamento ovárico (mesovario) corto es que los cuernos uterinos se curvan ventral y caudalmente. (Budras K-D., 2003; Nebel & DeJarnett, 2011).

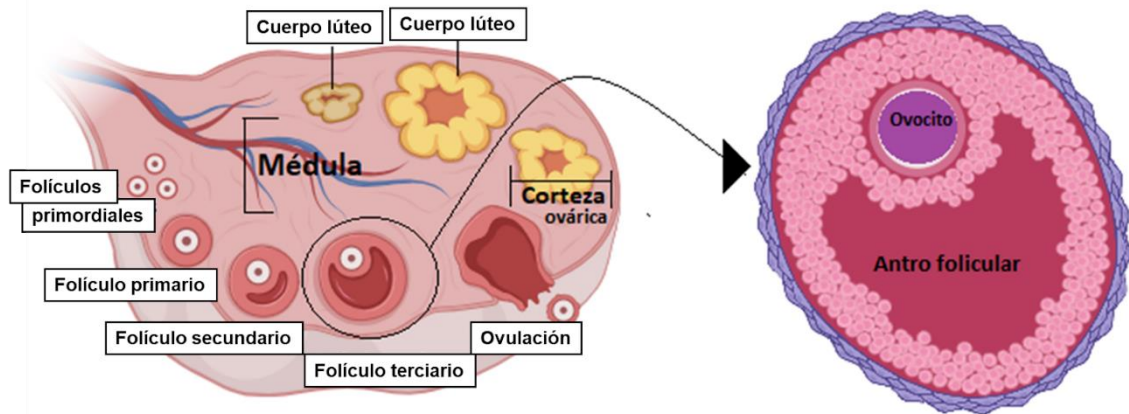


Figura i.2. Esquema de las secciones del ovario, y la ubicación de los folículos ováricos.

Creado con BioRender.

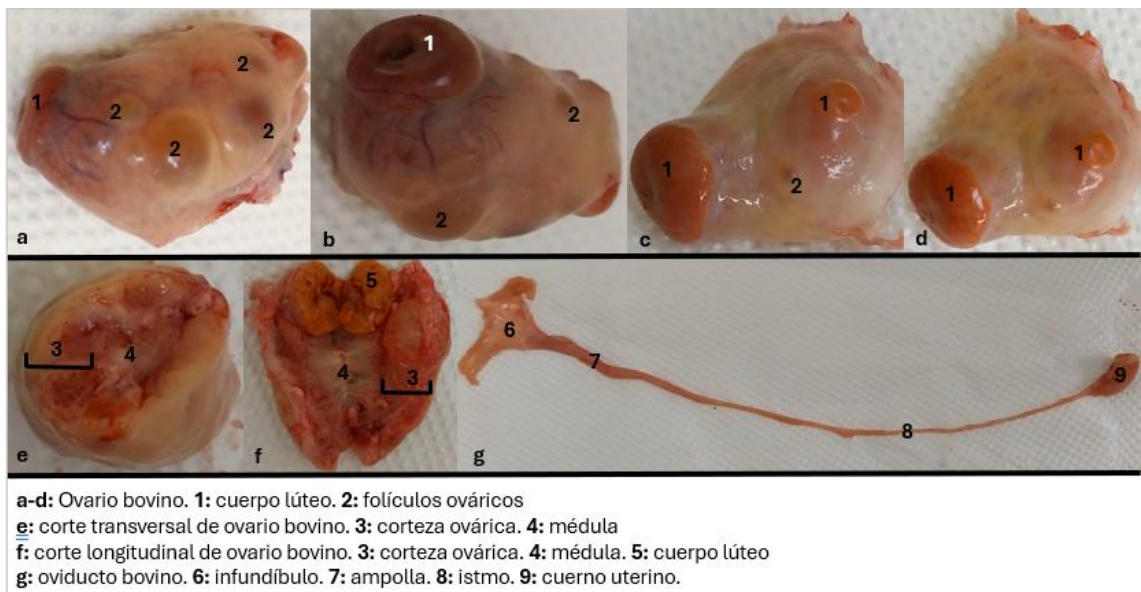


Figura i.3. Fotos de ovarios bovinos. Fotos propias Lic. Fabra M.

El desarrollo de los folículos ováricos de los mamíferos comienza durante la vida fetal. Para estudiar las poblaciones de folículos de manera sistemática, se introduce una clasificación de etapas definidas con precisión (Aerts & Bols, 2010). Las células germinales primordiales, conocidas como ovogonias, proliferan por mitosis y se convierten en ovocitos que entran en el ciclo celular meiótico, dando inicio al proceso de ovogénesis (Fair T., 2003; Moniruzzaman & Miyano, 2010). Los ovocitos

progresan hacia la primera profase meiótica y se detienen en la primera división meiótica (Baker & Franchi, 1967). El ovocito queda rodeado por una sola capa de 4 a 8 células pregranulosas y una lámina basal intacta, formando la primera categoría de folículo, denominada folículo primordial. Los ovocitos contenidos en el folículo primordial forman un depósito finito, que permanecen en la fase de reposo hasta que se los estimula para crecer (Erickson B., 1966). Sin embargo, existen nuevas teorías que postulan la existencia de células germinales mitóticamente activas, capaces de generar nuevos folículos (Bukovsky et al., 2004; Johnson et al., 2004). La activación del crecimiento folicular sucede durante toda la vida. Sin embargo, en el momento de la maduración sexual los folículos completan su crecimiento y culminan en la ovulación de un ovocito maduro o en la atresia folicular (Moniruzzaman & Miyano, 2010). Siguiendo con el desarrollo folicular, los folículos primordiales continuarán su desarrollo, avanzando hacia folículos primarios, secundarios y terciarios (éstos últimos también llamados de De Graaf) (Aerts & Bols, 2010). La foliculogénesis es el proceso que permite obtener un folículo terciario a partir de folículos primordiales (Spicer et al., 1986). La activación del crecimiento del folículo en bovinos se caracteriza por la adquisición de una capa completa de 11 a 20 células cuboidales de la granulosa alrededor del ovocito, formando así el folículo primario (Hulshof et al., 1992). La progresión a la etapa de folículo secundario se caracteriza por la aparición de una segunda capa de células de la granulosa (Driancourt M., 1991) y por la deposición inicial de material alrededor del ovocito, formando la zona pelúcida. Al mismo tiempo se forman gránulos corticales dentro del citoplasma del ovocito (Fair et al., 1997a). Los ovocitos que continúan hacia la siguiente etapa folicular, la terciaria temprana, son transcripcionalmente activos y presentan el inicio de la formación del antro. A medida que el ovocito aumenta de diámetro, se producen más modificaciones, y redistribución de los orgánulos citoplasmáticos. Aparece por primera vez el espacio perivitelino (Fair et al., 1997a). La transición al folículo terciario se caracteriza por la proliferación y diferenciación continua de las células

que rodean al ovocito, las cuales se diferencian en dos poblaciones celulares distintas: la teca interna y la teca externa, además de la lámina basal y las células del cúmulus, así como por la formación de una cavidad antral llena de líquido (Driancourt M., 1991). Es así como comienzan a aparecer espacios entre las células granulosa, consecuencia de la secreción de un material de consistencia líquida por parte de dichas células. Estos espacios posteriormente confluyen en una cavidad denominada antro folicular con líquido, llamado licor folicular. Los folículos reciben el nombre de folículos terciarios (Aerts & Bols, 2010), y están en condiciones de ovular. Otra forma de clasificar los folículos es en folículos preantrales y folículos antrales. Dentro de los folículos preantrales encontramos a los folículos primordiales, primarios y secundarios, y dentro de los folículos antrales están los folículos terciarios (Hafez E., 1996) (**Figura i.4**).

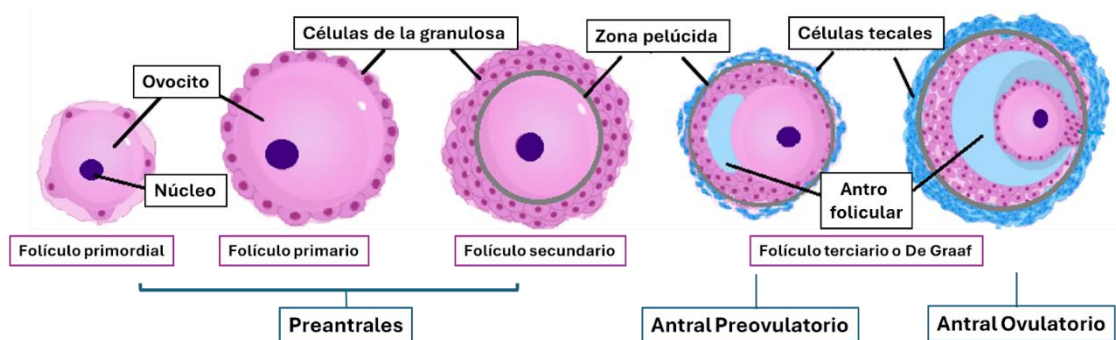


Figura i.4. Esquema de los distintos estadios del ovocito en la corteza ovárica durante la foliculogénesis. Creado con BioRender.

En el ovario, el desarrollo de ovocitos maduros dentro de los folículos ováricos hasta la etapa ovulatoria es un evento que tiene tres características, altamente conservadas en las distintas especies de mamíferos (Driancourt M., 2001) a saber:

1. Secuencia de eventos (reclutamiento, selección y dominancia).
2. Necesidad secuencial de gonadotropinas (hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH)).

3. Variabilidad en parámetros numéricos (cantidad de ondas por ciclo, número de folículos por onda) así como requisitos temporales (tiempo de selección, duración de cada ciclo).

Durante el ciclo estral bovino, se producen 2 o 3 ondas foliculares (Ginther et al., 1996; Webb & Armstrong, 1998). Una onda de crecimiento folicular está caracterizada por presentar cuatro fases: reclutamiento, selección, dominancia (Lucy et al., 1992) y ovulación o atresia folicular. Esta última solo se presenta en aquellos folículos no ovulatorios (Sunderland et al., 1994). Cada onda de desarrollo folicular se define por la aparición simultánea de un grupo de folículos de tamaño mediano (>4-8 mm de diámetro) de un conjunto de folículos más pequeños (2 a 4 mm), y se da inicio a la fase de reclutamiento. Inmediatamente después de este período, comienza el período de selección, en el cual un folículo emerge del pool de folículos reclutados y continúa creciendo (Pierson & Ginther, 1987a). Posteriormente, este folículo se transforma en dominante (período de dominancia) e inhibe de forma directa el crecimiento de los demás, que se vuelven subordinados y sufren atresia (**Figura i.5**) (Pierson & Ginther, 1987a; Savio et al., 1988; Lucy et al., 1992; Campbell et al., 1991; O'Shea et al., 1994; Law et al., 1992; Wood et al., 1993; Matton et al., 1981; Wolfsdorf et al., 1997). Existe un balance entre los factores estimuladores e inhibidores de origen sistémico y local, que influyen sobre el número de folículos primordiales que se activan en cada ciclo y que son independientes de la acción directa de la FSH (Méduri et al., 2002; Moniruzzaman & Miyano, 2010; Reddy et al., 2010; Kim J., 2012; Monget et al., 2012). Dentro de los factores autocrinos y paracrinos que regulan el desarrollo folicular se encuentran los factores de crecimiento esenciales secretados por el ovocito como el factor de crecimiento y de diferenciación (GDF9) y proteínas morfogenéticas óseas (BMP)15 (Rajkovic et al., 2006; Andrade et al., 2019). A medida que la foliculogénesis progresa, el folículo se vuelve sensible a las gonadotrofinas (Erickson G., 2000; Forde et al., 2011). Si

bien la dinámica de desarrollo de los folículos antrales mayores a 1 mm de diámetro está bien caracterizada (Adams & Singh, 2015), poco se conoce sobre la dinámica de los folículos más pequeños y los preantrales. Por tal motivo, los folículos antrales (2-8 mm de diámetro) son los ideales para ser aspirados en un ovario en la PIV, debido a que tienen la capacidad de madurar en las condiciones adecuadas.

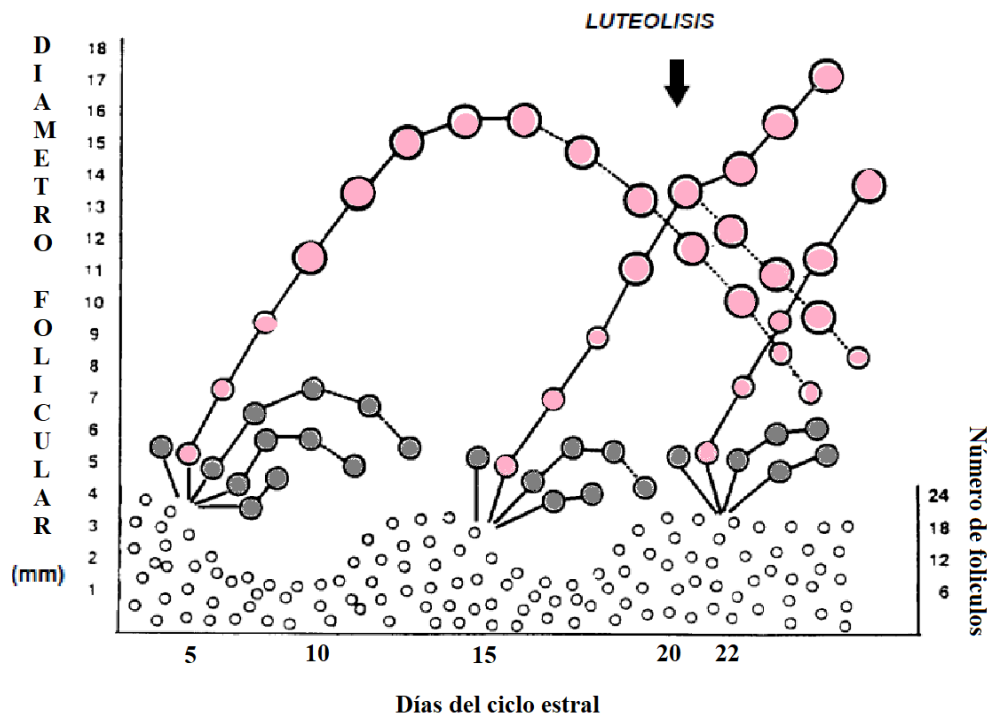


Figura i.5. Ovas foliculares correspondientes a los días del ciclo estral bovino. (Modificado de Lucy et al., 1992).

Para la maduración de los ovocitos de mamíferos, el punto final necesario, ya sea en condiciones *in vivo* o *in vitro*, es un ovocito que pase de estadio de profase I a un estadio celular de metafase II (MII), que sea capaz de ser fecundado y que pueda soportar el desarrollo embrionario normal. La complejidad de ciertos factores (nucleares, citoplasmáticos o derivados de nuestros sistemas de cultivo actuales) influye sin dudas tanto en la capacidad de los ovocitos para madurar completamente como en su potencial de desarrollo después de la fecundación (Fulka et al., 1998). Los sistemas de MIV deben garantizar que el ovocito complete normalmente la primera división de reducción, sea capaz de experimentar una fecundación normal

y produzca un cigoto capaz de desarrollarse a término luego de una transferencia de embriones. La MIV implica eventos de maduración nuclear y citoplasmática. La maduración nuclear implica principalmente la segregación cromosómica. Los ovocitos bovinos reanudan y completan la primera división meiótica en una variedad de medios entre los cuales actualmente se utiliza de forma rutinaria el medio complejo TCM 199 suplementado con SFB y piruvato para dar alta frecuencia a la maduración nuclear y la expansión de las células del cúmulus. La expansión del cúmulus puede facilitar el paso de los espermatozoides a través de los ovocitos mejorando el éxito en la fecundación (Leibfried-Rutledge et al., 1986; 1989). Si bien los ovocitos ovulados *in vivo* están detenidos en MII, en condiciones *in vitro*, el ovocito recuperado y puesto a madurar se encuentra en el estadio de vesícula germinal (VG). La VG es el nombre que recibe el núcleo del ovocito inmaduro en la etapa de diploteno de la profase I de la meiosis (De La Fuente, R. 2006). Su presencia indica que el ovocito aún no ha reanudado la meiosis ni iniciado la maduración nuclear. En el desarrollo meiótico, la maduración nuclear se manifiesta por la ruptura de las VG, la condensación de cromosomas, la realización de la MI y otra detención del desarrollo en MII hasta el momento de la fecundación.

Por otro lado, la maduración citoplasmática implica la reorganización de las organelas y el almacenamiento de ARNm, proteínas y factores de transcripción que actúan en el proceso general de maduración, fecundación y embriogénesis temprana. Los transcritos y proteínas almacenadas en el citoplasma del ovocito son de fundamental importancia para el proceso de maduración y para asegurar la progresión del desarrollo embrionario temprano hasta la etapa de ocho células (en bovinos), cuando se activa el genoma embrionario y se hace necesaria la síntesis de nuevas proteínas. La expresión de ciertos genes durante la AGE determinará el éxito de la embriogénesis en la etapa de preimplantación (Meirelles et al., 2004; Ferreira et al., 2009). La maduración nuclear y citoplasmática son eventos distintos

pero interrelacionados, que ocurren simultáneamente en momentos específicos. Sin embargo, la programación molecular del citoplasma puede haberse iniciado ya durante la fase de crecimiento del ovocito. El proceso de maduración citoplasmática puede dividirse en tres eventos principales:

1) Redistribución de las organelas citoplasmáticas: El tráfico de organelas citoplasmáticas durante la maduración se produce a través de las acciones de los microfilamentos y microtúbulos del citoesqueleto, y el reposicionamiento de las organelas depende de las necesidades de la célula durante cada etapa del desarrollo celular. Las mitocondrias se mueven desde una posición periférica a una distribución dispersa en todo el citoplasma después de 12-18 h de cultivo. Este evento es similar a lo que ocurre *in vivo*, que implica una distribución hacia la periferia antes de la ovulación, una formación cortical agrupada en las etapas finales de la maduración nuclear y una distribución más dispersa después de la extrusión del primer cuerpo polar (Tarazona et al., 2006).

2) Dinámica de los filamentos del citoesqueleto: Los filamentos del citoesqueleto son estructuras dinámicas que participan en la división celular, tráfico intracelular y segregación cromosómica. Están compuestos por tres tipos de filamentos: microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios. Los microtúbulos, formados por tubulina, son clave en el movimiento de organelas y se asocian a proteínas motoras como la dineína y la kinesina. Durante la maduración del ovocito, los microtúbulos y microfilamentos reorganizan la distribución de organelas y preparan al ovocito para la fecundación, realizando movimientos cromosómicos, organizando y posicionando el huso meiótico y la migración nuclear (Albertini D., 1992; Li et al., 2005).

3) Maduración molecular: caracterizada por la transcripción, almacenamiento y procesamiento del ARNm materno. Las proteínas derivadas de estos ARNm están involucradas tanto en la maduración como en eventos celulares posteriores como la

fecundación, la formación del pronúcleo y la embriogénesis temprana. Por lo tanto, estas proteínas se almacenan en el citoplasma hasta el momento apropiado para su utilización (Cheng et al., 2022).

En la maduración de los ovocitos, los lípidos, en forma de vesículas lipídicas, actúan como moléculas de señalización con funciones importantes. En la etapa tardía de la maduración de los ovocitos y durante el desarrollo previo a la implantación, los lípidos endógenos de los ovocitos funcionan como fuente de energía y como reservorio para la síntesis de nuevos lípidos. Las vesículas lipídicas se agregan en forma de grupos vesiculares dando la apariencia de citoplasma oscuro. La oscuridad citoplasmática puede ser homogénea, afectando a todo el citoplasma, o estar concentrada en el centro con un anillo periférico claro que le da al citoplasma una apariencia oscurecida. El color del citoplasma se puede utilizar como marcador del contenido de lípidos y como predictor del potencial embrionario, ya que los ovocitos con un citoplasma uniforme y oscuro contienen más lípidos intracelulares que los ovocitos con un citoplasma granular o pálido. La mayoría de los estudios demostraron que los ovocitos con granulaciones rugosas o citoplasma muy pálido producen un menor desarrollo previo a la implantación (Bilodeau-Goeseels & Panich, 2002; Aguila et al., 2020).

FIV

Una vez completada la MIV, los ovocitos están listos para ser fecundados. Tras la eyaculación, los espermatozoides son móviles, pero no son capaces de fecundar un ovocito. Los cambios que debe atravesar un espermatozoide antes de ser capaz de fecundar se denominan colectivamente capacitación. La capacitación generalmente ocurre en el istmo del oviducto, aunque en algunas especies puede comenzar en el cuello uterino, donde el moco cervical facilita la eliminación de las proteínas de la superficie del espermatozoide. *In vitro*, el desafío es recrear condiciones que proporcionen a los espermatozoides un entorno que favorezca la capacitación. La temperatura es

un factor crítico para una capacitación exitosa. En bovinos, tanto la FIV como el cultivo se realiza típicamente a 38,5 °C. Se han desarrollado medios para apoyar la capacitación *in vitro*. Otro factor importante es el pH. El medio en el que se co-incuban los espermatozoides y los ovocitos generalmente tiene un pH ligeramente más alto (7,5 frente a 7,3 en los medios de maduración y cultivo, respectivamente). Un medio básico que se puede utilizar es la solución de Tyrode o de Krebs-Ringer complementada con una fuente de energía (glucosa, lactato y piruvato) y albúmina (Yanagamachi R., 1994). Además, para tratar de simular los factores capacitantes que actúan *in vivo*, en condiciones *in vitro* el principal agente de capacitación agregado a los medios de fecundación es la heparina, que se cree que ayuda a eliminar los componentes del plasma seminal de la superficie del esperma al unirse a las proteínas y estimular el flujo de colesterol y fosfolípidos. Otros agentes de capacitación incluyen la cafeína, un inhibidor de las fosfodiesterasas; bicarbonato, que induce cambios dependientes de pKa en la arquitectura lipídica; adenosina, que interactúa con los receptores de membrana y aumenta el monofosfato de adenosina cíclico intracelular (cAMP) y las especies reactivas de oxígeno (EROs), como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico, que activan dianas de membrana para desencadenar mecanismos intracelulares, incluida la fosforilación de la proteína tirosina (Yanagamachi R., 1994; Breininger et al., 2010). La mayoría de los espermatozoides utilizados en la FIV bovina provienen de semen congelado. El proceso de congelación induce cambios en los espermatozoides bovinos que se asemejan a los espermatozoides capacitados. Tienen calcio intracelular elevado, una pérdida neta de proteínas de membrana plasmática y un aumento de EROs (Pons-Rejraji et al., 2009). Estos espermatozoides también requieren una exposición más corta y dosis más bajas de agentes de capacitación que los espermatozoides frescos. En un laboratorio de PIV bien administrado, las tasas de FIV con espermatozoides congelados pueden promediar el 80 % o más. El método más común para preparar espermatozoides para la fecundación es centrifugándolos a

través de un gradiente de densidad. Este gradiente discontinuo se prepara con una solución de piruvato de lactato de albúmina de Tyrode (TALP) para espermatozoides, mezclada con *Percoll* comercial en diferentes proporciones. El gradiente más común es una mezcla de *Percoll* al 45 % en capas sobre una mezcla de *Percoll* al 90 %. El semen o el contenido de una pajuela de semen descongelada a 37 °C se coloca en capas sobre el gradiente y se centrifuga a 800 g durante un tiempo que depende del volumen de la columna por la que debe migrar el esperma. Esto aísla el esperma intacto en el fondo del tubo de centrifuga (Hasler & Barfield, 2021). Un método alternativo para aislar el esperma intacto es el “swim up”, que implica colocar una capa de medio sobre el contenido de una pajuela descongelada y permitir que los espermatozoides naden hacia arriba en este medio, donde son aspirados después de un período de tiempo (Hasler & Barfield, 2021).

CIV

El CIV de embriones bovinos es el último paso del proceso de PIV y comprende aproximadamente entre seis y nueve días de cultivo, desde la etapa de cigoto de 1 célula luego de la FIV, hasta la etapa de blastocisto. Uno de los medios más comunes para el cultivo de embriones bovinos es el medio oviductal sintético (SOF) original de Tervit (Tervit et al., 1972), suplementado con aa y, en algunos casos, niveles bajos de SFB (Liu & Foote, 1996; Holm et al., 1999). El cultivo basado en SOF puede implicar una única formulación de medio durante el CIV, o un sistema secuencial de dos o tres pasos, donde la formulación del medio cambia en ciertos puntos del período de cultivo. Los sistemas secuenciales se basan en un intento de imitar los cambios fisiológicos que experimentan los cigotos *in vivo* a medida que descienden por los oviductos y entran al útero durante los primeros seis o siete días de desarrollo. El volumen de medio utilizado en los sistemas de CIV también varía. Algunos laboratorios cultivan embriones en microgotas tan pequeñas como 25 µl bajo una capa de aceite mineral, mientras que otros lo hacen en volúmenes de 500

µl en una placa con o sin una capa de aceite mineral. Algunos sistemas de CIV se llevan a cabo en una atmósfera de incubadora con 5 % de CO₂ en aire; sin embargo, hay evidencia de que los embriones bovinos se desarrollan mejor en una atmósfera de 5 % de CO₂, 7 % de O₂ y 88 % de N₂ (Thompson et al., 1990; Fukui et al., 1991). En el pasado, la mayoría de los sistemas de CIV comerciales implicaban el uso de sistemas de co-cultivo que incluían una monocapa de células somáticas, las cuales incluían células primarias de oviductos (bovinos o porcinos), ampollas oviductales de ratón, cúmulus, granulosa y útero, así como líneas celulares establecidas de hígado de rata búfalo (BRL) o células epiteliales de riñón de mono (Vero). Estas células se han combinado en sistemas de co-cultivo con varios medios diferentes, incluidos TCM-199, Menezo's B2 y Ham's F-10. Los sistemas de co-cultivo no se utilizan ampliamente en la actualidad, ya que la mayoría de los laboratorios se han dedicado en gran medida a investigar sistemas de PIV basados en formulaciones de medios definidos. Además, como fue mencionado previamente, el uso de sistemas definidos es esencial para comprender y optimizar los requisitos de cultivo de embriones preimplantacionales. Se han reportado tasas moderadamente exitosas de producción de blastocistos con el uso de medios libres de proteínas y definidos químicamente (Hoshi H., 2003; Lim et al., 2007; Gardner D., 2021). A nivel comercial, las empresas de transferencia de embriones y PIV se preocupan principalmente por producir de manera eficiente y predecible tantos embriones viables como sea posible. Sin embargo, la adición de altas concentraciones de SFB (10 % o más) se ha asociado con la acumulación de lípidos en el embrión, lo que disminuye la criotolerancia, y con la producción de terneros grandes, y por razones prácticas y de bienestar animal se están investigando alternativas al SFB (Thompson et al., 1998; Abdel-Wahab et al., 2018; Van der Valk et al., 2018).

i.2. Metabolismo del embrión y requerimientos energéticos en el CIV

Si bien la calidad de los ovocitos y espermatozoides influye en la competencia embrionaria, la nutrición del embrión es fundamental para su viabilidad. Esta nutrición depende de los sustratos energéticos presentes en el medio de cultivo (de Souza et al., 2015). Se ha observado una relación entre el metabolismo de los embriones preimplantacionales y su capacidad de desarrollo (Barnett & Bavister, 1996). Una de las posibles causas de las diversas diferencias observadas entre los embriones generados *in vitro* e *in vivo* podría ser la existencia de condiciones de cultivo *in vitro* subóptimas. Los medios de cultivo contienen como ingredientes importantes los sustratos energéticos, cuyos requerimientos van cambiando durante el desarrollo temprano en los embriones de mamíferos, con diferencias importantes entre especies (Gardner D., 1998; Leese H., 1992; Barnett & Bavister, 1996; Bavister B., 1995). Los sustratos energéticos como glucosa, piruvato, lípidos y aa son responsables de la síntesis de ATP en las células madre embrionarias. En las células de mamíferos, la generación de ATP ocurre por vías oxidativas o por glucólisis. La glucólisis ocurre en el citoplasma, no requiere O_2 para reacciones metabólicas enzimáticas y genera lactato y solo 4 moléculas de ATP por molécula de glucosa oxidada. La vía oxidativa ocurre en las mitocondrias, requiere necesariamente O_2 y es capaz de oxidar completamente el piruvato, generando CO_2 , H_2O y 30-32 moléculas de ATP a través del ciclo de Krebs y enzimas de fosforilación oxidativa. Estas vías son interdependientes y necesarias para el desarrollo embrionario viable, y la vía oxidativa es la más importante para la producción de ATP (Wilding et al., 2009; Sturmey & Leese, 2003), siendo la responsable de la producción de lactato (Khurana & Niemann, 2000).

La actividad metabólica del ovocito luego de ser fecundado y hasta la etapa de 8 células es más o menos constante, y es el piruvato el sustrato energético de preferencia. Además, el piruvato es un sustrato energético importante para la

generación de ATP en células con una baja tasa glucolítica y para la regulación del pH intracelular (Thompson et al., 1996). El ovocito inmaduro no utiliza glucosa, pero su consumo aumenta gradualmente desde el ovocito maduro hasta la etapa de blastocisto eclosionado. El primer aumento marcado de consumo de glucosa ocurre entre las etapas de 8 y 16 células, que es el momento de la activación del genoma embrionario, lo que indica un incremento en los requerimientos de energía (Telford et al., 1990; Khurana & Niemann, 2000). Los aa se consumen en gran medida entre las etapas de 8 células y mórula compacta, debido a la síntesis de proteínas, ATP y moléculas de señalización, y la osmorregulación y regulación del pH (Barnett & Bavister, 1996).

En la etapa de compactación de la mórula, formación del blastocisto y el proceso de cavitación, aumentan significativamente las demandas de energía, el consumo de glucosa, piruvato y O_2 , la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa, y la síntesis de proteínas (Khurana & Niemann, 2000; Watson & Barcroft, 2001). Durante este proceso, el 86 % de la producción de ATP resulta de la vía de fosforilación oxidativa (Donnay & Leese, 1999). La producción de ATP en el embrión bovino es de alrededor de $459 \text{ pmol} \cdot \text{blastocisto}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, y el 36% y el 15 % del ATP del blastocisto se utiliza para la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa en los días 7 y 8 del desarrollo del blastocisto, respectivamente. El blastocisto en expansión alcanza $94,5 \text{ pmol} \cdot \text{embrión}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de actividad de bombeo (Houghton et al., 2003).

Las mitocondrias embrionarias se originan a partir del ovocito y se describen como "inmaduras" en las fases iniciales del desarrollo del embrión, mostrando una forma redonda u ovoide, con pocas crestas internas (Bavister & Squirrell, 2000). Entre las etapas embrionarias de 4 y 16 células, las mitocondrias se alargan y el número de crestas comienza a aumentar y continúa aumentando durante el desarrollo del blastocisto, concomitantemente con una mayor captación de glucosa y piruvato (Wilding et al., 2009; Thompsons et al., 1996).

Como ya se mencionó, el blastocisto está formado por el TE y el MCI. Los dos tipos de poblaciones celulares tienen perfiles metabólicos diferentes. Las células del TE consumen mayores niveles de piruvato y producen lactato, mientras que las células de la MCI consumen más glucosa, y ambos tipos celulares tienen diferentes perfiles de recambio de aa (Gopichandran & Leese, 2003). En blastocistos de ratón se ha demostrado que las células aisladas del TE consumen más O₂, producen más ATP y tienen una mayor cantidad de mitocondrias que las células del MCI, lo que indica un metabolismo oxidativo preferencial (Houghton F., 2006).

El desarrollo del embrión bovino también se ve afectado por la presencia de aa y proteínas. La alanina es un aa importante para el desarrollo del embrión y tiene los niveles más altos de liberación en el medio de cultivo de todos los aa. Además, su liberación está relacionada con la excreción celular de amonio (Watson & Barcroft, 2001; Gopichandran & Leese, 2003; Orsi & Leese, 2004). La ausencia de piruvato en el medio reduce el recambio de aa y la producción de alanina por parte del embrión, lo que indica la probabilidad de que el amonio pueda transferirse al piruvato y excretarse en el compartimento extracelular como alanina. El glutamato también puede estar involucrado en la desintoxicación del amonio al combinarse con una molécula de amonio y convertirse en glutamina, que puede ser excretada por el embrión en el medio extracelular (Orsi & Leese, 2004). La adición de aa esenciales y no esenciales, y la combinación de ambos en el medio de CIV, mejora tanto la formación de blastocistos como su eclosión, y un aumento en el número de blastómeras (Lee et al., 2004).

La tasa de preñez alcanza sólo alrededor del 39 %, ya que la concentración ideal indicada de cada componente y la combinación de múltiples sustratos del medio no parecen adecuados para sustentar el desarrollo del embrión (Seneda et al., 2012). No hay consenso sobre la composición ideal del medio. Sin embargo, sabemos que los embriones que tienen un metabolismo “tranquilo”, es decir, una baja tasa

metabólica, glucolítica, un recambio de aa bajo, y una alta capacidad antioxidante, tienen más probabilidades de alcanzar la etapa de blastocisto, ya que es lo que sucede con el metabolismo de los embriones *in vivo* (Leese H., 2002; 2012; Sturmey et al., 2010). Por lo tanto, se requiere un sistema de cultivo que permita que los embriones *in vitro* tengan un metabolismo similar a los *in vivo* (es decir, naturalmente “tranquilos”). Además, cuando los embriones *in vivo* se exponen a medios extrauterinos, la glucólisis y la producción de CO₂ aumentan, lo que demuestra que las condiciones de cultivo inducen tasas metabólicas más altas. Esto se ha descrito en embriones bovinos, donde los blastocistos *in vitro* tienen tasas glucolíticas más altas que *in vivo*, lo que indica que los medios de cultivo pueden ser estresantes o pueden modificar el metabolismo del embrión para producir un perfil anormal (Leese H., 2012; Thompson et al., 1996; Leese et al., 2008).

i.3. EROs y Antioxidantes en la PIV

Es probable que los principales problemas que surgen durante la PIV se deban, al menos en parte, a que no somos capaces de imitar con precisión los procesos de maduración de los ovocitos, la fecundación y el desarrollo embrionario, los cuales ocurren dentro del folículo, el oviducto y el útero, respectivamente. Se han realizado numerosas investigaciones sobre las formulaciones óptimas de medios para el cultivo de embriones, pero siguen existiendo deficiencias en el sistema (Thompson et al., 1990; Krisher et al., 1999; Steeves & Gardner, 1999; Oyamada & Fukui, 2004; dos Santos et al., 2021). Los sustratos energéticos utilizados por el embrión temprano, como ATP, NADPH y moléculas de O₂, son producidos por la cadena transportadora de electrones que está en la mitocondria. Este sistema de producción de energía también genera EROs, que son subproductos normales del metabolismo del O₂ producidos por la cadena de transporte de electrones. El término “especie reactiva” se refiere a moléculas de O₂ y N₂ que contienen uno o más electrones

desapareados. El término “radical libre” se refiere a moléculas que son altamente reactivas debido a que los electrones no unidos intentan recuperar la estabilidad electrónica oxidándose con otras moléculas (Phaniendra et al., 2015). Casi todas las biomoléculas pueden reaccionar con radicales libres. Sin embargo, los ácidos nucleicos, los lípidos y las proteínas son las macromoléculas más comúnmente oxidadas por radicales libres (Nandi et al., 2019). La producción de ERO está sensiblemente controlada por un balance del estado de óxido-reducción, es decir, se controla normalmente dentro de las células. Pero cuando ocurre un desequilibrio, aumenta la producción de ERO, lo que ocasiona estrés oxidativo. El estrés oxidativo puede definirse ampliamente como un desequilibrio entre la producción de oxidante y la capacidad antioxidante de la célula para prevenir el daño oxidativo. Aunque varias reacciones en los sistemas biológicos contribuyen a las concentraciones en estado estacionario de anión superóxido y peróxido de hidrógeno, las mitocondrias parecen ser cuantitativamente la fuente celular más importante (Cadenas & Davies, 2000). El estrés oxidativo en embriones trae como consecuencia efectos variados como lesiones en el ADN, donde ocurren alteraciones en la estructura base (Sturmey et al., 2008), peroxidación lipídica, lo que compromete la fluidez de la membrana, daña su integridad y limita la capacidad funcional de las proteínas unidas a la membrana (por ejemplo receptores, canales iónicos) para funcionar correctamente (Juan et al., 2021), inactivación enzimática, detenimiento en el desarrollo embrionario temprano y apoptosis. La producción excesiva de las EROs compromete los poros de transición de permeabilidad mitocondrial, lo que altera el estado de conductancia de las mitocondrias. La conductancia baja es reversible, pero la conductancia alta produce una acumulación de calcio que causa un potencial transmembrana irreversible, que provoca apoptosis debido a la liberación de citocromo-c que activa la vía de las caspasas (Wang et al., 2009). La fosforilación oxidativa es la fuente principal de energía utilizada en el desarrollo del embrión entre los estadios de una célula y mórula. Los embriones metabólicamente más activos al

principio del desarrollo generan más EROs (Gardner et al., 2000; Leese H., 2012). Otra característica intrigante de los sistemas de PIV es que la mayoría de los embriones que se desarrollan *in vitro* tienen una mayor actividad glucolítica que los embriones que se desarrollan en el útero. Esto se debe a una mayor exposición al O₂ atmosférico que aumenta el consumo de piruvato y, posteriormente, aumenta la producción de las EROs (Gardner & Lane, 1998; de Lima et al., 2020). Otra consideración importante para tener en cuenta es que la producción de EROs dentro de los embriones puede alterar el gradiente de pH dentro de las mitocondrias producto de cambios en el transporte de electrones y, en última instancia, el establecimiento del gradiente de protones (H⁺) se alterará cuando la producción de EROs se eleve (Selivanov et al., 2008).

La criopreservación es otra fuente de acumulación de EROs dentro de los embriones. Este procedimiento claramente tiene beneficios sustanciales, incluyendo la preservación del material genético, la facilidad de transporte alrededor del mundo y como una conveniencia para completar la transferencia embrionaria. Sin embargo, los embriones bovinos criopreservados tienen menos éxito en generar una preñez que los embriones no criopreservados producidos por PIV (Hansen P., 2020).

Además de la propia actividad metabólica del embrión, hay varios factores extrínsecos que contribuyen a la producción y acumulación de EROs durante la PIV. Estos factores están relacionados tanto con las condiciones del cultivo, como el ambiente gaseoso, la luz, la temperatura, el pH, la humedad, los componentes del medio de cultivo y, los espermatozoides que rodean al ovocito durante la FIV los cuales liberan su carga enzimática al medio, entre otros (Álvarez et al., 1996; Quinn et al., 1998; Goto et al., 1993; Noda et al., 1991). Por lo tanto, proteger los embriones contra el estrés oxidativo *in vitro* sigue siendo uno de los caminos para mejorar el desarrollo y la calidad de los embriones preimplantacionales.

Los efectos nocivos de las EROs pueden contrarrestarse mediante el sistema de defensa antioxidante propio del embrión en desarrollo, que consiste en eliminadores enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa, y compuestos antioxidantes no enzimáticos de bajo peso molecular como el glutatión (GSH) y la tiorredoxina (Thannickal & Fanburg, 2000; Nordberg & Arner, 2001).

El término antioxidante se define como cualquier sustancia que cuando está presente en concentraciones bajas en comparación con las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de ese sustrato (Halliwell & Gutteridge, 1989). El término "sustrato oxidable" incluye todo tipo de molécula que ceda un radical libre (ya sea electrones o átomos de hidrógeno). El sustrato oxidable generalmente consiste en lípidos individuales o mixtos, proteínas y ácidos nucleicos (Laguerre et al., 2007). En los últimos años, la suplementación con antioxidantes durante las diferentes etapas de la PIV ha cobrado gran importancia en distintas especies como una estrategia para mejorar la eficiencia del proceso y proteger a los embriones preimplantacionales contra el estrés oxidativo, así como también para aumentar su calidad. Por ejemplo, la utilización de L-carnitina en el CIV mejoró la tasa de blastocistos de ratón y redujo el nivel de daño en el ADN (Abdelrazik et al., 2009). En la etapa de FIV, la utilización de N-acetil-L-cisteína aumentó el número total de células de blastocistos de ratón y una mayor tasa de clivaje (Truong & Gardner, 2017). La utilización de resveratrol y melatonina en la MIV de porcinos incrementó el número total de células y mejoró el desarrollo embrionario (Lee et al., 2018) y, en bovinos, la melatonina administrada en la etapa de MIV y CIV disminuyó la apoptosis y mejoró la calidad de los blastocistos (Marques et al., 2018). En conejos, se registró una mejora del desarrollo embrionario utilizando retinol (vitamina A) en el CIV (Elomda et al., 2018).

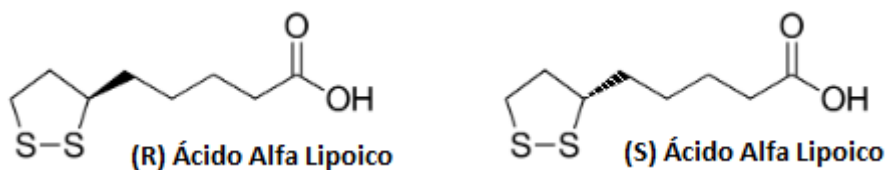
En condiciones *in vitro*, se pueden emplear diversos métodos para medir la actividad antioxidante de distintas sustancias. Para evaluar el potencial antioxidante de un

compuesto se deben tener en cuenta varios criterios. Algunos son de aspecto químico y bioquímico, como la especificidad para extinguir radicales libres, quelar metales, interactuar con otros antioxidantes, y tener efectos sobre la expresión génica. Además, hay criterios terapéuticos y de aplicación preventiva, como son la absorción y biodisponibilidad, la concentración en tejidos, células y líquido extracelular, y su ubicación en la célula, es decir, si son de dominios de membrana o dominios citosólicos, además de una baja toxicidad. Un antioxidante “ideal” cumpliría con todos esos criterios, pero eso no implica que todos los antioxidantes deban cumplir cada uno de ellos para ser considerados buenos antioxidantes.

i.4. Ácido Alfa Lipoico

El ácido Alfa Lipoico (AAL), también llamado ácido tióctico o ácido 1,2-ditiolan-3-pentanoico, es un compuesto ditiol natural, sintetizado enzimáticamente en la mitocondria a partir del ácido octanoico, el cual es la fuente de ácidos grasos, y cisteína, que aporta la fuente de azufre (Dupre et al., 1980). Se encuentra tanto en células animales como vegetales y desempeña un papel fundamental en el metabolismo energético mitocondrial (Gorąca et al., 2011). El AAL se encuentra de forma natural en las mitocondrias, más específicamente en la subunidad E2, en donde actúa como un cofactor necesario y esencial que cataliza la descarboxilación oxidativa de las α -cetoácidos deshidrogenasas mitocondriales, las cuales incluyen a la enzima piruvato deshidrogenasa, la β -cetoglutarato deshidrogenasa y las α -cetoácidos deshidrogenasas de cadena ramificada (Packer et al., 1995; Reed L., 2001; Shay et al., 2009). El AAL tiene un centro quiral, por lo tanto, existe en formas enantioméricas R y S. Sin embargo, sólo R-AAL se sintetiza de forma endógena y está conjugado con residuos de lisina conservados en un enlace amida, lo que hace que esta isoforma sea esencial como cofactor en sistemas biológicos (Reed L., 1974; Gorąca et al., 2011).

Formas enantioméricas del AAL:



La alta densidad electrónica resultante de la posición espacial de los dos átomos de azufre en el anillo de 1,2-ditioano confiere al AAL una alta tendencia a la reducción de otras moléculas sensibles a la reacción de óxido-reducción (redox) según las condiciones ambientales (Biewenga & Bast, 1995; Gorąca et al., 2011). Ya desde 1959, Rosenberg & Culik (1959) estudiaron cómo el AAL suministrado a cobayos en su dieta, los protegía contra los síntomas de la deficiencia de vitamina E o vitamina C. A partir de estos estudios, comenzaron a emplearse diferentes modelos para estudiar el efecto de AAL, describiendo cómo su potencial antioxidante protegía los diferentes sistemas de la peroxidación lipídica. A partir de 1990, distintos autores describen que el AAL es captado por las células y reducido rápidamente a ácido dihidrolipoico (ADHL) (**Figura i.6**) (Suzuki et al., 1991; Handelman et al., 1994; Podda et al., 1994). La pareja redox AAL/ADHL se acerca al concepto de antioxidante ideal, y se la ha llamado "un antioxidante universal" (Paker et al., 1995). Además, tiene un potencial de reducción estándar de $-0,32$ V, convirtiéndolo en uno de los antioxidantes naturales más potentes (Shay et al., 2009). Tanto AAL como ADHL son moléculas anfipáticas, y pueden actuar como antioxidantes tanto en ambientes hidrófilos como lipófilos (Moini et al., 2002).

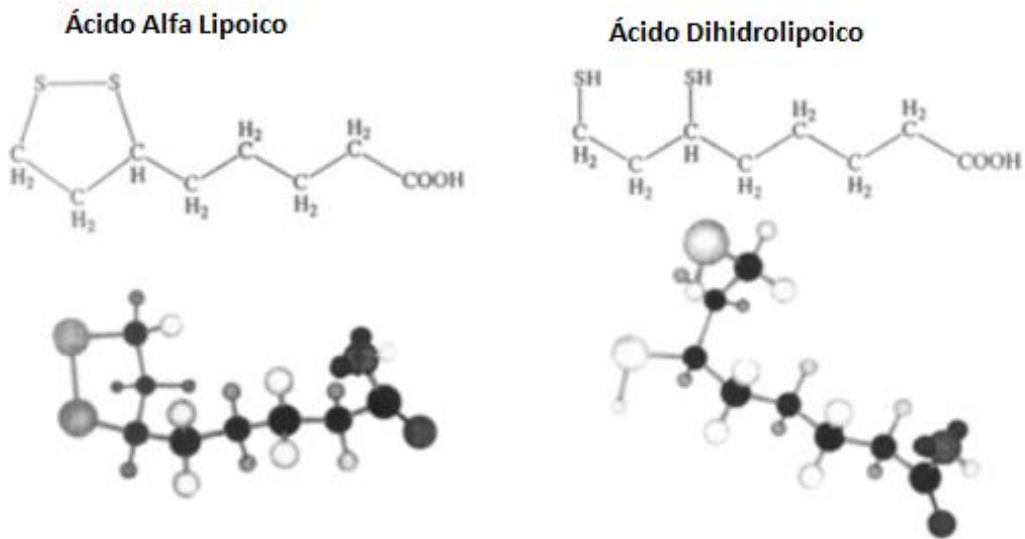


Figura i.6. Fórmula química del Ácido Alfa Lipoico y su forma reducida, el Ácido Dihidrolipoico.

La acción antioxidante tanto del AAL como del ADHL no solo es directa mediante la extinción de radicales y la quelación de metales, sino que además es indirecta mediante el reciclaje de otros antioxidantes (Packer et al., 1995).

<u>Oxidantes eliminados</u>	<u>AAL</u>	<u>ADHL</u>
Radical Superóxido O_2^-	NO	SI
Peróxido de hidrogeno H_2O_2	NO	NO
Radical Hidroxilo HO^-	SI	SI
Radical hipocloroso	SI	SI
Radical peroxilo RO^-	NO	SI
Oxígeno singlete O_2	SI	NO

El AAL es quelante de hierro, cobre y otros metales de transición. Se descubrió además que forma complejos estables con Mn^{2+} , Cu^{e+} , Zn^{2+} (Packer et al., 1995). Por su parte, el ADHL elimina los radicales HO^{\cdot} , sin embargo, se pueden observar efectos prooxidantes en algunos sistemas para producir los mismos radicales. Quizás la pregunta más crucial que rodea al ADHL es si actúa como prooxidante en determinadas circunstancias. En primer lugar, el ADHL puede actuar como reductor de metales de transición, especialmente el hierro y, en segundo lugar, el ADHL puede actuar para regenerar otros antioxidantes como el ascorbato, que se sabe que reduce el hierro (Packer et al., 1995). Si realmente es capaz de reducir el hierro y si el hierro está disponible para reaccionar, entonces sus efectos prooxidantes pueden ser motivo de grave preocupación en los sistemas biológicos. A pesar de eso, la interacción de ADHL con otros antioxidantes puede anular un efecto prooxidante en un sistema fisiológico. El ADHL parece ser capaz de regenerar otros antioxidantes endógenos, como el ascorbato, e indirectamente, la vitamina E y la vitamina C, a partir de sus formas radicales (Kagan et al., 1992; Shay et al., 2009). Los estudios mecanísticos realizados en células humanas *in vitro* demostraron que, después de la reducción intracelular de AAL, el ADHL se liberó rápidamente al espacio extracelular y redujo la cistina a cisteína, tras lo cual la cisteína fue absorbida por los transportadores de aminoácidos neutros y utilizada en la síntesis de GSH. Se propuso que la mejora de la disponibilidad intracelular de cisteína es el mecanismo subyacente de la elevación inducida por AAL de los niveles de GSH observada tanto *in vitro* como *in vivo* (Han et al., 1997). Además, existe evidencia en ratones de que la administración de AAL *in vivo* puede aumentar el nivel de ubiquinol frente al estrés oxidativo, y se sabe que el ubiquinol recicla la vitamina E (Gotz et al., 1994; Kagan et al., 1990).

Ya es conocido que el AAL administrado en una variedad de sistemas celulares y tisulares aparece en el medio como ADHL (Peinado et al., 1989). Los resultados indican que las células normales de mamíferos son capaces de absorber AAL, reducirlo a ADHL y liberar ADHL. Por lo tanto, los efectos tanto del AAL como del ADHL pueden estar presentes tanto intracelularmente como extracelularmente (Packer et al., 1995).

Varios reportes científicos han demostrado los efectos benéficos de la administración *in vitro* de AAL en distintos modelos animales en las diferentes etapas de la PIV, así como su administración *in vivo*. Se ha demostrado que AAL tiene propiedades antioxidantes en el desarrollo *in vitro* de folículos de ratón debido a una disminución de los niveles de EROs y un aumento de los niveles de capacidad antioxidante total (Talebi et al., 2012). La N-acetil-cisteína y el AAL mejoran las defensas antioxidantes y disminuyen el estrés oxidativo, la inflamación y los niveles de lípidos séricos en ratas ovariectomizadas (Delgobo et al., 2019), y más aún se sabe que, en embriones de ratón, la producción endógena de AAL es crucial para el desarrollo embrionario temprano, tanto por su acción antioxidante como por ser un cofactor enzimático (Yi & Maeda, 2005). Además, la suplementación de AAL en el medio de FIV y de CIV mejoró el desarrollo embrionario posterior, disminuyendo el estrés oxidativo y mejorando la viabilidad de embriones humanos y de ratón (Truong et al., 2016; Truong & Gardner, 2017). En bovinos, la suplementación con AAL en el medio de MIV condujo a un mayor crecimiento y desarrollo de folículos preantrales *in vitro* (Zoheir et al., 2017) y mejoró la tasa de maduración y calidad embrionaria (Hassan et al., 2017). En cerdos, la suplementación con AAL en la MIV disminuyó los niveles de EROs y aumentó el GSH en el citoplasma de los ovocitos maduros. Además, la tasa de apoptosis en células del cúmulus después de la MIV fue menor, mientras que la tasa de formación de blastocistos fue mayor (Himaki & Hano, 2023). Si bien existen varios estudios que han explorado el efecto antioxidante del AAL en

la PIV de mamíferos, las investigaciones relacionadas a su impacto durante el CIV sobre el desarrollo, calidad y viabilidad de embriones tempranos son aún limitadas.

Por lo tanto, el **objetivo general** del presente plan de tesis es estudiar el rol del AAL durante el desarrollo preimplantacional en embriones de mamífero, utilizando como modelo el embrión bovino.

i.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1: Estudiar el efecto de diferentes concentraciones del AAL y condiciones de cultivo durante el CIV evaluando parámetros de estrés oxidativo y capacidad de desarrollo de embriones preimplantacionales de bovino a partir de ovocitos provenientes de ovarios de frigorífico (Experimento 1 y 2).

Objetivo 2: Estudiar el efecto de la mejor condición de CIV obtenida en el Objetivo 1 evaluando la capacidad de desarrollo, estado antioxidante y calidad de los embriones obtenidos a partir de ovocitos de ovarios de frigorífico (Experimento 3).

Objetivo 3: Validar la mejor condición de CIV obtenida en el Objetivo 2 durante la activación del genoma embrionario (AGE) utilizando ovocitos de matadero y finalmente ovocitos recuperados de donantes vivas mediante la técnica de OPU evaluando la capacidad de desarrollo embrionario temprano (Experimento 4 y Experimento 5).

i.6. HIPÓTESIS

La suplementación con el AAL durante el CIV mejora el desarrollo embrionario preimplantacional, la calidad y la viabilidad de los blastocistos bovinos.

m. Materiales y Métodos General

m.1. Técnica de PIV de embriones bovinos

La PIV consta de tres etapas consecutivas: MIV, FIV y CIV. La PIV comienza con la recolección de ovocitos, los cuales pueden obtenerse a partir de aspiración folicular guiada por ecografía llamada *Ovum Pick Up* (OPU) de hembras donantes, o de ovarios de matadero.

El protocolo completo incluye métodos para la MIV de ovocitos, la capacitación de espermatozoides, la fecundación y el desarrollo de los embriones resultantes, hasta el estadio de blastocisto (**Figura m.1**). Los listados del equipamiento, los reactivos empleados y la preparación de los medios utilizados se detallan en los ANEXOS I, II y III respectivamente.

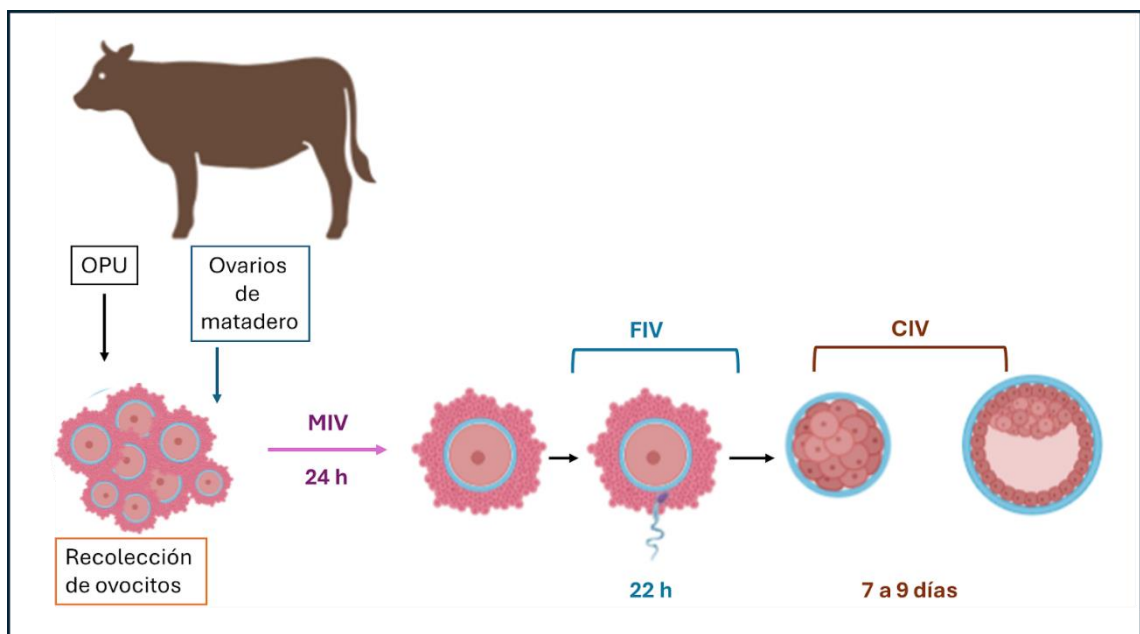


Figura m.1. Diagrama gráfico del proceso de PIV. Creado con BioRender.

m.1.1. Maduración *in vitro* (MIV)

m.1.1.1. Obtención de ovocitos de matadero:

Los ovocitos fueron obtenidos a partir de ovarios provenientes de hembras jóvenes (Frigorífico Gorina S.A.). Los ovarios se agruparon independientemente de la etapa del ciclo estral de las hembras. Se colocaron en termos con solución fisiológica estéril (NaCl 0,9 % p/v) y antibióticos (estreptomicina 100 mg/L y penicilina 59 mg/L) a 37 °C. El transporte se realizó dentro de las 2 h posteriores al sacrificio. Una vez en el laboratorio, se lavaron repetidas veces con agua atemperada a 37 °C para eliminar el exceso de sangre, y por último se enjuagaron con solución fisiológica a la misma temperatura. La conservación óptima de los ovocitos se logra evitando que los ovarios desciendan a menos de 25 °C. De cada ovario, se aspiraron los folículos de 3-8 mm presentes en la corteza superficial usando una aguja 18 G conectada a una jeringa estéril. El licor folicular aspirado se colocó en tubos de 50 ml estériles mantenidos en baño termostático a 37 °C, hasta comenzar el proceso de selección de los complejos ovocito-cúmulus (COCs). Para ello, del contenido de cada tubo se descartó el sobrenadante, y se agregó solución de buffer Dipia - Flush Plus homogeneizando el precipitado con los COCs. Luego, se colocó el contenido en una placa de Petri y se realizó la búsqueda de los COCs en una lupa estereoscópica a 20X (**Figura m.2**).



Figura m.2. Proceso de punción de ovarios y búsqueda de los COCs en lupa estereoscópica previo a la MIV.

La composición de los medios empleados para los procedimientos de MIV, FIV y CIV se detallan en el **Anexo III**.

Los COCs recolectados se colocaron en placas de Petri con medio de mantenimiento sobre una platina térmica a 37 °C. Solamente se seleccionaron para la MIV aquellos COCs considerados Grado 1 y Grado 2 (Aguila et al., 2020). Los COCs se lavaron dos veces en gotas de 100 µl de medio de MIV (Furnus et al, 2003) y luego se sembraron de 20 a 25 COCs en gotas de 100 µl de medio de MIV, bajo aceite mineral, y se incubaron a 39 °C en atmósfera gaseada con 5 % CO₂, 20 % O₂ y humedad a saturación, durante 24 h (**Figura m.3**). La preparación de las placas de MIV se realizó de 2 a 3 h antes del sembrado de los COCs para equilibrar el pH del medio y la temperatura.

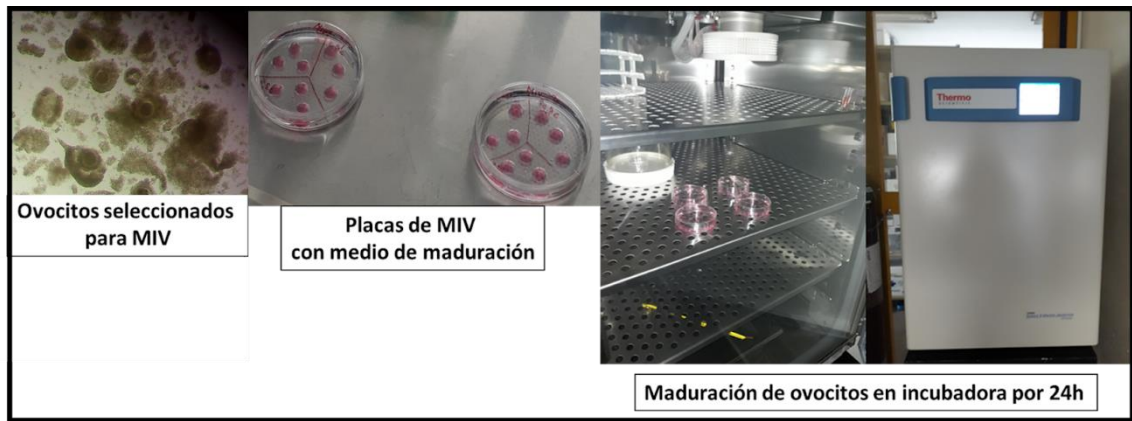


Figura m.3. Fotografías que muestran los COCs seleccionados dentro de la gota de MIV, las placas de maduración conteniendo dichas gotas, y finalmente el interior de la estufa de cultivo en donde permanecen 24 h. Fotos propias Lic. Fabra M.

m.1.1.2. Ovocitos obtenidos mediante OPU:

Todos los procedimientos animales utilizados en estos estudios fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (CICUAL#240610-2), Buenos Aires, Argentina.

Se utilizaron vacas raza Angus (*Bos taurus*) con buena condición corporal (6-7) y 60 días posparto, de tres establecimientos diferentes de la provincia de Buenos Aires, Argentina (Estancia Don Joaquín; EOLIA S.A; y Chacra Iván Gómez). En todos los casos, las aspiraciones foliculares (OPU) fueron realizadas por el mismo profesional. Previo al procedimiento de OPU, cada vaca recibió anestesia epidural caudal utilizando 7 ml de lidocaína al 2 %. Luego, se vació el recto y se limpiaron la vagina, la vulva y las áreas perineales con agua y yodo antes de insertar el transductor en el orificio externo del cuello uterino. Por medio de maniobras a través del recto, se giraron los ovarios para lograr una imagen clara en el monitor de ultrasonido, y así poder aspirar el folículo objetivo. Para las OPU se utilizó un ecógrafo equipado con un transductor microconvexo de 7,5 MHz y una guía de aspiración conectada a una

bomba de vacío (**Figura m.4**). El equipo de succión consistió en una aguja de 20 G conectada a un tubo cónico de 50 ml a través de un tubo de silicona y una presión de aspiración constante de 90 mm Hg. Esta presión logra un flujo de 15 ml por minuto, lo que evita la pérdida de las células del cúmulus que rodean el ovocito, evidenciado por la ausencia de ovocitos desnudos. Los COCs se aspiraron en PBS con alcohol polivinílico (1 %) y 40.000 IU/l de heparina sódica. Los aspirados foliculares se recolectaron mediante un circuito de 120 cm de longitud (con un diámetro interno de 1,1 mm) conectado directamente a un tubo cónico de 50 mL que contenía 10 mL de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco y 5000 IU/mL de heparina sódica a una temperatura de 35–37 °C. El tubo cónico con los aspirados foliculares se transportó inmediatamente al laboratorio móvil, y los COCs se recuperaron utilizando un filtro (75 mm). Los COCs se examinaron utilizando una lupa estereomicroscópica (20–30X) separando los ovocitos y descartando los atrésicos. Luego de recuperados, se lavaron una vez en PBS a 37 °C y se colocaron en placas de Petri con medio de mantenimiento. Posteriormente, grupos de hasta 20 COCs se colocaron en tubos de cultivo estériles de 5 ml con 350 µl de medio de MIV y aceite mineral, y se gasearon por 20 segundos, sellando su orificio con un tapón siliconado y colocándose en una estufa transportadora a 39 °C. Una vez en el laboratorio, se retiró el tapón de silicona y se colocaron en una gradilla en la incubadora a 39 °C en atmósfera gaseada con 5 % CO₂, 20 % O₂ y humedad a saturación, durante 24 h.

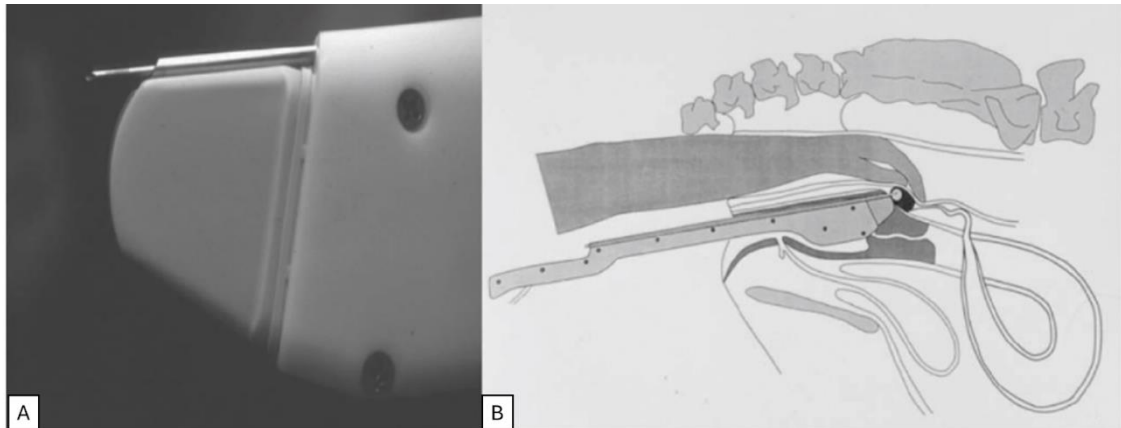


Figura m.4. A) Transductor de ultrasonido con aguja de aspiración de ovocitos que sobresale de la guía de aguja. B) Diagrama que muestra la posición del transductor de ultrasonido presionado contra el fondo de la vagina, con el ovario manipulado manualmente por el recto y sostenido contra la pared vaginal. Modificado de Hasler & Barfield (2021).

m.1.2. Fecundación *in vitro* (FIV)

La etapa de FIV consiste en la preparación de los COCs que serán inseminados, y en el procesamiento del semen a utilizar.

m.1.2.1. Preparación de medio y placas de FIV:

Para la FIV se utilizó medio Fert-TALP (Parrish et al., 1986). Para equilibrar la temperatura y el pH (7,4) del medio, las placas de lavado y de incubación definitiva se gasearon en estufa a 39 °C, con 5 % CO₂ en aire, 20 % de O₂, y humedad a saturación durante 2 h previas al pasaje de los COCs. Las placas de FIV definitivas se armaron con gotas de 60 µl de medio Fert-TALP cubiertas con aceite mineral, y gotas de 100 µl para las placas de lavado (**Figura m.5**).

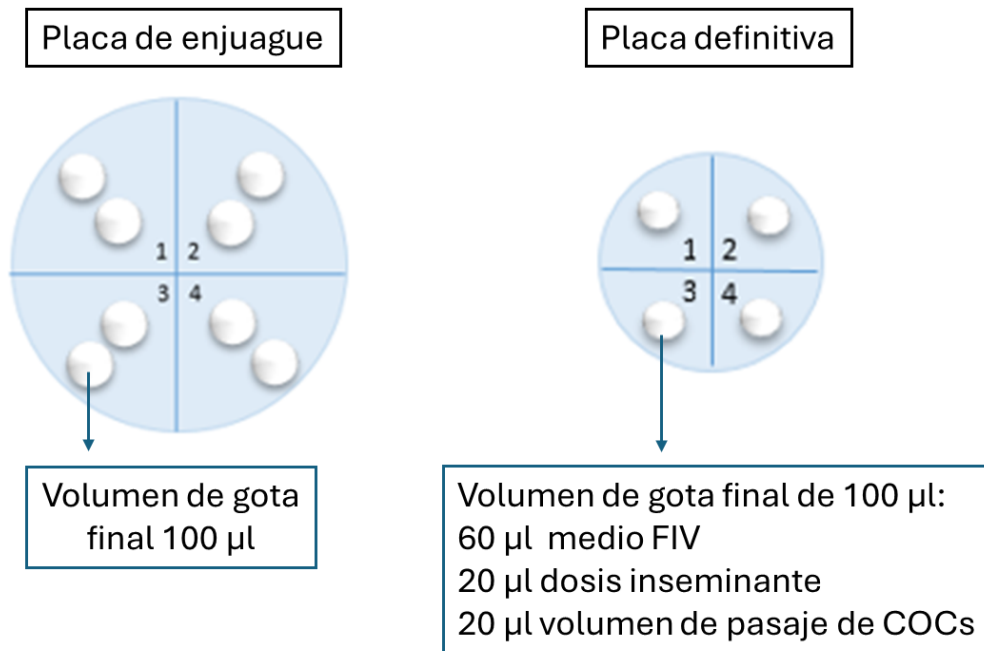


Figura m.5. Diagrama que muestra el armado de las placas para FIV. A la izquierda placa de enjuague y a la derecha placa definitiva con medio Fert-TALP. Los números corresponden a la división de cuadrantes para distintos tratamientos. Creado con BioRender.

m.1.2.2. Preparación de los COCs:

Luego de 24 h de incubación en medio de MIV, los COCs se enjuagaron en gotas de 100 µl de Medio TL, para estabilizar el pH a 7,4. Posteriormente, se lavaron 2 veces en gotas de 100 µl de medio de FIV y se sembraron en la placa definitiva con medio de FIV.

m.1.2.3. Procesamiento del semen:

En todos los ensayos se utilizó el semen de un mismo toro de probada fertilidad *in vitro*. Se utilizó una pajuela por cada inseminación. El semen se procesó mediante un gradiente de *Percoll* (Parrish et al., 1995) para separar los espermatozoides vivos. Cada pajuela se descongeló colocándola en agua a 37 °C durante 30 segundos. El semen se depositó en la superficie de la columna de *Percoll*, se centrifugó durante 20 minutos a 500 g y el *pellet* resultante que contenía los

espermatozoides vivos se resuspendió en medio HEPES-TALP. Luego, se centrifugó 10 minutos a 300 g, y se descartó el sobrenadante (**Figura m.6**).

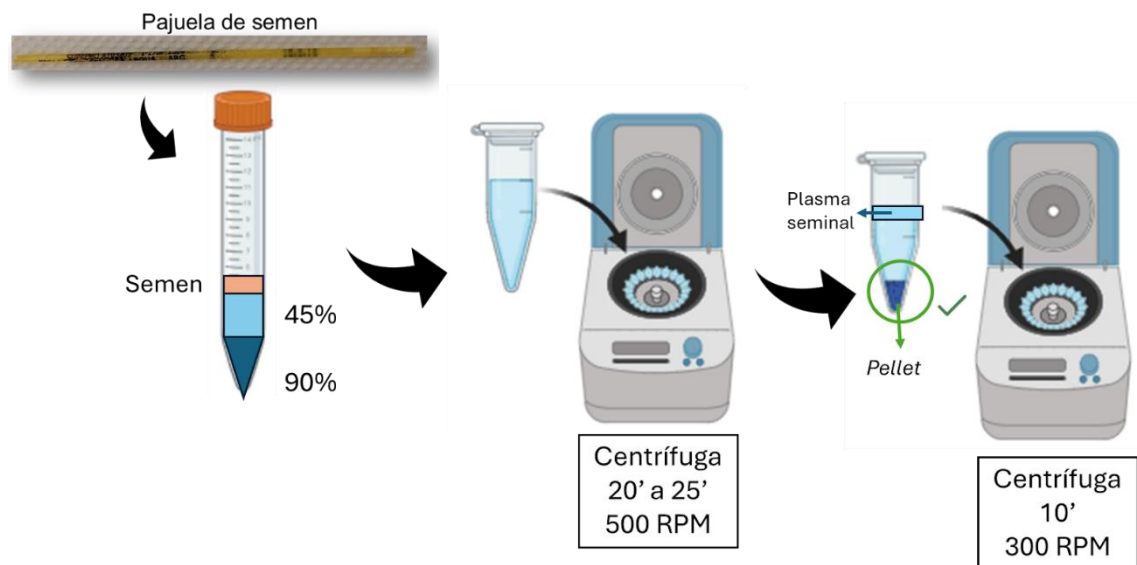


Figura m.6. Esquema de procesamiento de semen mediante el método Percoll. (Creado con BioRender).

Posteriormente, el *pellet* fue resuspendido en medio FIV. La concentración de espermatozoides se determinó con una cámara de conteo Neubauer y un microscopio óptico. Para la inseminación de los COCs se utilizó una concentración de espermatozoides de 2 millones/ml. Los COCs junto con los espermatozoides se incubaron durante 22 h a 39 °C en atmósfera gaseada con 5 % CO₂, 20 % O₂ y humedad a saturación.

m.1.3. Cultivo *in vitro* (CIV)

m.1.3.1. Preparación de las placas y proceso de CIV:

Para la etapa de CIV los embriones fueron incubados durante 7 a 9 días en medio SOF. La osmolaridad del medio de cultivo completo fue de 274-276 mOsm/kg (Gardner D., 1994). Las placas de CIV se incubaron 2 h antes para equilibrar el pH

y la temperatura. Los presuntos cigotos se cultivaron en atmósfera gaseada con 20 % o 7 % de O₂, dependiendo del experimento y con 5 % de CO₂ a 39 °C con humedad a saturación.

Luego de 22 h de FIV, los presuntos cigotos se separaron de forma mecánica de las células del cúmulus remanentes utilizando un vórtex, durante 3 minutos. Posteriormente, se lavaron en gotas de 100 µl de medio TL y dos veces en gotas de 100 µl de medio de CIV. Se cultivaron un total de 20-25 cigotos por gota de 80 µL (60 µl de medio CIV + 20 µl con los cigotos) bajo aceite mineral. Las primeras 24 h de cultivo se llevaron a cabo sin glucosa, y a partir del día 2 al 8 en presencia de 1,5 mM de glucosa. El medio de CIV se renovó cada 48 h.

m.2. Técnicas empleadas:

m.2.1. Evaluación de la calidad de los complejos ovocito-cúmulus:

Dado que hay muchos factores difíciles de controlar cuando se utilizan ovarios de frigorífico procedentes de vacas de origen desconocido, la morfología de los COCs suele ser el criterio más comúnmente utilizado para seleccionar y clasificar una colección estándar de ovocitos bovinos. Los criterios morfológicos incluyen el número y la apariencia de las capas del cúmulo y las características citoplasmáticas del ovocito, como la textura o el brillo de su citoplasma. Para la selección ovocitaria, se siguió el criterio propuesto por Águila et al., (2020). El Grado I corresponde a COCs con cúmulus compacto, completo y citoplasma homogéneo; en el Grado II la cobertura del cúmulus puede ser parcial y/o ligeramente expandida, con menos de cinco capas de células y citoplasma homogéneo, y el Grado III presenta un citoplasma más oscuro con presencia de manchas correspondientes a acumulaciones lipídicas y cúmulus expandido, indicativo de atresia folicular (Águila et al., 2020). Solo fueron utilizados los ovocitos clasificados como Grado I y II.

El tamaño del ovocito se ha utilizado como parámetro de calidad no invasivo. Aunque es difícil medir el diámetro preciso del ovocito durante la MIV, la selección de ovocitos basada en el diámetro puede usarse como un paso de rutina durante los protocolos de micromanipulación. El estudio de Fair et al. (1995) demostró que las tasas de reanudación de la meiosis a MII fueron mayores para los ovocitos >110 micras. Además, los ovocitos <110 micras eran transcripcionalmente activos, lo que sugiere que todavía estaban en la fase de crecimiento de la ovogénesis. Los ovocitos bovinos adquieren competencia meiótica con un diámetro de 115 micras, pero la competencia de desarrollo total se adquiere alrededor de 120 micras, posiblemente porque los ovocitos más pequeños aún no han completado su fase de crecimiento.

m.2.2. Evaluación visual del desarrollo y calidad embrionaria:

Los embriones se clasificaron según un sistema de códigos numéricos para su estadio de desarrollo (del 1 al 9) y su calidad (del 1 al 4) (Palma G., 2001). En el presente trabajo se siguieron las recomendaciones del Manual de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (*International Embryo Technology Society*- IETS) (Stringfellow & Givens, 2010).

Evaluación de estadio de desarrollo embrionario:

El desarrollo embrionario se evaluó mediante la clasificación de los blastocistos al día 6, 7 y 8 del CIV utilizando una lupa estereoscópica. En todos los experimentos, el registro de los distintos estadios funciona como un indicador de la viabilidad embrionaria. Es necesario "rodar" el embrión en el fondo de la placa para poder verlo desde diferentes perspectivas. El diámetro total del embrión bovino es de 150 a 190 μm , incluyendo un espesor de la zona pelúcida de 12 a 15 μm . Este permanece prácticamente sin cambios desde la etapa de una célula hasta la etapa de blastocisto. Un embrión ideal es compacto y esférico. Las blastómeras deben ser de tamaño similar con color y textura uniformes. El citoplasma no debe ser granular ni

vesiculado. El espacio perivitelino debe ser claro y no contener restos celulares. La zona pelúcida debe ser uniforme. No debe estar agrietado ni colapsado y no debe contener residuos en su superficie. El sistema de codificación estandarizado para usar en la descripción de la etapa de desarrollo es numérico y va desde "1", un ovocito no fertilizado o un embrión de 1 célula, hasta "9", blastocisto eclosionado en expansión (**Figuras m.7, m.8 y m.9**).

- Ovocito no fertilizado (Estadio **1**)
- Embrión de 2 a 12 células (Estadio **2**)
- Mórula temprana: al menos 16 células. La masa celular del embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino (Estadio **3**).
- Mórula compacta: las blastómeras han formado una masa embrionaria que ocupa entre el 60 y el 70 % del espacio perivitelino (Estadio **4**).
- Blastocisto temprano: embrión que presenta una apariencia de anillo de sello con cavidad llena de líquido denominada blastocele. El embrión ocupa entre el 70 y el 80 % del espacio perivitelino (Estadio **5**).
- Blastocisto: diferenciación de la capa externa del trofoblasto y de la masa celular interna, más oscura y compacta. El blastocele es muy prominente, y el embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino (Estadio **6**).
- Blastocisto expandido: el diámetro total del embrión aumenta drásticamente, con un adelgazamiento simultáneo de la zona pelúcida hasta aproximadamente un tercio de su espesor original (Estadio **7**).
- Blastocisto en proceso de eclosión: los embriones están en proceso de protrusión o eclosión (Estadio **8**).
- Blastocisto eclosionado: el blastocisto abandonó completamente la zona pelúcida, es esférico con un blastocele bien definido (Estadio **9**).

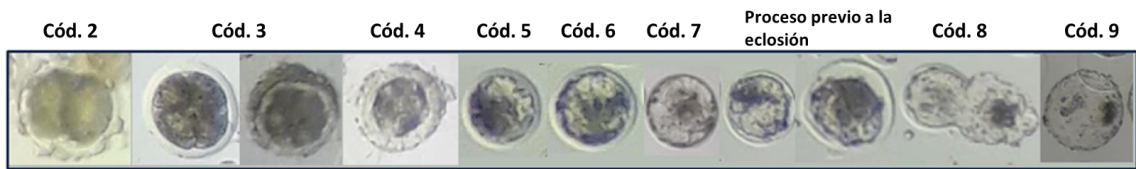


Figura m.7. Cinética de desarrollo embrionario. Cód.: Código. Fotos propias: Lic. Fabra M.

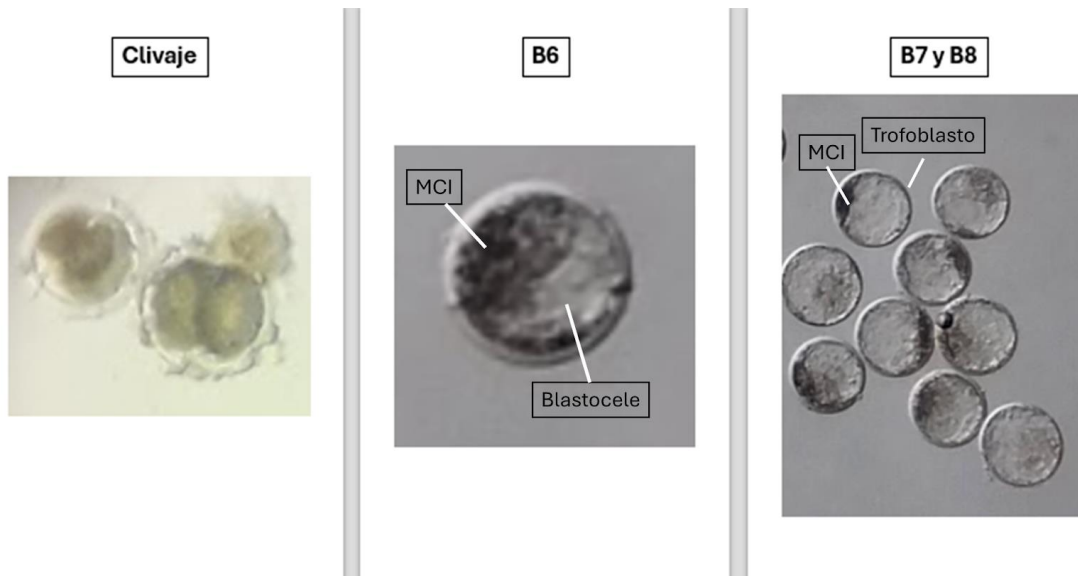


Figura m.8. Fotografías de embriones bovinos *in vitro*. Clivaje: dos embriones de dos células. B6: blastocisto día 6 de cultivo. B7 y B8: blastocistos día 7 y día 8 de cultivo, respectivamente. MCI: Macizo celular interno. Fotos propias Lic. Fabra M.

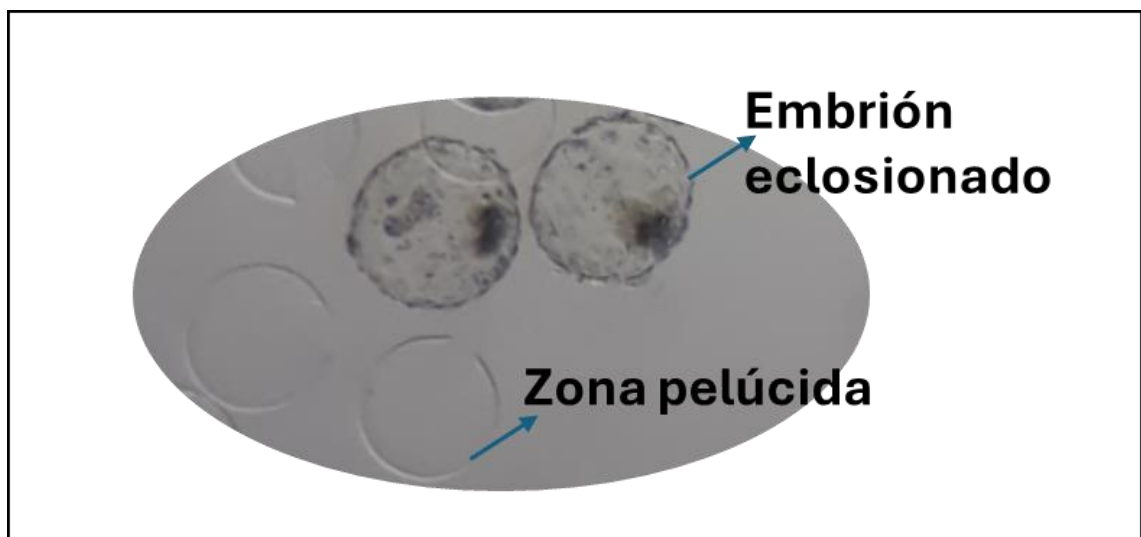


Figura m.9. Fotografía de dos embriones bovinos eclosionados. Se observa el remanente de la zona pelúcida. Fotos propias Lic. Fabra M.

Evaluación de calidad embrionaria:

Los códigos para la calidad del embrión también son numéricos, se denominan grados, y se basan en la integridad morfológica de los embriones. Los grados para la calidad del embrión varían de “1” a “4” (**Figura m.10**):

- **Grado 1:** Excelente o Bueno. Los embriones tienen una masa simétrica y esférica con blastómeros individuales que son uniformes en tamaño, color y densidad. Este embrión es consistente con su etapa esperada de desarrollo. Las irregularidades deben ser relativamente menores, y al menos el 85 % del material celular debe ser una masa embrionaria intacta y viable. Este juicio debe basarse en el porcentaje de células embrionarias representadas por el material extruido en el espacio perivitelino. La zona pelúcida debe ser lisa y no tener superficies cóncavas o planas que puedan hacer que el embrión se adhiera a una placa de Petri o una pajuela. Los embriones de Grado 1 sobreviven bien al procedimiento de congelación/descongelación, y son los recomendados para el comercio internacional.

- **Grado 2:** Regular. Estos embriones tienen irregularidades moderadas en la forma general de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 50 % de la masa embrionaria debe estar intacta. La supervivencia de estos embriones al procedimiento de congelación/descongelación es menor que con los embriones de grado 1, pero las tasas de preñez son adecuadas si los embriones se transfieren frescos a receptoras adecuadas. Por lo tanto, estos embriones a menudo se denominan "transferibles" pero no "congelables".

- **Grado 3:** Deficiente. Estos embriones tienen irregularidades importantes en la forma de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células

individuales. Al menos el 25 % de la masa embrionaria debe estar intacta. Estos embriones no sobreviven al procedimiento de congelación/descongelación y las tasas de embarazo son inferiores a las obtenidas con embriones de calidad aceptable si se transfieren frescos a receptores adecuados.

- **Grado 4:** Muertos o degenerados. Estos pueden ser embriones, ovocitos o embriones de 1 célula. No son viables y deben descartarse.

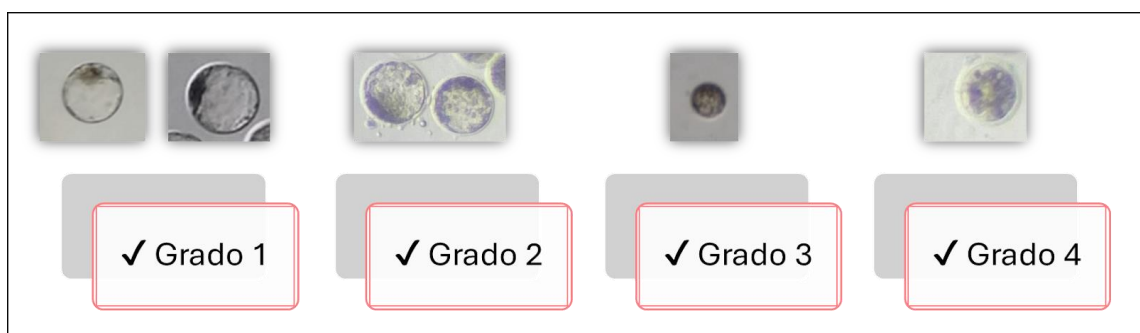


Figura. m.10. Blastocistos en distintos grados de calidad embrionaria. Fotos propias Lic. Fabra M.

m.2.3. Número total de células embrionarias. Tinción de Hoechst 33342:

La tinción de Hoechst 33342 marca el ADN condensado de las células. Este colorante emite fluorescencia a 461 nm cuando se excita con luz ultravioleta colocando la muestra en un microscopio de epifluorescencia con fuentes de luz que emiten a ~350 nm y filtros que permiten la transmisión de luz a ~460 nm (Crowley et al., 2016).

El número total de blastómeras es un indicador de calidad embrionaria. Siguiendo el protocolo, los embriones se fijaron en formaldehído al 4 %. Luego, se lavaron tres veces en PBS al 5 % y se incubaron en 1 mg/mL de Hoechst 33342 durante 10 minutos a 37 °C. Luego se lavaron y montaron en un portaobjetos de vidrio con una gota de 20 µL de glicerol, y se examinaron bajo un microscopio de epifluorescencia

a 200x y 400x para determinar el número total de blastómeras. Los datos se expresaron como el valor de la media del número de blastómeras \pm desviación estándar (DE).

m.2.4. Viabilidad embrionaria

Para evaluar la viabilidad se utilizó una tinción con FDA. Es una molécula no polar que dentro de la célula es hidrolizada por esterases lo que produce una fluoresceína que emite color verde. Para realizar esta evaluación, los cigotos y los embriones se colocaron durante 10 a 15 minutos respectivamente, en una solución de 2,5 $\mu\text{g/l}$ de FDA en PBS a 37 °C . Luego, las muestras se lavaron 2 veces con PBS, se montaron en portaobjetos y se observaron con un microscopio de epifluorescencia con un filtro de excitación de 420 nm. Para la evaluación, cada muestra se fotografió y se analizó con el software Image J 1.48v. Para este propósito, la intensidad de cada píxel se dividió por el número de píxeles de cada célula. Los datos se expresaron como intensidad media de FDA (unidades arbitrarias de fluorescencia: UAF) \pm DE (Ferreira & Rasb, 2012).

m.2.5. Evaluación de parámetros de estrés oxidativo embrionario mediante técnicas colorimétricas

Se tomaron muestras para determinar la concentración de proteínas, de malondialdehído (MDA) , concentración total de GSH y de la enzima SOD. Dichos parámetros se determinaron con el mismo pool de blastocistos (n=8) utilizando un lector de microplacas de 96 pocillos y el software EZRead Galápagos (Luchetti et. al.,2017). Los blastocistos se congelaron en N₂ líquido y se descongelaron a temperatura ambiente en reiteradas oportunidades, para liberar su contenido celular y obtener las proteínas y extractos enzimáticos. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 950 rpm por 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante fue separado del *pellet*. Cada muestra evaluada consistió en 90 μl de sobrenadante.

Cuantificación de proteínas. Ensayo Bradford

Este ensayo se utiliza para medir la cantidad total de proteínas de una muestra (Bradford M., 1976). Se basa en la utilización de un colorante que se torna azul al interactuar con los grupos amino de las proteínas y dicha interacción se mide por espectrofotometría. En una placa de 96 pocillos se colocaron 100 μ l de solución Bradford (conteniendo el colorante) y 20 μ l de muestra. Como estándar se utilizó albúmina (1 mg albúmina/ml). Las muestras se incubaron por 30 minutos en oscuridad y luego se midió la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteína se determinó comparando las muestras con una curva estándar de concentraciones de albúmina conocidas. El resultado se expresó como μ g de proteína/ml. Este ensayo fue realizado para la normalización de los datos obtenidos en las pruebas de TBARS, GSH y SOD.

Peroxidación lipídica. Ensayo de TBARS

Este ensayo mide la cantidad de MDA, que es uno de los principales productos de la peroxidación lipídica. El MDA reacciona con el TBA (Ácido tiobarbitúrico), generando un color rosado que permite la cuantificación del mismo por espectrofotometría. Se utilizó el método de TBARS adaptado a microplaca (Nikoloff et al., 2020). Para realizar la curva de calibración se prepararon soluciones con MDA y TBA, obteniendo patrones de concentración conocida de MDA: 50 mM, 150 mM, 250 mM, 500 mM, 1000 mM y 1500 mM. Una vez preparadas las soluciones, se llevaron a estufa (calor seco) por 20 minutos y luego se enfriaron en hielo. Se utilizó una placa de 96 pocillos donde se cargaron 100 μ l de cada uno de estos patrones y se midió la absorbancia a 535 nm. Para la medición de las muestras, se colocó 40 μ l de muestra y 60 μ l de TBA por cada pocillo. A partir de una relación cuadrática entre la absorbancia y la concentración de MDA de las soluciones patrón, se obtuvo la concentración de las muestras que finalmente quedó expresada en nM de MDA/ μ g de proteína total según los resultados obtenidos al realizar la prueba de Bradford.

Este ensayo también se realizó para medir la peroxidación lipídica en muestras de medio de CIV. Los resultados se expresaron como nmol MDA/cigoto presente en el medio de cultivo evaluado.

Análisis de GSH/GSSG en embriones

Se utilizó la técnica modificada de Takahashi et al., (1993). Brevemente, se realizó una curva estándar utilizando GSSG en una placa de 96 pocillos donde se colocó: 93,15 µl de Buffer fosfato; 26,1 µl de DTNB; 10,75 µl de NADPH; 10 µl del estándar (o muestra) y 18,6 µl de la enzima GR. Una vez colocados todos los reactivos, se agitó la placa por 30 segundos y se midió la absorbancia a 405 nm cada 1 minuto, durante 6 minutos. La concentración de GSH de cada muestra se determinó a través de una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de GSH. Los resultados se expresaron en pM de GSH/µg proteína total.

Actividad SOD

Para determinar la actividad de la enzima SOD se utilizó un kit comercial. Este método utiliza xantina y xantina oxidasa para generar radicales superóxidos que reaccionan con el cloruro de 2- (4-yodofenil) -3- (4-nitrofenol) -5-feniltetrazolio (INT) y dan un compuesto color rojo. La actividad de la SOD es medida por el grado de inhibición de esta reacción, es decir, por la disminución del color. Una unidad de SOD es la que causa una inhibición del 50 % de la tasa de reducción de INT bajo las condiciones del ensayo. Para realizar el ensayo se prepararon los siguientes reactivos: 1) R1b: buffer listo para usar; 2) R1a: al sustrato R1a que contiene INT y xantina se le agrega 20 ml de R1b; 3) R2: al sustrato R2 que contiene xantina oxidasa se le agrega 10 ml de agua bidestilada y 4) Cal: al sustrato Cal se le agregan 10 ml de agua bidestilada. Este reactivo es el estándar que contiene la SOD. Se realizó una curva patrón con el estándar Cal en concentraciones crecientes de SOD. Se utilizó una placa de 96 pocillos y en cada pocillo se colocaron 5 µl de cada

estándar, 170 μ l de R1a y 25 μ l de R2. Se midió la absorbancia a 505 nm al comienzo y a los 3 minutos. Se realizó el mismo proceso con las muestras, colocando 5 μ l de cada muestra en lugar de 5 μ l de Cal. Con el valor de las absorbancias, se calculó el porcentaje de inhibición que permite expresar la concentración de SOD en unidades. Los resultados se expresaron en unidades de SOD (USOD)/ μ g de proteína total.

m.2.6. Cuantificación de EROs intracelulares en cigotos y embriones usando la sonda H2DCFDA

Se utilizó la sonda fluorescente H2DCFDA, que es un colorante que se une a las especies reactivas de oxígeno de una forma no específica. La sonda H2DCFDA se oxida directamente por H₂O₂, sus derivados y otros peróxidos, y también se oxida indirectamente por el anión superóxido, lo que proporciona una herramienta confiable para evaluar la producción intracelular de EROs.

Una solución madre de H2DCFDA disuelta DMSO se diluyó en PBS a una concentración de trabajo de 5 μ M. Las muestras se lavaron dos veces en PBS y se incubaron con 5 μ M H2DCFDA en una atmósfera oscura y humidificada con 5 % de CO₂ a 38,5 °C durante 15 minutos (embriones clivados de día 2 de cultivo, o blastocistos) y 20 minutos (cigotos). Luego, se lavaron dos veces con PBS fresco y se tomaron imágenes inmediatamente utilizando un microscopio de epifluorescencia equipado con filtros UV (460 nm) para cuantificar el área del embrión y la intensidad de fluorescencia (píxeles) en UAF. Las intensidades de fluorescencia se analizaron utilizando el software ImageJ (versión 1.46r; Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, EE. UU.). Los datos se expresaron como intensidad media de H2DCFDA en UAF \pm desviación estándar (DE).

m.2.7. Cuantificación intracelular de GSH en embriones usando la sonda Thiol Tracker TM Violet

Para la evaluación de GSH, los embriones se lavaron con PBS y se incubaron en 50 μ L de 10 μ M de Thiol Tracker TM Violet en una atmósfera oscura y humidificada durante 30 minutos a 37 °C. Después de la tinción, los embriones se lavaron dos veces con PBS, se montaron en un medio de montaje y se tomaron imágenes inmediatamente, utilizando un microscopio de epifluorescencia equipado con una combinación apropiada de filtros para cuantificar el área y la intensidad de fluorescencia (píxeles) de los embriones en UAF. La intensidad de la señal de fondo se restó de los valores medidos en las micrografías del tratamiento. Las imágenes digitales se procesaron y analizaron utilizando ImageJ (versión 1.46r; National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE. UU.).

m.2.8. Evaluación de apoptosis. Ensayo TUNEL

Para medir la tasa de apoptosis de los embriones, se utilizó el marcador TUNEL siguiendo las instrucciones del kit. Los embriones fijados en formaldehído al 4 % se lavaron tres veces en PBS al 5 % y se incubaron en solución de permeabilización 0.1 % Tritón x-100 en 0.1 % citrato de sodio por 2 minutos en hielo. Luego, se lavaron tres veces en PBS al 5 % y se colocaron en reacción de TUNEL por 60 minutos a 37 °C, en oscuridad y cámara húmeda. Posteriormente, se enjuagaron 2 veces en PBS al 5 %, y se transfirieron a portaobjeto de vidrio en gotas de 10 μ l, para examinarse utilizando un microscopio de epifluorescencia equipado con un filtro de excitación de 520 nm para poder determinar el número total de blastómeras apoptóticas.

m.2.9. Evaluación de la criopreservación embrionaria.

La composición de las soluciones utilizadas para vitrificación/calentamiento se detallan en el **Anexo III**.

La vitrificación de embriones se realizó según la técnica descrita previamente por Vajta et al. (1998) en placa de 4 pocillos. Los medios utilizados, tanto MM, SM, y los medios de vitrificación SV1 y SV2, como los de calentamiento SC1 y SC2, se llevaron a incubadora 2 h antes del procedimiento para equilibrar la temperatura.

Se utilizaron placas de 4 pocillos para todos los blastocistos vitrificados. En el primer pocillo, que contenía 800 μ l de solución MM, los blastocistos fueron colocados para realizar un primer enjuague, y ser seleccionados según su grado de calidad para proceder a la vitrificación. El segundo pocillo también contenía 800 μ l de solución MM, y cada blastocisto seleccionado fue transferido allí durante 1 minuto, como paso previo a ser colocado en el tercer pocillo. El tercer pocillo contenía 1 ml de SV1, y los blastocistos transferidos allí permanecieron durante 3 minutos, como preparación para el último paso de vitrificación. El pocillo 4 contenía la solución SV2, y se utilizó para preparar microgotas en las cuales los blastocistos fueron transferidos y permanecieron allí durante 20-25 segundos, para luego ser tomados en el menor volumen posible y transferidos al dispositivo de vitrificación. Se utilizó un dispositivo de superficie Cryotech® (ex Cryotop®), que se sumergió inmediatamente en nitrógeno líquido (N_2L) para su almacenamiento (**Figura m.11**).

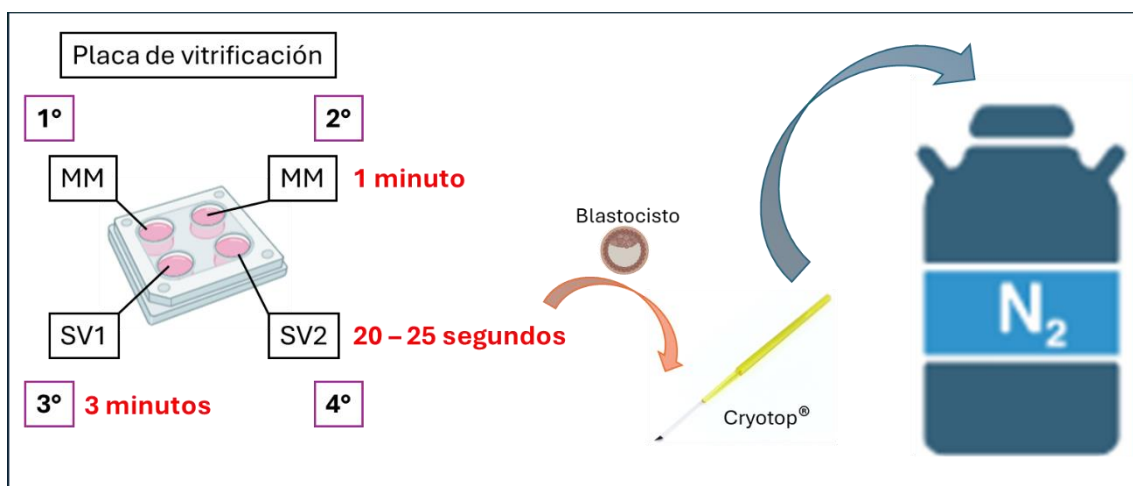


Figura m.11. Proceso de vitrificación. Diagrama esquemático que ilustra los pasos en el proceso de vitrificación: 1°: los blastocistos son colocados en solución MM. 2°: El blastocisto

seleccionado es colocado en el pocillo 2. **3°**: el blastocisto es colocado en el tercer pocillo. **4°**: el blastocisto permanecerá en el cuarto pocillo y será colocado en el Cryotop®. Creado con BioRender.

El procedimiento de calentamiento se llevó a cabo a una temperatura ambiente de 30 °C y sobre una platina térmica a 41 °C. Cada dispositivo Cryotop® se sumergió de forma directa en 1,2 ml de SC1 durante 5 minutos, evaluando la recuperación del blastocisto a su temperatura fisiológica. Luego, cada blastocisto era transferido a la solución SC2 por otros 5 minutos, y posteriormente trasladados a una solución de MM por 5 minutos más. Para completar el proceso de calentamiento, los blastocistos fueron lavados en medio SOF + 5 % SFB y llevados a placa de cultivo con medio de CIV, la cual fue puesta en incubadora con una atmósfera de 7 % O₂, 5 % CO₂ y 88 % N₂ a 39 ° C (**Figura m.12**).

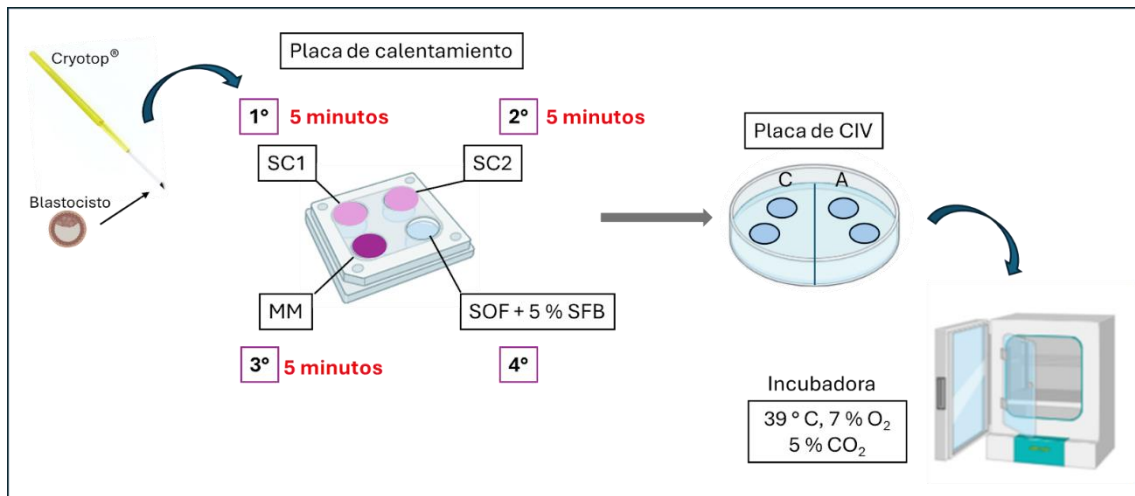


Figura m.12. Proceso de calentamiento. Diagrama esquemático que ilustra los pasos en el proceso de calentamiento: **1°**: el Cryotop® con el blastocisto colocado en SC1, y recuperado. **2°**: El blastocisto es transferido al segundo pocillo. **3°**: el blastocisto es colocado en el tercer pocillo. **4°**: el blastocisto será lavado como paso previo a colocarlo en la placa de CIV. Creado con BioRender.

1. Capítulo 1

Estudiar el efecto de diferentes concentraciones del AAL y condiciones de cultivo durante el CIV evaluando parámetros de estrés oxidativo y capacidad de desarrollo de embriones preimplantacionales de bovino a partir de ovocitos de ovarios de frigorífico.

1.1. Introducción

En los últimos años, el efecto del AAL ha sido evaluado en las distintas etapas de la PIV, en diferentes especies. En experimentos con ratones se determinó que la producción endógena de AAL es esencial para el desarrollo embrionario temprano, y sus propiedades antioxidantes mejoran el desarrollo *in vitro* de los folículos ováricos (Yi & Maeda, 2005; Talebi et al., 2012). La suplementación con AAL en los medios FIV y CIV condujo a mejoras en el desarrollo del embrión de ratón incrementando la viabilidad embrionaria y disminuyendo el estrés oxidativo a través de un aumento en el contenido de GSH (Truong et al., 2016; Truong & Gardner, 2017). En equinos, la suplementación con AAL mejoró el cultivo de folículos preantrales (Gomes et al., 2018). En porcinos y bovinos, el tratamiento con AAL en la etapa de MIV aumentó los niveles intracelulares de GSH, disminuyendo así los niveles intracelulares de las EROs; además, aumentó la tasa de blastocistos y el número total de células por embrión (Kang & Hyun, 2017; Hassan et al., 2017). En bovinos, la suplementación con AAL en los medios de cultivo condujo a un mayor crecimiento y desarrollo de los folículos preantrales secundarios *in vitro* (Zoheir et al., 2017). Aunque se han realizado otros estudios para evaluar los efectos antioxidantes del AAL en bovinos, ha habido pocas investigaciones relacionadas con los efectos del AAL en el desarrollo, la calidad, la viabilidad y el estatus oxidativo del embrión durante el CIV.

El CIV es la etapa más larga del proceso de PIV, y se desvía de las condiciones *in vivo* en muchos aspectos. Existen factores críticos durante el CIV entre los que podemos citar a la composición de los medios de cultivo y las condiciones de incubación que influyen en el embrión en desarrollo. Numerosos estudios han demostrado que la concentración de O₂ atmosférico durante el cultivo tiene efectos perjudiciales en el desarrollo del embrión (Harvey A., 2007). Si bien se cree que esto surge de la producción de EROs, es una visión demasiado simplista del papel del O₂ durante el desarrollo, ya que el O₂ tiene un papel importante en la regulación del metabolismo y el desarrollo embrionario. A diferencia del entorno *in vivo*, los medios de cultivo carecen de muchos de los factores presentes en el fluido del tracto reproductivo, y el cultivo de embriones ocurre comúnmente en concentraciones de O₂ no fisiológicas (Harvey A., 2007). La concentración de O₂ oviductal es de alrededor del 7 %, o menos, e incluso el ambiente uterino tiene una concentración de O₂ menor que la del oviducto (Fischer & Bavister, 1993). Se ha documentado el efecto perjudicial de cultivar embriones en una concentración de O₂ cercana a la atmosférica (20 %) (Harvey A., 2007).

Por lo tanto, el objetivo del presente capítulo fue investigar el efecto antioxidante del AAL durante el CIV en: el desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto y el estatus oxidativo mediante el empleo de alta tensión de O₂ (20 %) en la atmósfera de cultivo (**Experimento 1**). Además, se estudió el efecto de AAL en sí mismo en el desarrollo del embrión en etapa temprana y su calidad mediante el empleo de baja tensión de O₂ en la atmósfera de cultivo (7 %), y distintas condiciones del medio de CIV (**Experimento 2**).

Las concentraciones de AAL elegidas en el presente capítulo se basaron en estudios previos realizados por Zhang et al. (2013); Talebi et al. (2012) y Truong et al. (2016).

1.2. Diseño experimental

1.2.1. Experimento 1: Efecto de la suplementación con AAL en el medio de CIV con una atmósfera de cultivo de alta tensión de O₂ (20 %) sobre el desarrollo y el estatus oxidativo embrionario

Este experimento se realizó para evaluar el efecto antioxidante del AAL en el CIV, por ello se utilizó 20 % de tensión de O₂ en la atmósfera de cultivo. Esto nos permitió determinar la concentración óptima de AAL para el desarrollo embrionario *in vitro*. Los ovocitos se obtuvieron de ovarios de matadero, fueron sometidos a las tres etapas de PIV, y se desarrollaron hasta el estadio de blastocisto. Las tres etapas consecutivas de la PIV se llevaron a cabo en una atmósfera gaseosa con 5 % de CO₂ a 39 °C, humedad a saturación y 20 % de O₂. Al inicio del CIV, el medio se complementó con tres concentraciones diferentes de AAL, que se mantuvieron constantes durante todo el desarrollo embrionario. Los tratamientos fueron los siguientes:

- 1) C (0 μM AAL)
- 2) A5 (5 μM AAL)
- 3) A25 (25 μM AAL)
- 4) A100 (100 μM AAL)

Para determinar la concentración óptima de AAL durante el CIV en el desarrollo embrionario, se registraron las tasas de clivaje al día 1 (48 h posteriores a la FIV), tasas de blastocisto en los días de cultivo 6, 7 y 8 (B6, B7 y B8), y eclosión al día 9. Para evaluar el estatus oxidativo en los blastocistos, se cuantificaron las concentraciones de proteína, MDA, SOD y GSH en B8.

1.2.2. Experimento 2. Efecto del AAL sobre el desarrollo embrionario y la calidad de los blastocistos en diferentes condiciones del medio de CIV con baja tensión de O₂ en la atmósfera de cultivo (7 %)

El propósito de este experimento fue investigar el efecto del AAL sobre la calidad del embrión. La concentración de AAL elegida fue 5 μM . Esto es debido a que los resultados obtenidos en el **Experimento 1** demostraron que las concentraciones de 25 y 100 μM de AAL tuvieron efectos no deseados sobre el desarrollo embrionario. Además, se utilizaron nuevas concentraciones de AAL (2,5 μM y 7,5 μM) para evaluar la curva de concentración-respuesta en nuestro modelo de estudio. Tanto la MIV como la FIV se realizaron a 39 °C con 5 % de CO_2 en el aire y humedad a saturación, mientras que el CIV se realizó en una atmósfera de 7 % de O_2 , 5 % de CO_2 y 88 % de N_2 a 39 °C con humedad saturada. Además, se asignaron tres condiciones de cultivo diferentes para una evaluación más precisa de los efectos de AAL. En algunos tratamientos, no se incluyó SFB en el medio de CIV ya que la composición específica del suero presente en el medio de cultivo no se conoce con exactitud (Watson et al., 2000). Tampoco se agregaron aa esenciales y no esenciales al medio de cultivo de algunos grupos experimentales. Los cambios mencionados permiten descartar que los aa o algún componente presente en el SFB puedan interferir con los efectos del AAL (Han et al., 1997). Las 3 condiciones de cultivo diferentes tuvieron un total de 12 tratamientos (Figura 3.1). Durante el CIV se registraron las tasas de clivaje al día 1 (48 h posteriores a la FIV), tasa de blastocistos B6, B7 y B8, y eclosión al día 9. Como parámetro de calidad embrionaria, se evaluó el número total de células por embrión y las tasas de apoptosis celular en blastocistos B8.

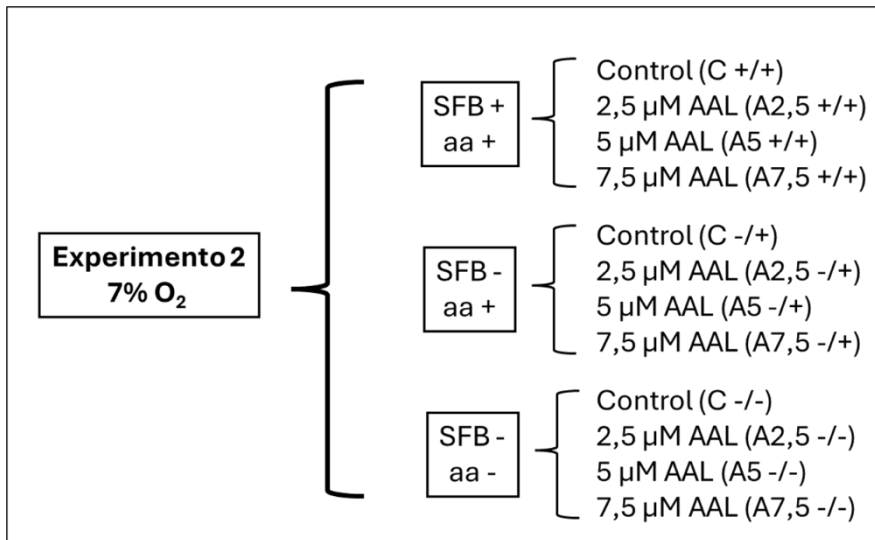


Figura 3.1. Diseño experimental del Experimento 2, y nomenclatura de los tratamientos. (+) indica presencia; (-) indica ausencia. SFB: suero fetal bovino; aa: aminoácidos esenciales y no esenciales.

1.3. Materiales y Métodos

1.3.1. PIV

Para el Experimento 1 y 2, los ovocitos se obtuvieron a partir de ovarios de matadero (Frigorífico Gorina S.A). La MIV y FIV se realizaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado **m.1.1.1** y **m.1.2**. El CIV se realizó teniendo en cuenta el protocolo descrito en el apartado **m.1.3**. El medio de CIV fue suplementado con AAL con las concentraciones mencionadas previamente para ambos experimentos. Para ello, el AAL fue disuelto en etanol, la concentración final de etanol en el cultivo fue menor al 0,1 %. Asimismo, se corroboró que dicha concentración de etanol sea inocua para el cultivo, con cultivos controles y cultivos solo con etanol sin AAL, antes de realizar los experimentos. El medio de CIV de cada tratamiento se reemplazó cada 48 h. Al final de la incubación, se evaluó el estadio morfológico y la competencia de desarrollo embrionario. La primera evaluación se realizó 48 h posteriores a la FIV en donde se registró el clivaje. Los embriones fueron considerados clivados cuando presentaron 2 o más células, no fertilizados cuando el citoplasma se observaba homogéneo, no estaba dividido y la zona pelúcida no tenía alteraciones, y

degenerados cuando presentaban algún tipo de anomalía en su citoplasma o su zona pelúcida estaba rota. Para evaluar el desarrollo embrionario temprano se consideraron los blastocistos que se desarrollaron en los días 6, 7 y 8 de cultivo teniendo en cuenta las características morfológicas descritas por Palma G., (2001) mencionadas en el apartado **m.2.1**. Por último, al día 9 de cultivo se contabilizó la cantidad de embriones que tuvieron la capacidad de eclosionar. Se maduraron entre 75 y 80 COCs por tratamiento por réplica, en grupos de 20-25 COCs. Se realizaron de 3 a 5 réplicas en cada experimento (Experimento 1 y Experimento 2) (cada frigorífico fue considerado una réplica). El clivaje y las tasas de B6, B7 y B8 se calcularon a partir del número total de COCs madurados. Los ovocitos degenerados no se incluyeron en el análisis estadístico. La tasa de eclosión se basó en el número total de blastocistos desarrollados.

Para el Experimento 1, el estatus oxidativo se evaluó mediante la medición de la concentración de proteínas, la peroxidación lipídica, la concentración total de GSH y la actividad de SOD. Se siguió el protocolo descrito en el apartado **m.2.4**. Se utilizó el mismo grupo de blastocistos para todos los parámetros. Las muestras para dichas técnicas se obtuvieron de blastocistos B8 antes de eclosionar. Para cada tratamiento, se realizaron 3 réplicas con un total de 8 blastocistos cada una y se guardaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a -20 °C. Debido a las bajas tasas de blastocistos obtenidas con 100 µM de AAL (A100), el número de blastocistos B8 no fue suficiente para poder evaluar el estatus oxidativo en este grupo experimental. Para el Experimento 2, como parámetro de calidad embrionaria se realizó la contabilización del número total de células, utilizando la tinción de Hoechst 33342 (apartado **m.2.2**) y la tasa de apoptosis, utilizando el ensayo TUNEL (apartado **m.2.7**). En cada tratamiento, se evaluaron al menos 10 embriones por réplica, a menos que el número total de embriones desarrollados disminuyera en determinadas condiciones experimentales (sin SFB y aa).

1.3.2 Análisis estadístico

Se utilizó un enfoque bayesiano con distribución previa normal y no informativa para calcular los intervalos de credibilidad bayesianos del 95 % (ICB 95%). El enfoque estadístico bayesiano se está utilizando de una manera creciente en muchos campos de la ciencia (Lee & Song, 2004; Risso & Risso, 2017; Wade P., 2000). Las tasas de clivaje, blastocisto y eclosión se analizaron con la distribución Beta para la comparación de dos proporciones. Los resultados se expresaron como porcentaje \pm desvío estándar de la media (DE). Para analizar los datos del estatus oxidativo, la concentración de proteínas, TBARS, GSH, SOD, el número de células por blastocisto y de blastómeras apoptóticas se utilizó una comparación bayesiana de dos medias adaptada al enfoque frecuentista de distribución normal. Los ICB se estimaron como diferencia media posterior \pm (1,645 x desviación estándar posterior de la diferencia) unilateralmente. Los resultados se expresaron como media \pm DE. En todos los casos la significancia estadística se estableció en $P \leq 0,05$.

1.4. Resultados

1.4.1. Experimento 1

Los resultados de la evaluación de la competencia de desarrollo se muestran en la **Tabla 1.1**. Las tasas de clivaje fueron mayores en los embriones del grupo C y A5 en comparación con el grupo A100 ($P = 0,05$). No hubo diferencias al comparar el grupo A25 con los grupos C, A5 y A100 ($P > 0,27$). En el día 6 de CIV, hubo un mayor porcentaje de desarrollo de embriones hasta el estadio de blastocisto en el grupo C y A5 en comparación con el grupo A100 ($P < 0,03$), mientras que en el grupo A25 no presentó diferencias significativas con ninguno de los otros grupos ($P > 0,11$). El porcentaje de embriones que se desarrollaron hasta el estadio de blastocisto en los días 7 y 8 del CIV no difirió entre los grupos de tratamiento ($P > 0,33$). Los porcentajes totales de embriones (B6 + B7 + B8) que se desarrollaron hasta la etapa de blastocisto no fueron diferentes en los grupos C y A5 ($P = 0,1$),

sin embargo, fueron menores en A25 y A100 en comparación con el grupo C ($P < 0,01$). Los porcentajes de embriones que eclosionaron fueron mayores en el grupo C, A5 y A25 en comparación con el grupo A100 ($P < 0,03$).

Tabla 1.1. Desarrollo de embriones bovinos *in vitro* cuando el medio de cultivo se suplementó con diferentes concentraciones de AAL (5, 25 y 100 μM) bajo 20 % de O_2 en la atmósfera de cultivo.

Tratamiento	COCs (n)	Clivados	B total	B6	B7	B8	Eclosionados
C	303	240 (79,2 \pm 0,02) ^a	74 (24,5 \pm 0,02) ^a	48 (15,8 \pm 0,02) ^a	12 (3,9 \pm 0,01) ^a	14 (4,7 \pm 0,01) ^a	12 (16,7 \pm 0,01) ^a
A5	326	259 (79,3 \pm 0,02) ^a	62 (18,8 \pm 0,02) ^{ab}	42 (12,6 \pm 0,01) ^a	10 (3,0 \pm 0,00) ^a	10 (3,2 \pm 0,00) ^a	9 (15,0 \pm 0,00) ^a
A25	382	283 (74,0 \pm 0,02) ^{ab}	52 (13,4 \pm 0,01) ^{bc}	37 (10,2 \pm 0,01) ^{ab}	6 (1,7 \pm 0,00) ^a	9 (2,4 \pm 0,00) ^a	8 (16,7 \pm 0,00) ^a
A100	246	168 (68,1 \pm 0,02) ^b	24 (9,5 \pm 0,01) ^c	11 (4,3 \pm 0,01) ^b	6 (2,4 \pm 0,01) ^a	7 (2,8 \pm 0,01) ^a	1 (5,0 \pm 0,00) ^b

Los resultados se expresan como n (% \pm desvío estándar de la media); ^(a-c) Los valores con diferentes superíndices dentro de cada columna difieren ($P \leq 0,05$). COCs (n): número de complejos ovocito-cúmulus madurados; B total: Blastocistos totales. B6: Blastocistos que aparecieron el día 6; B7: Blastocistos que aparecieron el día 7; B8: Blastocistos que aparecieron el día 8.

Los parámetros evaluados del estatus oxidativo se muestran en la **Tabla 1.2**. El contenido total de proteína y el estado oxidativo de los blastocistos no se pudieron evaluar cuando se utilizó la mayor concentración de AAL (A100) debido al bajo número de embriones que se desarrollaron hasta la etapa de blastocisto en estos grupos. La concentración de proteína fue mayor en los blastocistos del grupo A5 que en los grupos C y A25 ($P < 0,04$). La concentración de GSH fue menor en los embriones del grupo A5 en comparación con el grupo C ($P = 0,04$). No hubo diferencias entre los grupos de tratamiento en la actividad de SOD y la concentración de MDA ($P > 0,13$).

Tabla 1.2. Concentración de proteínas, contenido de glutatión total/glutatión oxidado,

actividad de superóxido dismutasa y concentración de malondialdehído en blastocistos de bovino cultivados en medios con diferentes concentraciones de AAL (5, 25 y 100 μM) con 20 % de O_2 en la atmósfera de cultivo.

Tratamiento	Proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	GSH/GSSG (pmol GSH/ μg proteína)	SOD (SOD/ μg proteína)	MDA (nmol MDA/ μg proteína)
C	$0,8 \pm 0,0^a$	$0,4 \pm 0,0^a$	$2,6 \pm 0,0^a$	$4,7 \pm 0,1^a$
A5	$0,9 \pm 0,0^b$	$0,2 \pm 0,1^b$	$2,4 \pm 0,1^a$	$5,0 \pm 0,1^a$
A25	$0,8 \pm 0,0^a$	$0,3 \pm 0,0^{ab}$	$2,6 \pm 0,1^a$	$5,0 \pm 0,1^a$
A100	s/d	s/d	s/d	s/d

Los resultados se expresan como media \pm desvío estándar de la media; ^(a-b) Los valores con diferentes superíndices dentro de cada columna difieren ($P \leq 0,05$). GSH: glutatión; GSSG: glutatión oxidado; SOD: superóxido dismutasa; MDA: malondialdehído; s/d: sin datos.

1.4.2. Experimento 2

Los resultados correspondientes a la capacidad de desarrollo se muestran en la **Tabla 1.3 a., b. y c.** Cuando se utilizó el medio de CIV con SFB y aa, no hubo diferencias en las tasas de clivaje, ni en los B6, B7 y B8. Tampoco se encontró diferencia en el porcentaje total de embriones (B Total) entre los grupos de tratamiento ($P > 0,23$). Los porcentajes de tasas de eclosión de embriones fueron mayores en el grupo C +/+ y A2,5 +/+ en comparación con el grupo A7,5 +/+ ($P < 0,05$).

Los porcentajes de desarrollo de embriones en medio CIV con AAL sin SFB y en medio CIV con AAL sin SFB ni aa no difirieron ($P > 0,1$). De manera similar, las tasas de eclosión de embriones con el uso de medio sin SFB ni aa no difirieron entre los grupos de tratamiento.

Tabla 1.3. Desarrollo embrionario *in vitro* de embriones bovinos cultivados con diferentes concentraciones de AAL (2,5, 5 y 7,5 μM) y tres condiciones diferentes de cultivo, bajo una tensión de O_2 de 7 % en la atmósfera de cultivo.

a.

Tratamiento	COCs (n)	Clivados	B total	B6	B7	B8	Eclosión
C +/+	269	168 (62,4 ± 0,02) ^a	94 (34,9 ± 0,02) ^a	38 (14,1 ± 0,02) ^a	23 (8,7 ± 0,01) ^a	33 (12,1 ± 0,02) ^a	38 (40,4 ± 0,02) ^a
A2,5 +/+	270	162 (60,0 ± 0,02) ^a	80 (29,3 ± 0,02) ^a	36 (13,3 ± 0,02) ^a	13 (4,7 ± 0,01) ^a	31 (11,3 ± 0,02) ^a	36 (45,4 ± 0,02) ^a
A5 +/+	266	178 (66,9 ± 0,02) ^a	62 (23,4 ± 0,02) ^a	38 (14,3 ± 0,02) ^a	12 (4,5 ± 0,01) ^a	12 (4,5 ± 0,01) ^a	24 (38,9 ± 0,02) ^{ab}
A7,5 +/+	263	161 (61,3 ± 0,02) ^a	74 (28,0 ± 0,02) ^a	40 (15,3 ± 0,02) ^a	2 (0,7 ± 0,00) ^a	32 (12,0 ± 0,02) ^a	16 (21,4 ± 0,01) ^b

b.

Tratamiento	COCs (n)	Clivados	B total	B6	B7	B8	Eclosión
C -/+	252	191 (75,6 ± 0,02) ^a	68 (27,7 ± 0,02) ^a	23 (8,9 ± 0,01) ^a	24 (10,4 ± 0,01) ^a	21 (8,4 ± 0,01) ^a	30 (43,0 ± 0,02) ^a
A2,5 -/+	268	205 (76,4 ± 0,02) ^a	56 (20,9 ± 0,02) ^a	10 (3,6 ± 0,01) ^a	19 (7,3 ± 0,01) ^a	27 (10,0 ± 0,01) ^a	24 (43,6 ± 0,01) ^a
A5 -/+	252	196 (77,1 ± 0,02) ^a	57 (22,8 ± 0,02) ^a	4 (1,5 ± 0,00) ^a	19 (7,6 ± 0,01) ^a	34 (13,7 ± 0,02) ^a	19 (32,6 ± 0,01) ^a
A7,5 -/+	254	193 (75,9 ± 0,02) ^a	54 (21,2 ± 0,02) ^a	4 (1,5 ± 0,00) ^a	18 (6,9 ± 0,01) ^a	32 (12,8 ± 0,02) ^a	15 (27,1 ± 0,01) ^a

c.

Tratamiento	COCs (n)	Clivados	B total	B6	B7	B8	Eclosión
C -/-	230	150 (65,4 ± 0,03) ^a	47 (20,6 ± 0,02) ^a	6 (2,8 ± 0,01) ^a	22 (9,3 ± 0,01) ^a	19 (8,4 ± 0,01) ^a	0 (0,0 ± 0,00) ^a
A2,5 -/-	230	181 (78,8 ± 0,02) ^a	23 (10,2 ± 0,01) ^a	2 (0,8 ± 0,00) ^a	9 (4,2 ± 0,01) ^a	12 (5,1 ± 0,01) ^a	0 (0,0 ± 0,00) ^a
A5 -/-	230	179 (78,0 ± 0,02) ^a	24 (10,5 ± 0,02) ^a	7 (3,1 ± 0,01) ^a	10 (4,2 ± 0,01) ^a	7 (3,5 ± 0,01) ^a	0 (0,0 ± 0,00) ^a
A7,5 -/-	230	156 (67,9 ± 0,03) ^a	15 (6,4 ± 0,01) ^a	0 (0,0 ± 0,00) ^a	4 (1,8 ± 0,00) ^a	11 (4,6 ± 0,01) ^a	0 (0,0 ± 0,00) ^a

Los resultados se expresan como n (% ± desvío estándar de la media); ^(a-b) Los valores con diferentes superíndices dentro de cada columna difirieron en comparación con los tratamientos con la misma condición ($P \leq 0,05$). COCs (n): número de complejos ovocito-cúmulus madurados; B total: Blastocistos totales. B6: Blastocistos al día 6; B7: Blastocistos al día 7; B8: Blastocistos al día 8. +/+ : medio con SFB y aa; -/+ : medio con SFB sin aa; +/- : medio sin SFB y con aa; -/- : medio sin SFB sin aa.

En la **Tabla 1.4 a., b. y c.** se presentan los resultados del número total de células por blastocisto y los índices de apoptosis. El número total de células del blastocisto

fue mayor en los embriones del grupo A2,5+/+ en comparación con los otros grupos de tratamiento ($P < 0,02$). Cuando se utilizó el medio CIV completo, el número de blastómeras en los embriones fue menor en el siguiente orden descendente: A2,5+/+ > C+/+ > A5 +/+ > A7,5+/+. Cuando se utilizó el medio de cultivo sin SFB y con aa, el número de células de blastocisto fue mayor en el grupo C -/+ y A2,5 -/+ que en el grupo A5 -/+ ($P < 0,04$). Cuando se utilizó el medio de cultivo sin SFB ni aa, los embriones del grupo C -/- tuvieron el mayor número de células de blastocisto ($P < 0,02$). Los resultados obtenidos con el uso del ensayo TUNEL indicaron que el índice de células apoptóticas en el medio completo fue similar en todos los grupos de tratamiento ($P > 0,58$). Cuando se utilizó el medio sin SFB y con aa, el índice apoptótico fue menor en el grupo C -/+ y A2,5 -/+ en comparación con el grupo A5 -/+ y A7,5 -/+ ($P < 0,04$) (**Figura 3.2**). Cuando se utilizó el medio de cultivo sin SFB ni aa, no hubo diferencias en el índice de células apoptóticas entre los tratamientos ($P > 0,28$).

Tabla 1.4. Número total de células e índice de apoptosis (TUNEL) en blastocistos bovinos cultivados *in vitro* en medio suplementado con diferentes concentraciones de AAL (2,5, 5 y 7,5 μ M) cuando había una concentración del 7 % de O₂, con (+) o sin (-) SFB/aa.

a.

Tratamiento	Blastocistos (n)	Número total de células	Índice de apoptosis
C+/+	33	63,1 \pm 4,70 ^a	0,1 \pm 0,00 ^a
A2,5 +/+	30	75,7 \pm 5,50 ^b	0,1 \pm 0,00 ^a
A5 +/+	24	51,1 \pm 3,69 ^c	0,2 \pm 0,00 ^a
A7,5 +/+	26	46,5 \pm 2,88 ^c	0,1 \pm 0,00 ^a

b.

Tratamiento	Blastocistos (n)	Número total de células	Índice de apoptosis
C-/+	37	74,8 ± 3,40 ^a	2,0 ± 0,50 ^a
A2,5 -/+	34	73,7 ± 4,86 ^a	3,5 ± 0,96 ^a
A5 -/+	35	61,6 ± 3,76 ^b	5,6 ± 0,18 ^b
A7,5 -/+	39	67,2 ± 4,19 ^{ab}	7,5 ± 1,01 ^c

c.

Tratamiento	Blastocistos (n)	Número total de células	Índice de apoptosis
C-/-	14	37,6 ± 4,02 ^a	18,4 ± 2,48 ^a
A2,5 -/-	8	27,2 ± 2,91 ^b	23,5 ± 2,89 ^a
A5 -/-	10	28,2 ± 3,01 ^b	21,6 ± 1,62 ^a
A7,5 -/-	8	29,7 ± 3,06 ^b	22,2 ± 2,91 ^a

Los resultados se expresan como media ± desvío estándar de la media; ^(a-c) Los valores con diferentes superíndices dentro de cada columna difirieron en comparación con los tratamientos con la misma condición ($P \leq 0,05$). El índice apoptótico (células apoptóticas/número total de células) se calculó mediante el número total de blastómeros. +/+ : medio con SFB y aa; -/+ : medio con SFB sin aa; +/- : medio sin SFB y con aa; -/- : medio sin SFB sin aa.

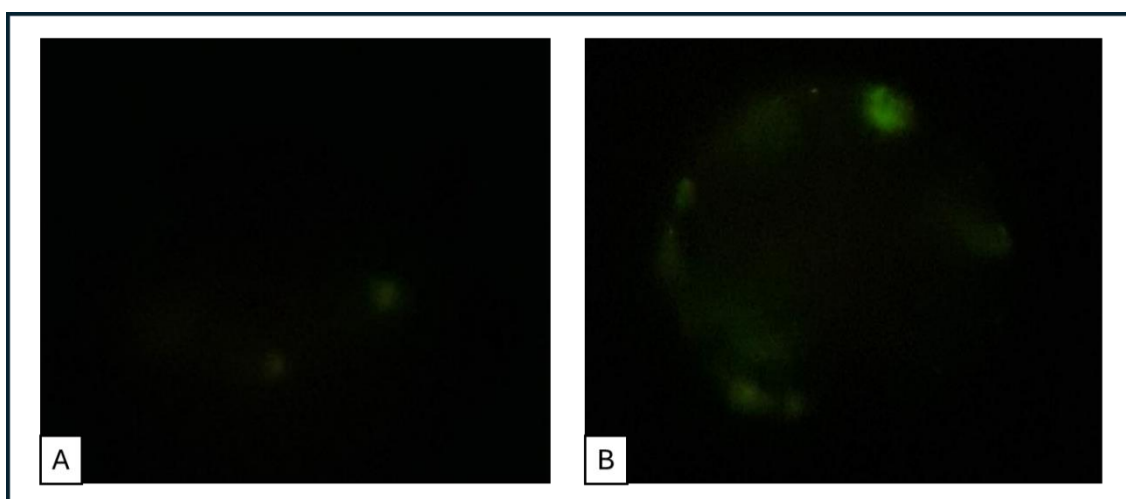


Figura 3.2. Fotografías de blastocistos con la tinción del ensayo TUNEL. A: Foto representativa del tratamiento A2,5 -/+. B: Foto representativa del tratamiento A7,5 -/+. Solo se visualizan las células apoptóticas (verde). Fotos propias Lic. Fabra M.

1.5. Conclusión

El efecto de la suplementación con AAL en el medio de CIV para embriones bovinos depende de la concentración utilizada de AAL y las condiciones de cultivo. Así, cuando había 20 % de O₂ en la atmósfera de cultivo, la suplementación con 5 µM de AAL resultó en una mayor concentración de proteína embrionaria, mientras que las suplementaciones de 25 y 100 µM de AAL resultaron en una menor producción de embriones. Cuando había 7 % de O₂ en la atmósfera de cultivo, la suplementación con 2,5 µM de AAL resultó en un mayor número total de células en los blastocistos, y la suplementación con 7,5 µM de AAL resultó en una menor tasa de eclosión. La actividad de AAL podría verse afectada por la presencia o ausencia de aa o SFB en el medio. Se sugiere que las concentraciones relativamente altas de AAL utilizadas en este ensayo tuvieron efectos perjudiciales en el desarrollo del embrión bovino, independientemente de la concentración de O₂ en la atmósfera de cultivo. Sin embargo, la suplementación con 2,5 o 5 µM de AAL en el medio de CIV podrían tener efectos beneficiosos sobre la calidad de los embriones.

2. Capítulo 2

Objetivo 2: Estudiar el efecto de la mejor condición de cultivo *in vitro* (CIV) obtenida en el Objetivo 1 en una etapa clave del desarrollo embrionario temprano, evaluando la capacidad de desarrollo, estado antioxidante y calidad de los embriones obtenidos a partir de ovocitos de ovarios de frigorífico.

2.1. Introducción

La calidad de los embriones producidos *in vitro* es menor en comparación con los producidos *in vivo*. Además, se ha establecido que el ambiente de cultivo posterior a la fecundación tiene un gran impacto en la calidad del embrión bovino (Dissanayake et al., 2020; Lonergan P., 2007). En el CIV, las demandas cambiantes del embrión en desarrollo no se cumplen de forma sincrónica con la composición de los medios. En consecuencia, los embriones sufren alteraciones ultraestructurales, compactación limitada en la etapa de mórula y menor criotolerancia (Rizos et al., 2002; Thompson J., 1997; Havlicek et al., 2010). La etapa de cultivo post-fecundación es crucial en el proceso de la producción *in vitro* (PIV) de embriones, ya que las alteraciones más frecuentes se producen entre las etapas de 2 células y de blastocisto (Hansen 2014; Lonergan & Fair, 2014). Varios eventos claves ocurren entre la formación del cigoto y el blastocisto: i) la primera división mitótica; ii) la activación mayor del genoma embrionario en la etapa de 8 a 16 células; iii) la compactación de la mórula al día 5; iv) la formación de blastocisto en el día 6-7. Por lo tanto, cualquier modificación de las condiciones de cultivo durante los 6 días posteriores a la fecundación, que afecte a uno o todos estos procesos, tendrá una gran influencia en la calidad del embrión (Lonergan et al., 1999; Memili & First, 2000; van Soom et al., 1997; Watson 1992). Teniendo en

cuenta estos eventos, la suplementación de antioxidantes en ventanas específicas del desarrollo embrionario temprano, arrojaría datos significativos sobre los efectos específicos de dichos antioxidantes en las necesidades metabólicas del embrión en desarrollo. Sun et al., (2021), administraron N-acetil-L-cisteína en tres ventanas distintas de CIV de embriones bovinos, dando como resultado la disminución del daño oxidativo y de la apoptosis. Por su parte, Takashani et al., (2002) suplementaron con β -mercaptoetanol el medio de cultivo de embriones bovinos en distintos estadios (1 célula, 8 células, mórula y blastocisto) lo que generó un efecto protector en el desarrollo embrionario contra el estrés oxidativo y promovió la captación de cistina, aminoácido que tiene baja disponibilidad en los embriones. Dado que la PIV es una biotecnología eficaz y eficiente, los métodos para el almacenamiento criogénico de embriones están adquiriendo una relevancia práctica cada vez mayor en todo el mundo (Ferré et al., 2020). Paralelamente, las mejoras en la vitrificación, tanto en la variedad de recipientes criogénicos como en los diversos protocolos, han avanzado significativamente. Sin embargo, para tener éxito en la criopreservación, es preciso obtener embriones de buena calidad y para ello es necesario perfeccionar las técnicas de cultivo de laboratorio (Do et al., 2019). En este contexto, nuevamente, el uso estratégico de antioxidantes en diversas etapas del CIV puede desempeñar un papel clave al mitigar el estrés oxidativo y preservar la viabilidad celular durante el proceso, contribuyendo así a la optimización de la criopreservación de embriones. Para el comercio internacional las recomendaciones de la IETS indican que solo se deben utilizar embriones de Grado 1. En este sentido, la criopreservación de embriones de excelente y buena calidad producen las tasas de preñez más altas y si bien, los embriones criopreservados de calidad regular y mala también se transfieren a receptoras sincronizadas, las tasas de preñez son muy bajas (Hasler et al., 1987). Se ha demostrado que la vitrificación de ovocitos y embriones altera el estado óxido-reducción, reduce el contenido intracelular de glutatión (GSH) y aumenta los niveles

de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Caamaño et al., 2015; Chang et al., 2022; Zhao et al., 2011). Conjuntamente, la reparación del daño crioinducido en la estructura y función celular implica la generación de energía, lo que conduce a una mayor producción de EROs (Dowling & Simmons, 2009; Tatone et al., 2010). Además, la vitrificación de ovocitos y blastocistos disminuye el potencial de membrana, e induce alteraciones en la función y distribución mitocondrial (Amoushahi et al., 2013; Lei et al., 2014; Nohales-Corcoles et al., 2016). Efectivamente, a mejor calidad embrionaria mayor será la resistencia a los efectos adversos de la vitrificación (Asgari et al., 2012). Está documentado que la suplementación con antioxidantes como el β -mercaptoetanol, tanto en el cultivo como en el calentamiento posterior a la vitrificación, tiene beneficios en la competencia de desarrollo y en la calidad de los embriones bovinos (Hosseini et al., 2009). A su vez, la suplementación con resveratrol en el medio de vitrificación restaura el contenido de GSH en embriones bovinos (Gaviria et al., 2019). Con respecto a la suplementación con ácido alfa lipoico (AAL), su concentración es un factor crucial para obtener efectos beneficiosos o perjudiciales sobre los blastocistos bovinos. Tal como fue demostrado en el capítulo anterior, se evidenció que durante el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos, el agregado de 2,5 μ M de AAL desde el comienzo hasta la finalización del CIV aumenta el número total de células por blastocisto, mientras que el agregado de 7,5 μ M de AAL disminuye la tasa de eclosión.

Diversos estudios han demostrado que los embriones *in vitro* muestran un pico de producción de EROs en las etapas de 2 a 4 células (Betts & Madan, 2008). Además, en esta ventana se genera una menor cantidad de antioxidantes (Nasr-Esfahani & Johnson, 1991) y es aquí donde hay una activación menor del genoma embrionario (mAGE) (Rabaglino et al., 2023). Por lo tanto, el objetivo del presente capítulo fue evaluar el efecto antioxidante de 2,5 μ M AAL durante las primeras 24 h de CIV

(mAGE) sobre la calidad y la competencia de desarrollo del embrión bovino. Además, se investigó su efecto sobre la criotolerancia por vitrificación.

2. 2. Diseño experimental

Para llevar a cabo el objetivo planteado se diseñó un experimento dividido en tres etapas (**Figura 2.1**). Los tratamientos fueron: 1) Control (C): medio de CIV con 0 μ M AAL; 2) AAL: medio de CIV con 2,5 μ M.

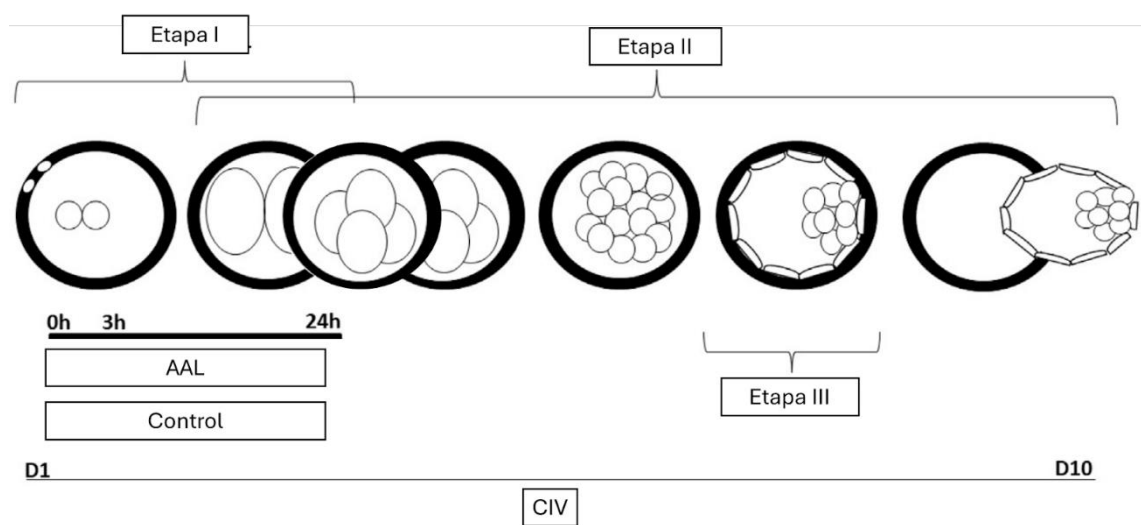


Figura 2.1 Diagrama representativo que indica el momento de evaluación en cada una de las etapas del desarrollo embrionario. D1: día 1 de CIV; D10: día 10 de CIV.

Etapa I: Efecto del AAL sobre la viabilidad y la producción de EROs en presuntos cigotos y embriones clivados en el día 2 de CIV.

Se investigó el efecto antioxidante de 2,5 μ M AAL en el desarrollo embrionario temprano mediante su suplementación en el medio de CIV. Se evaluaron la viabilidad y la producción de EROs en presuntos cigotos a las 3 h de tratamiento (Jian et al., 2019), y en embriones clivados a las 24 h de tratamiento (Maruri et al., 2018). Después de la FIV, los presuntos cigotos se desnudaron mediante agitación mecánica y se cultivaron en medio de CIV suplementado con 2,5 μ M AAL durante 3 h. Cumplido ese tiempo, se seleccionaron de forma aleatoria la mitad de los

presuntos cigotos (Grupo 1) con el propósito de evaluar la viabilidad y la producción de EROs. Los cigotos restantes se mantuvieron en cultivo con 2,5 μ M AAL durante 24 h (Grupo 2) con la finalidad de evaluar la viabilidad y la producción de EROs 48 h post-FIV (**Figura 2.2**). Los niveles de EROs se evaluaron utilizando la tinción H2DCFDA, y la viabilidad se determinó con la técnica de FDA.

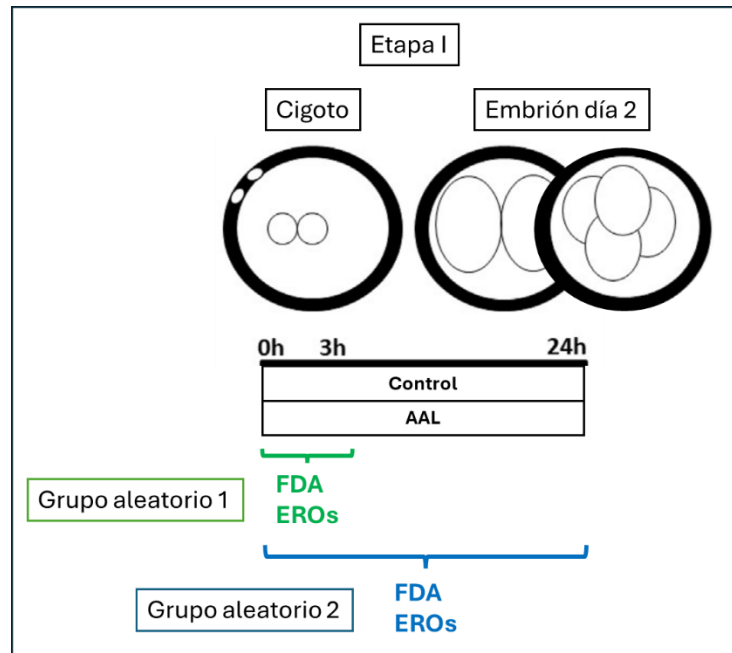


Figura 2.2. Diseño experimental de la Etapa I. Los cigotos recibieron la suplementación de 2,5 μ M AAL durante las primeras 3 h de CIV, y luego un grupo aleatorio se seleccionó para evaluar los niveles de EROs y la viabilidad (Grupo aleatorio 1). El grupo restante (Grupo aleatorio 2) continuó su desarrollo durante 24 h, evaluándose luego los niveles de EROs y viabilidad.

Etapa II: Efecto de AAL sobre la competencia de desarrollo y la calidad embrionaria.

Se evaluó el efecto de la suplementación de 2,5 μ M AAL, durante las primeras 24 h de CIV, sobre la cinética de desarrollo y la calidad embrionaria. Finalizado el tratamiento, se registraron las tasas de: a) clivaje a las 48 h post-FIV, b) blastocistos al día 7 (B7) y 8 (B8) de cultivo, c) blastocistos totales (BT) y d) blastocistos eclosionados en los días 8 y 9. Además, se determinó el número total de células por

embrión en B8 con Hoechst 33342 siguiendo el protocolo descrito en el apartado **m.2.3** de Materiales y Métodos General.

Etapa III: Efecto de AAL sobre la criotolerancia embrionaria.

Para medir este efecto, se suplementó AAL durante las primeras 24 h en medio CIV. Se registraron los grados de calidad de B7 y B8, y luego se vitrificaron solo los blastocistos de Grado 1. Después del calentamiento, se evaluó la reexpansión a las 3 h y la tasa de eclosión a las 24, 48 y 72 h. También se evaluó la producción de EROs en embriones calentados (**Figura 2.3**).

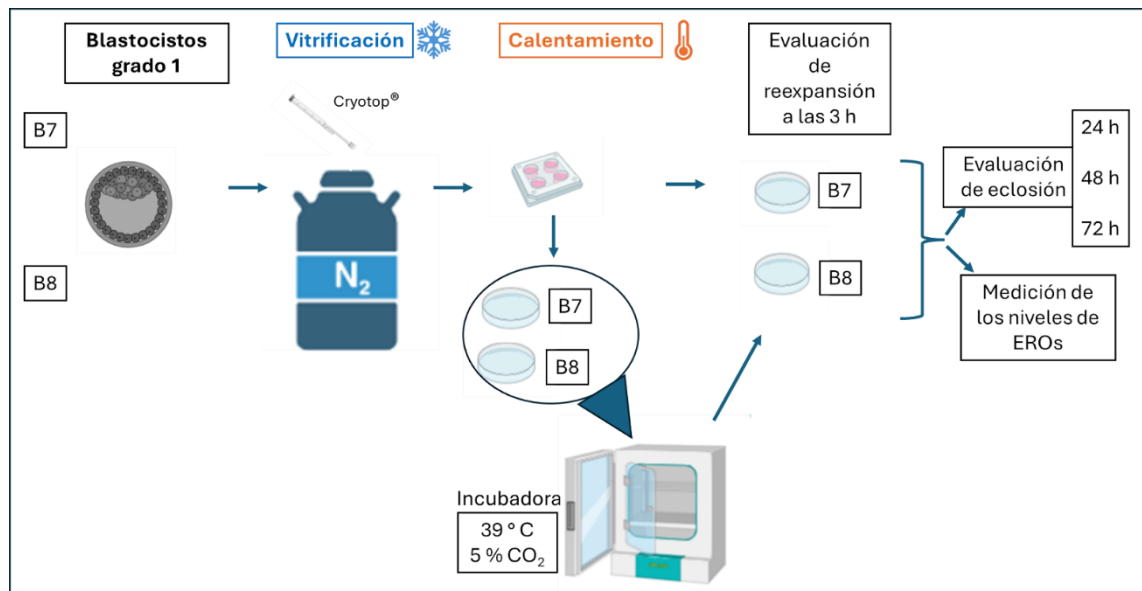


Figura 2.3. Diagrama representativo que ilustra la Etapa III. Solo los blastocistos Grado 1, al día 7 y día 8 de CIV, fueron vitrificados. Luego, en la etapa de calentamiento se evaluó la reexpansión a las 3 h, y se dividió aleatoriamente a los blastocistos en dos grupos. En un grupo se registró la eclosión a las 24, 48 y 72 h, y en el otro grupo se evaluó los niveles de EROs tanto de los blastocistos día 7 (B7) como los del día 8 (B8). Creado con BioRender.

2.3. Materiales y Métodos

2.3.1. PIV

La etapa de maduración *in vitro* (MIV) se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado **m.1.1**. Grupos de 20 a 25 complejos cúmulus ovocito (COCs) se transfirieron a 100 μ L de medio MIV bajo aceite mineral y se maduraron durante 24 h. La etapa de fecundación *in vitro* (FIV) se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado **m.1.2**. El CIV se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado **m.1.3**.

En la Etapa I, se maduraron un total de 30 a 40 COCs por tratamiento, por réplica y por ensayo. Se realizaron tres réplicas para cada ensayo. Cada frigorífico se consideró una réplica. Todos los presuntos cigotos y los embriones de día 2 fueron analizados, a excepción de aquellos degenerados, así como los ovocitos no fertilizados. Los niveles de EROs se evaluaron utilizando la tinción H2DCFDA (**apartado m.2.5**), y la viabilidad se determinó con la técnica FDA (**apartado m.2.3**). La combinación de dos ensayos se realizó siguiendo los criterios propuestos por Lane et al. (Lane et al., 2002).

En la Etapa II, se maduraron un total de 95 a 100 COCs por tratamiento por réplica. Los tratamientos se repitieron en seis réplicas. Se consideró cada frigorífico una réplica. Los blastocistos obtenidos se dividieron homogéneamente en dos grupos. En el grupo uno, se determinó la tasa de eclosión total de blastocistos en los días 8 y 9. En el grupo dos, se evaluaron el número total de células con Hoechst 33342 (**apartado m.2.2**), al menos 20 a 30 blastocistos B8 por tratamiento.

En la Etapa III, se maduraron un total de 323 a 341 COCs por tratamiento por réplica. Los tratamientos se repitieron en 2 a 5 réplicas. La técnica de vitrificación y calentamiento se realizó según el protocolo descrito en el apartado **m.2.8**. Se evaluó la reexpansión a las 3 h, luego los blastocistos fueron divididos aleatoriamente en dos grupos. Un grupo fue utilizado para evaluar la eclosión a las 24 , 48 y 72 h, y el otro grupo se utilizó para analizar los niveles intracelulares de EROs. Se repitieron los mismos pasos tanto para blastocistos vitrificados al día 7 como de día 8 de CIV.

2.3.2. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se utilizó el software RStudio. Los datos fueron analizados utilizando un enfoque estadístico Bayesiano, con distribución previa normal y no informativa, para calcular los Intervalos de Credibilidad Bayesianos del 95 %. Los intervalos de credibilidad se estimaron como diferencia posterior media (Mpd) \pm (1,645 x desviación estándar posterior (Depd) de la diferencia) unilateralmente. Los datos de clivaje, B7, B8, BT, tasas de eclosión y vitrificación se analizaron con la distribución Beta para la comparación de dos proporciones. El número total de células del blastocisto, la viabilidad y los niveles de EROs se analizaron utilizando comparación bayesiana de dos medias, adaptados al enfoque frecuentista de distribución normal. Los valores $P \leq 0,05$ se consideraron significativos y los valores $P \leq 0,1$ se consideraron como una tendencia.

2.4. Resultados

2.4.1. Etapa I: Efecto del AAL sobre la viabilidad y la producción de EROs en presuntos cigotos y embriones clivados en el día 2 de CIV.

Los resultados de esta etapa se muestran en la **Tabla 2.1**. En los presuntos cigotos, no se hallaron diferencias significativas en la viabilidad y la producción intracelular de EROs entre el grupo C y AAL ($P = 0,22$; $P = 0,15$ respectivamente). De manera similar, no hubo diferencias significativas entre C y AAL en embriones clivados al día 2 ($P = 0,17$; $P = 0,30$, respectivamente) (**Figura 2.4**).

Tabla 2.1 Efecto de 2,5 μ M AAL suplementado durante 3 y 24 h en el CIV de embriones bovinos. Evaluación de la viabilidad y los niveles intracelulares de EROs en presuntos cigotos y en embriones clivados.

Tratamiento	Presuntos cigotos			Embriones día 2		
	Viabilidad %	Nivel EROs %	EROs/FDA %	Viabilidad %	Nivel EROs %	EROs/FDA %
	UAF (n)	UAF (n)		UAF (n)	UAF (n)	
C	38,60 ± 3,24 (62) ^a	23,88 ± 2,89 (81) ^a	0,61 ^a	106,55 ± 12,64 (47) ^a	21,22 ± 1,62 (53) ^a	0,19 ^a
AAL	35,27 ± 2,91 (51) ^a	19,83 ± 2,64 (83) ^a	0,56 ^a	122,79 ± 12,28 (61) ^a	20,08 ± 1,58 (79) ^a	0,16 ^a

Los resultados fueron expresados como % unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) ± desvío estándar. n: número de presuntos cigotos o embriones de día 2 analizados. La viabilidad fue medida con el ensayo de FDA. Los niveles de EROs fueron medidos con la tinción H2DCFDA.^(a-b) Los superíndices que difieren dentro de cada columna indican diferencia ($P \leq 0,05$).

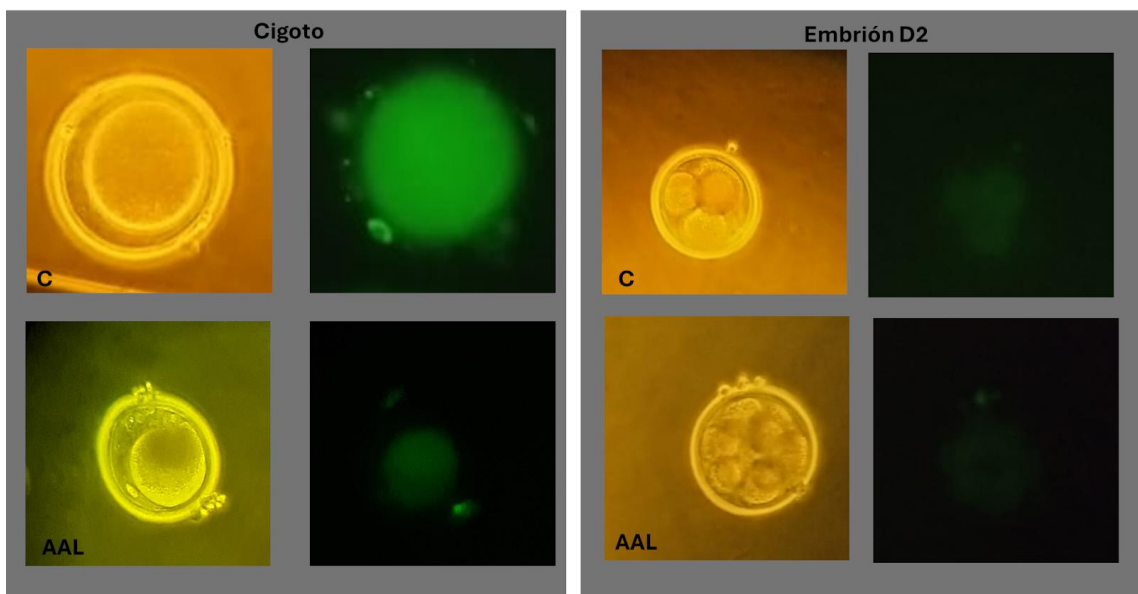


Figura 2.4. Fotografías de cigotos y embriones día 2 (D2) bovinos evaluados con la técnica de H2DCFDA. El lado izquierdo de cada panel corresponde a los cigotos con visualización sin filtro de luz UV, y el lado derecho de cada panel corresponde a los cigotos con visualización con filtro de luz UV (H2DCFDA). Fotos propias Lic. Fabra M.

2.4.2. Etapa II: Efecto de AAL sobre la competencia de desarrollo y la calidad embrionaria.

Los resultados de esta etapa se muestran en la **Tabla 2.2**. No hubo diferencias significativas en las tasas de clivaje de 2-4 células ($P = 0,37$) y >4 células ($P = 0,10$) en el grupo C con respecto a AAL. Los resultados mostraron que la tasa de BT aumentó significativamente en el grupo AAL con respecto al C ($P = 0,01$) debido a un aumento en la tasa de B7 ($P = 0,002$). Por otro lado, la tasa de B8 no difirió entre tratamientos ($P = 0,22$). Como parámetro de calidad, se evaluó la tasa de eclosión y el número total de células por blastocisto al día 8 de CIV. Los resultados de eclosión se expresaron como porcentaje sobre los BT observados. La tasa de eclosión fue mayor en AAL con respecto a C ($P = 0,02$).

Tabla 2.2. Efecto de 2,5 μ M AAL suplementado durante el CIV de embriones bovinos sobre la competencia de desarrollo.

Tratamiento	COC (n)	% (n)										% (e/b)	
		Clivados 2-4 células		Clivados >4 células		B7		B8		BT		Eclosionados	
C	567	49,41 (281) ^a	Mpd= 0,00 Depd=0,02 P = 0,37	34,14 (189) ^a	Mpd= -0,03 Depd=0,02 P = 0,10	19,38 (108) ^a	Mpd= 0,06 Depd=0,02 P < 0,00	5,51 (35) ^a	Mpd= -0,01 Depd=0,01 P = 0,22	24,90 (143) ^a	Mpd= 0,05 Depd=0,02 P = 0,01	37,5 (12/32) ^a	Mpd= 0,20 Depd= 0,10 P = 0,02
AAL	546	49,65 (276) ^a		30,86 (163) ^a		25,72 (142) ^b		4,07 (28) ^a		29,79 (170) ^b		59,57 (28/47) ^b	

Valores expresados como la media. Mpd: Media posterior de la diferencia. Depd: desvío estándar posterior de la diferencia. (e/b): eclosionados/blastocistos. ^(a-b) Los superíndices que difieren dentro de cada columna indican diferencia ($P \leq 0,05$).

Cuando se evaluó el número total de células por blastocistos, este parámetro fue mayor en AAL con respecto a C ($P = 0,05$) (**Tabla 2.3**) (**Figura 2.5**).

Tabla 2.3. Efecto de 2,5 μ M AAL durante el CIV sobre el número total de células de blastocistos día 8.

Tratamiento	Número total de células (n)	
C	54,62 ± 3,73 (30) ^a	Mpd = -9,76 Depd= 6,06 P = 0,05
AAL	64,39 ± 4,77 (20) ^b	

C: Control. AAL: 2,5 µM AAL. Valores expresados como la media ± desvío estándar (n). Mpd: media posterior de la diferencia. Depd: desvío estándar posterior de la diferencia. ^(a-b) Los superíndices que difieren dentro de cada columna indican diferencia ($P \leq 0,05$).

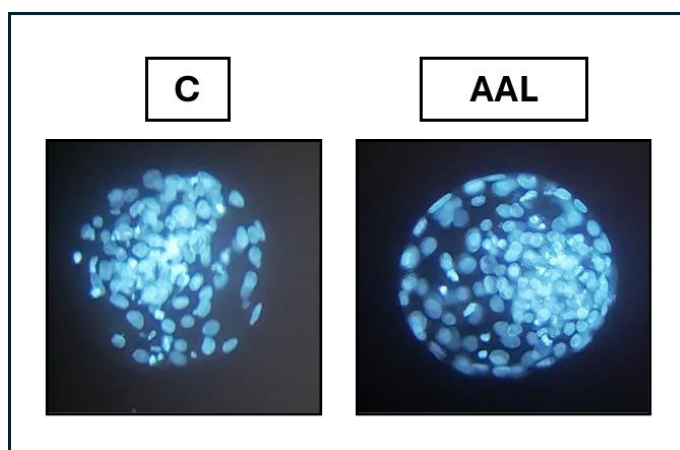


Figura 2.5. Fotografías de blastocistos con tinción de Hoechst 33342. **C:** Control; **AAL:** 2,5 µM AAL 24 h. Fotos propias Lic. Fabra M.

2.4.3. Etapa III: Efecto de AAL sobre la criotolerancia embrionaria.

La etapa III demostró que la mejor calidad embrionaria (embriones de Grado 1) se observó en el grupo AAL en comparación con el grupo C, con una diferencia estadísticamente significativa al día 7 ($P = 0,001$) y una tendencia al día 8 ($P = 0,06$). No se observaron diferencias significativas entre tratamientos cuando se evaluó el Grado 2 al día 7 ($P = 0,42$) y al día 8 ($P = 0,26$) de cultivo, pero sí en la totalidad de blastocistos ($P = 0,00003$) (**Tabla 2.4**).

Tabla 2.4. Efecto de la suplementación de 2,5 µM AAL durante el CIV sobre los grados de calidad de blastocistos bovinos al día 7 (B7) y día 8 (B8) de cultivo, y sobre el total de blastocistos.

	Tratamiento	COCs (n)	Calidad de blastocistos %			
			1		2	
B7	C	323	2,16 ^a	Mpd= 0,04 Depd= 0,01 P= 0,001	4,64 ^a	Mpd= 0,003 Depd= 0,01 P= 0,42
	AAL	341	7,03 ^b		4,98 ^a	
B8	C	323	1,54 ^a	Mpd= 0,01 Depd= 0,01 P= 0,06	8,66 ^a	Mpd= -0,01 Depd= 0,02 P= 0,26
	AAL	341	3,51 [*]		7,33 ^a	
Total	C	323	3,71 ^a	Mpd= 0,08 Depd= 0,02 P < 0,000	13,31 ^a	Mpd= -0,01 Depd= 0,02 P= 0,35
	AAL	341	12,02 ^b		12,31 ^a	

Valores expresados como la media. Mpd: media posterior de la diferencia. Depd: desvío estándar posterior de la diferencia.^(a-b) Los superíndices que difieren dentro de cada columna indican diferencia ($P \leq 0,05$). ^(*) Indica tendencia ($P \leq 0,1$).

El total de los embriones vitrificados al día 7 y al día 8 se muestran en la **Tabla 2.5**. Se observa un aumento en el total de los embriones vitrificados al día 7 en el tratamiento con AAL con respecto a C, con una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,01$). En la misma tabla se muestran los porcentajes de re-expansión embrionaria posterior al calentamiento, la tasa de eclosión y los niveles intracelulares de EROs tanto de B7 como B8. Las tasas de re-expansión evaluadas 3 h posteriores al calentamiento no difirieron significativamente en B7 ni B8. No se observaron diferencias significativas en la tasa de eclosión evaluadas a las 24 h entre AAL y C. Sin embargo, las tasas de eclosión fueron mayores en C a las 48 h en B7 ($P = 0,05$) y B8 ($P = 0,03$). La tasa de eclosión evaluada a las 72 h fue estadísticamente significativa en C con respecto a AAL en B8 ($P = 0,05$).

Tabla 2.5. Efecto de la suplementación de 2,5 μ M AAL durante el CIV sobre las tasas de re-expansión de blastocistos bovinos vitrificados/calentados al día 7 (B7) y día 8 (B8) de cultivo, y sobre el total de blastocistos.

	Tratamiento	Vitrificados (n)		Expandidos % (n)		Eclósión % (n)						
				3 h		Embriones (n)		24 h		48 h		72 h
B7	C	22	Mpd= 0,05 Depd= 0,02 P= 0,01	68,18 (15) ^a	Mpd= -0,04 Depd= 0,12 P= 0,35	11	18,18 (2) ^a	Mpd= -0,08 Depd= 0,14 P= 0,27	54,54 (6) ^a	Mpd= -0,26 Depd= 0,16 P= 0,05	9,00 (1) ^a	Mpd= -0,06 Depd= 0,16 P= 0,28
	AAL	41		62,85 (22) ^a		21	30,00 (6) ^a		25,00 (5) ^b		5,00 (1) ^a	
B8	C	33	Mpd= 0,00 Depd= 0,02 P= 0,39	81,25 (26) ^a	Mpd= -0,00 Depd= 0,09 P= 0,48	17	29,41 (5) ^a	Mpd= -0,11 Depd= 0,14 P= 0,22	29,41 (5) ^a	Mpd= -0,22 Depd= 0,12 P= 0,03	17,64 (3) ^a	Mpd= -0,16 Depd= 0,10 P= 0,05
	AAL	37		80,55 (29) ^a		19	42,10 (8) ^a		5,20 (1) ^b		0,00 (0) ^b	
Total	C	55	Mpd= 0,05 Depd= 0,03 P= 0,03	74,54 (41) ^a	Mpd= -0,08 Depd= 0,07 P= 0,13	28	25,00 (7) ^a	Mpd= 0,09 Depd= 0,10 P= 0,20	28,28 (11) ^a	Mpd= -0,23 Depd= 0,10 P= 0,01	14,28 (4) ^a	Mpd= -0,11 Depd= 0,07 P= 0,05
	AAL	78		65,38 (51) ^a		40	35,00 (14) ^a		15,00 (6) ^b		2,50 (1) ^b	

Los resultados de las tasas de re-expansión y eclósión son expresados como porcentaje (n) y se expresan con respecto a los embriones evaluados. Mpd: media posterior de la diferencia. Depd: desvío estándar posterior de la diferencia. ^(a-b) Los superíndices que difieren dentro de cada columna indican diferencia ($P \leq 0,05$).

Las evaluaciones de re-expansión y cinética de eclósión de los blastocistos se observan en la **Figura 2.6**. En la evaluación de reexpansión a las 3 h, aquellos blastocistos considerados expandidos fueron los que recuperaron en ese tiempo la cavidad del blastocele, diferenciándose además el macizo celular interno y el trofoectodermo.

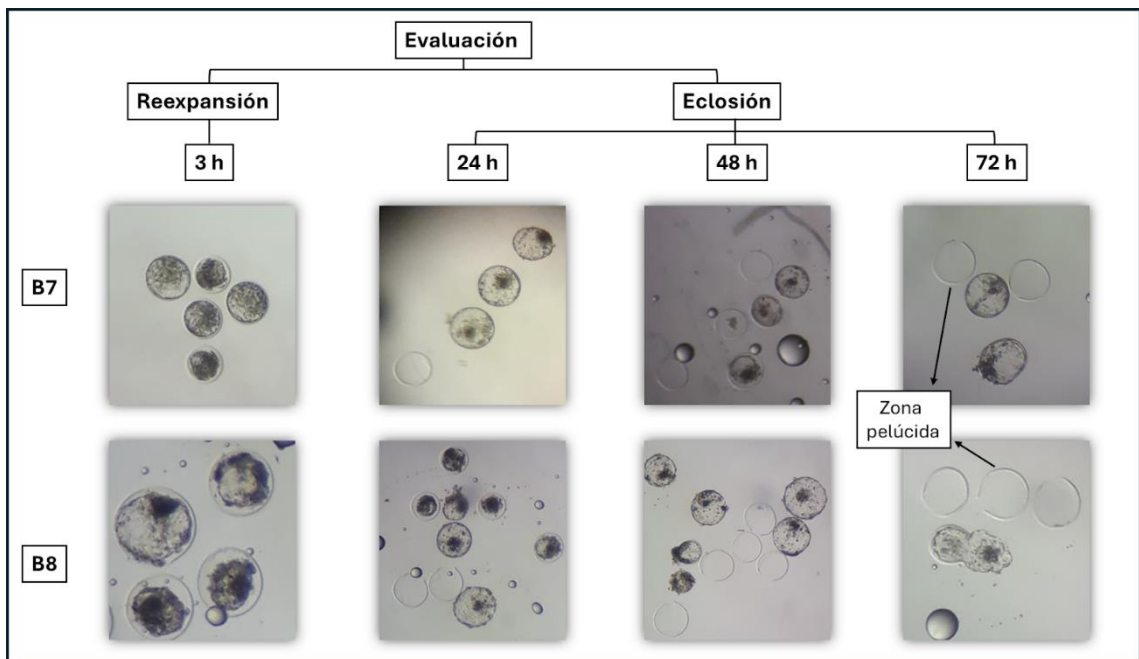


Figura 2.6. Fotografías de embriones vitrificados al día 7 (B7) y 8 (B8) de cultivo y luego calentados para evaluar reexpansión a las 3 h y eclosión a las 24, 48 y 72 h. Se observa la zona pelúcida en el medio de cultivo de aquellos embriones que eclosionaron.

Los niveles intracelulares de EROs se visualizan en la **Tabla 2.6**. Los resultados indican que hay una disminución estadísticamente significativa en los niveles de EROs en el grupo AAL con respecto a C en B7 ($P = 0,05$). No se hallaron diferencias significativas entre grupos en B8 ($P = 0,32$) (**Figura 2.7**).

Tabla 2.6. Efecto de 2,5 μ M AAL durante el CIV sobre los niveles intracelulares de EROs de blastocistos día 7 (B7) y día 8 (B8) calentados post-vitrificación.

Día de CIV	Tratamiento	Niveles intracelulares de EROs % UAF (n)	
B7	C	137,35 \pm 18,44 (9) ^a	Mpd= 36,90 Depd= 23,27 P= 0,05
	AAL	100,45 \pm 14,18 (10) ^b	
B8	C	121,90 \pm 8,90 (15) ^a	Mpd= -5,41 Depd= 8,35 P= 0,32
	AAL	127,30 \pm 8,35 (10) ^a	

UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia. Valores expresados como la media \pm desvío estándar (n). Mpd: media posterior de la diferencia. Depd: desvío estándar posterior de la diferencia ^(a-b) Los superíndices que difieren dentro de cada columna indican diferencia ($P \leq 0,05$).

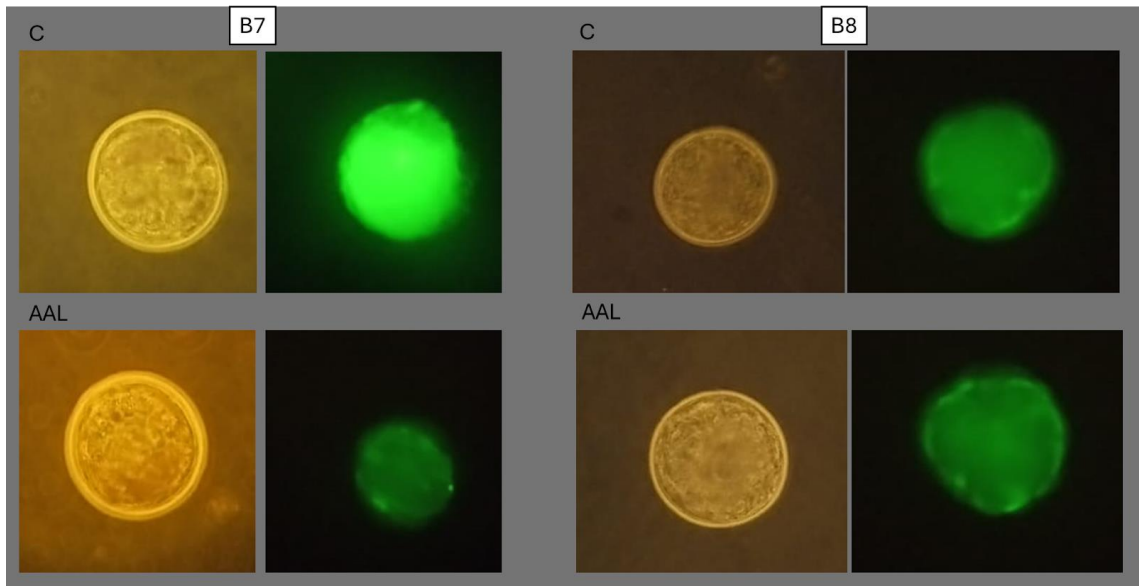


Figura 2.7. Fotografías de embriones día 7 (B7) y día 8 (B8) bovinos evaluados con la técnica de H2DCFDA. El lado izquierdo de cada panel corresponde a los embriones con visualización sin filtro de luz UV, y el lado derecho de cada panel corresponde a los embriones con visualización con filtro de luz UV (H2DCFDA).

2.5. Conclusión

En conclusión, nuestros resultados muestran que la suplementación con AAL en el CIV durante las primeras 24 h del cultivo aumenta la formación de blastocistos, la tasa de blastocistos Grado 1, y la tasa de eclosión. Sin embargo, no genera aumentos en las tasas de clivaje. Además, mejora la calidad del embrión en términos de número de células por blastocisto. Por otro lado, el AAL disminuye los niveles de EROs en blastocistos vitrificados y re-expandidos por calentamiento. Podemos decir que el AAL es relevante en varios aspectos del desarrollo embrionario y es una herramienta apreciable para aumentar la eficacia de la PIV bovina.

3. Capítulo 3

Objetivo 3: Validar la mejor condición de CIV obtenida en el Objetivo 2 durante la activación del genoma embrionario (AGE), utilizando ovocitos de matadero y finalmente en ovocitos recuperados de donantes vivas mediante la técnica de OPU, evaluando la capacidad de desarrollo embrionario temprano.

3.1. Introducción

En el año 1988, se realizó por primera vez en bovinos la recolección *in vivo* de ovocitos mediante aspiración folicular guiada por ecografía transvaginal (*Ovum Pick Up*: OPU) (Pietersen et al., 1988). Estos investigadores demostraron que la recolección repetida de ovocitos mediante OPU podía realizarse sin riesgos para la salud y la actividad reproductiva del animal. En los últimos años, el potencial de la OPU, seguida de la PIV como herramienta para acelerar los programas genéticos en bovinos, ha registrado un avance considerable. Cabe destacar, que las biotecnologías reproductivas son fundamentales para maximizar la progenie de vacas seleccionadas de alto valor genético mediante el aumento en el número de embriones producidos y de crías por donante (Rexroad et al., 2019). Estas herramientas permiten aplicar una mayor presión de selección para mejorar la próxima generación (Merton et al., 2013). La recuperación de ovocitos bovinos mediante la técnica de OPU de donantes seleccionadas ofrece la ventaja de propagar rápidamente la genética de estos animales. Sin embargo, el porcentaje de blastocistos obtenido mediante PIV sigue siendo bajo (Seneda et al., 2020).

Las mejoras en la productividad ganadera apuntan a impulsar la producción de carne y leche para una población mundial en crecimiento (Salek et al., 2025). Siguiendo esta línea, el propósito de la PIV en bovinos es replicar, con la mayor

precisión posible, las condiciones *in vivo*, con el objetivo de obtener embriones de alta calidad capaces de continuar el desarrollo, la implantación y dar lugar a nacimientos viables (Ferré et al., 2020). La OPU cuenta con la ventaja de acelerar el proceso reproductivo debido a que una vaca puede ser donante de ovocitos cada semana y, además, acorta el intervalo generacional al usar como donantes a terneras, a vaquillonas prepúberes o animales de hasta 3 meses de gestación. Asimismo, los ovocitos recuperados de una donante se pueden fecundar con semen de diferentes toros en procedimientos separados o incluso con semen sexado, sin disminución de la fertilidad (Humblot et al., 2010; Bó et al., 2019). Asimismo, la OPU-PIV es una alternativa para el ganado con fertilidad reducida, debido por ejemplo a patologías del tracto reproductivo, transporte de espermatozoides deficiente o enfermedades terminales (Ferré et al., 2020).

Como ya se ha mencionado, las condiciones de cultivo posteriores a la fecundación alteran drásticamente la calidad de los blastocistos resultantes, con lo cual el CIV de embriones es crucial en el desarrollo de técnicas de reproducción asistida (Ming et al., 2024). El estrés oxidativo es un factor clave que afecta al embrión en desarrollo durante la fase de cultivo. Compuestos como el amoníaco, las EROs y la presencia de algunos factores de crecimiento pueden causar peroxidación lipídica, daño de la membrana celular y daño estructural, lo que reduce la criotolerancia y aumenta la apoptosis (Keane & Ealy, 2024). Anteriormente mencionamos que los primeros cuatro días de desarrollo posteriores a la fecundación son críticos, debido a cambios morfológicos y metabólicos significativos entre los que se incluye la activación del genoma embrionario (AGE) (Rabaglino et al., 2023). Este momento de bloqueo es específico de cada especie y coincide con la transición materno-embionaria, es decir, la etapa de desarrollo en la que los embriones ya no dependen de los transcritos maternos y comienzan a depender de los ARN mensajeros (ARNm) sintetizados por la activación de su propio genoma (De Sousa et al., 1998b). La AGE es una etapa del desarrollo embrionario en la cual el embrión

es particularmente sensible al estrés oxidativo, y cualquier condición que promueva la acumulación de EROs en esta etapa tendrá consecuencias perjudiciales para el embrión (Dumollard et al., 2009). En bovinos, la AGE se caracteriza por dos fases o ventanas distintas: (i) menor AGE (mAGE; etapa de 2 a 8 células) donde los cigotos y los embriones tempranos son transcripcional y traduccionalmente activos; y (ii) mayor AGE (MAEG; etapa de 8 a 16 células) que implica la degradación gradual del ARNm materno, la organización ultraestructural del nucleolo, y cambios en la síntesis de proteínas (Laurincik et al., 2000; Frei et al., 1989). Estos eventos son factores clave para el desarrollo y la diferenciación embrionaria exitosa (Rabaglino et al., 2023). La AGE es esencial para una correcta compactación de la mórula, proceso caracterizado por una mayor adhesión intercelular mediado por uniones adherentes y por la polarización del embrión (Kojima et al., 2014), así como la formación del trofoectodermo y el macizo celular interno del blastocisto (Menchero et al., 2017).

El citoplasma del ovocito (ooplasma) contiene y transporta ARNm y proteínas que se consideran generalmente mediadores del desarrollo embrionario, necesarios para las primeras divisiones del embrión, pero también hay muchos transcritos de genes de muerte celular y proteínas que son constituyentes del ooplasma. La presencia de estos productos genéticos se justifica por la necesidad del ovocito de sufrir muerte celular a medida que los folículos se vuelven atrésicos. Por lo tanto, un embrión sano no sólo debe activar su genoma en relación con los genes importantes para el desarrollo, sino también mantener el equilibrio entre los factores de muerte/supervivencia en el ooplasma (Meirelles et al., 2004), lo cual hace aún más crítica la etapa de AGE. Para mejorar las tasas y la calidad de los blastocistos producidos *in vitro*, varios autores han investigado la adición de diferentes tipos de antioxidantes naturales al medio de CIV (Cañón-Beltrán et al., 2021; Dos Santos et al., 2019;). Las propiedades antioxidantes del AAL fueron demostradas durante el desarrollo embrionario *in vitro* en ratones (Truong & Gardner, 2017), cabras (He et

al., 2021) y cerdos (Himaki & Hano, 2023). En bovinos, hemos estudiado que la suplementación con altas concentraciones de AAL desde el comienzo de CIV hasta el día 7, generó un deterioro del desarrollo embrionario, mientras que concentraciones más bajas de AAL (2,5 μM) llevaron a mejoras en la calidad del embrión, aumentando el número total de células del blastocisto. Además, la suplementación con 2,5 μM de AAL durante mAGE (24 h de CIV), aumentó el número total de células del blastocisto y las tasas de eclosión. Junto con esto, los embriones cultivados con AAL y posteriormente vitrificados exhibieron niveles reducidos de EROs intracelulares en los blastocistos calentados.

Las limitaciones en la disponibilidad de ovocitos derivados de OPU para estudios de investigación, restringe el conocimiento sobre el impacto del AAL en embriones de PIV desarrollados a partir de ovocitos obtenidos de donantes vivas.

La OPU se lleva a cabo punzando folículos sanos y en crecimiento, que miden entre 3 y 8 mm de diámetro, en ausencia de un folículo dominante, dos veces por semana o hasta cada dos semanas, lo que permite obtener COCs de buena calidad. En contraste, los animales de matadero pueden estar en cualquier etapa del ciclo estral. En consecuencia, la calidad de los COCs recolectados de folículos de 3 a 8 mm, incluidos aquellos en todas las fases de la onda folicular, como dominancia o regresión, son evaluados antes de la MIV. Por ello, los COCs son seleccionados en función de la calidad tanto del cúmulus como del citoplasma del ovocito, eligiendo COCs de Grado 1 y 2 cuando provienen de ovarios de matadero, mientras que con la técnica de OPU, se utilizan para la PIV todos los ovocitos recuperados, excepto los atrésicos (Merton et al., 2013). Por lo expuesto, nos planteamos comprender dos puntos fundamentales: 1) el efecto de AAL en la AGE: es crucial comprender los efectos específicos de la suplementación con AAL durante la etapa de MAGE. ¿Es diferente el efecto de AAL en el desarrollo embrionario si lo suplementamos en el mAGE o en el MAGE? 2) la necesidad de determinar si los hallazgos se pueden extrapolar a los ovocitos derivados de OPU. Por lo tanto, el objetivo principal de

este capítulo es identificar el efecto de la suplementación con AAL en el medio de CIV durante la etapa de MAGE en ovocitos derivados de matadero, para determinar su influencia en el desarrollo y la calidad del embrión. Además, la suplementación con AAL durante la mAGE y MAGE se evaluó usando ovocitos derivados de OPU.

3.2. Diseño experimental

Los objetivos planteados se dividieron en dos experimentos (Experimento 4 y Experimento 5) (**Figura 3.1**):

3.2.1. Experimento 4: Efecto antioxidante de 2,5 μ M AAL sobre el desarrollo y la calidad embrionaria bovina cuando se suplementa durante la MAGE utilizando ovocitos derivados del matadero.

Para este propósito, los tratamientos en este experimento en CIV fueron: a) C: Control (medio CIV sin suplementar); b) MAGE: tratamiento durante 48-96 h posteriores a la FIV con 2,5 μ M AAL (estadio de 8 a 16 células). Las mediciones realizadas en este experimento fueron: la tasa de clivaje 48 h post FIV (como estrategia para verificar la eficacia de la técnica de PIV), las tasas totales de blastocistos en los días 7 y 8 (B7 y B8), evaluadas como parámetros de desarrollo embrionario, además del número total de células de blastocistos B7 y B8 que se midió como parámetro de calidad embrionaria. También se evaluaron los niveles intracelulares de GSH y EROs en los embriones, así como el nivel de peroxidación lipídica en medio de CIV al final del tratamiento, para estudiar el estado de estrés oxidativo.

3.2.2. Experimento 5: Efecto antioxidante de 2,5 μ M AAL sobre el desarrollo y la calidad embrionaria bovina cuando se suplementa durante la mAGE y MAGE, utilizando ovocitos derivados de OPU.

El objetivo del experimento 5 fue verificar si los resultados obtenidos de ovocitos derivados de matadero pueden extrapolarse a los ovocitos derivados de OPU. Para este propósito, los tratamientos en CIV fueron: a) C: Control (medio CIV sin

suplementar); b) mAGE: tratamiento durante 24-48 h posteriores a la FIV con 2,5 μM AAL; c) MAGE: tratamiento durante 48-96 h posteriores a la FIV con 2,5 μM AAL. Los parámetros medidos en este experimento fueron la tasa de clivaje a las 48 h posteriores a la FIV y la tasa total de blastocistos B7 y B8. El número total de células de blastocistos B7 y B8 se midió como parámetro de calidad en todos los tratamientos. Junto con esto, se evaluaron los niveles de peroxidación lipídica en el medio de CIV después del tratamiento para estudiar el estrés oxidativo.

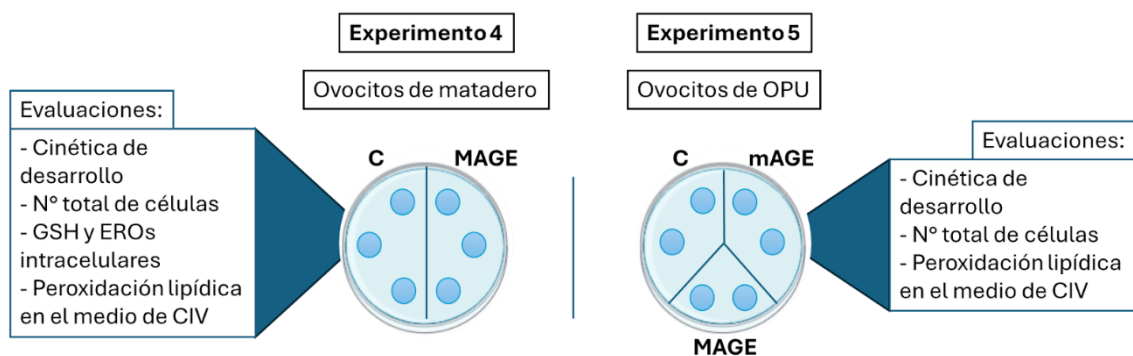


Figura 3.1: Diagrama esquemático del Experimento 4 y Experimento 5. C: Control (0 μM AAL); mAGE: 2,5 μM AAL administrado de 24-48 h posteriores a la FIV; MAGE: 2,5 μM AAL administrado 48 a 96 h posteriores a la FIV. Al finalizar cada tratamiento, los embriones fueron sembrados en una nueva placa de cultivo con medio CIV hasta completar su desarrollo. El medio fue reemplazado cada 48 h, tanto el grupo tratado como el grupo control.

3.3. Materiales y Métodos

3.3.1. PIV

En la etapa de MIV, dependiendo del experimento, los ovocitos se obtuvieron con dos modalidades de recolección diferentes:

- Ovocitos obtenidos de ovarios de matadero:

Los ovocitos que se obtuvieron a partir de ovarios de matadero (Frigorífico Gorina S.A), se procesaron como fue descrito en el apartado **m.1.1.1**.

- Ovocitos obtenidos de OPU:

Los ovocitos se obtuvieron según se describió en el apartado **m.1.1.2**. En este estudio se utilizaron vacas raza Angus (*Bos taurus*) (n = 74) con buen puntaje de condición corporal (6-7) y 60 días posparto. Todas las aspiraciones foliculares fueron realizadas por el mismo veterinario (**Figura 3.2**).

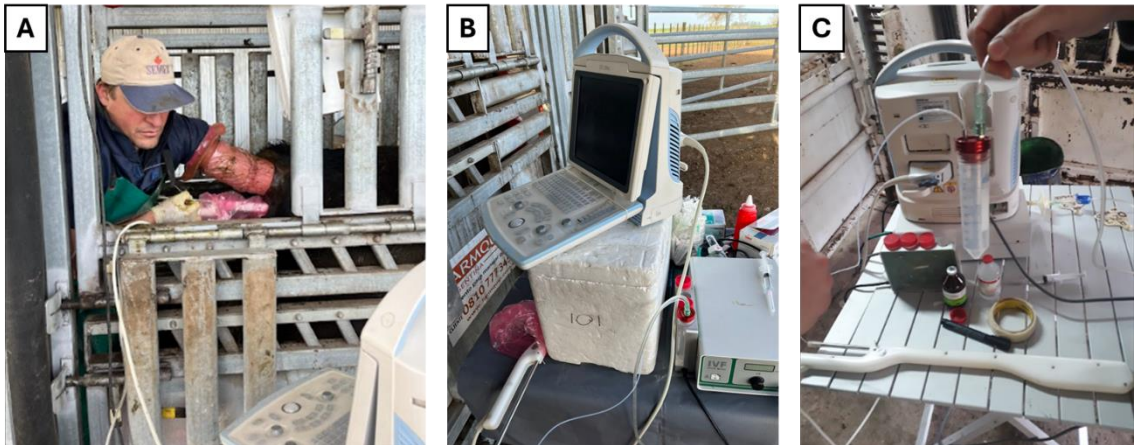


Figura 3.2: Imágenes representativas de la técnica de OPU. A: Sujeción de los ovarios a través del recto para su observación a través de un transductor ecográfico transvaginal. B: Ecógrafo. C: Equipo de succión conectado a un tubo de recolección estéril.

Los COCs se colocaron en tubos de cultivo estériles con medio de MIV cubiertos con aceite mineral y se gasearon durante 20 segundos. Posteriormente, se incubaron a 39 °C hasta llegar al laboratorio. Una vez allí, se colocaron en la incubadora por 24 h (**Figura 3.3**). Los COCs de las 74 vacas aspiradas se separaron aleatoriamente. Cada tubo de cultivo contenía los COCs de tres animales.



Figura 3.3. A y B: tubos de cultivo para transporte de ovocitos de OPU. C: tubos de cultivo para la incubación de los COCs. Cada tubo de cultivo contiene los COCs aspirados de tres animales.

La FIV de los experimentos 4 y 5 se realizó según apartado **m.1.2**. El CIV (apartado **m.1.3**) se realizó con los tratamientos mencionados anteriormente, evaluándose las tasas de clivaje 48 h posteriores de la FIV, clasificando a los embriones en aquellos con 2-4 células y aquellos con más de 4 células (>4 células). Para examinar el impacto del AAL en el desarrollo embrionario, se midieron las tasas de blastocistos totales observados en el día 7 (B7) y blastocistos totales observados en el día 8 (B8). Las tasas de clivaje, B7 y B8, se calcularon a partir del total de COCs madurados. Se realizaron al menos tres réplicas por experimento (4 y 5) (considerándose réplica a cada establecimiento). Para el desarrollo embrionario se utilizaron 366 ovocitos derivados del matadero en el tratamiento de C y 350 ovocitos en el tratamiento con AAL. De los ovocitos recuperados mediante la técnica de OPU, se utilizaron 269 para tratamiento C y 285 ovocitos para el tratamiento con AAL.

3.3.2. Análisis del número total de células de los blastocistos:

El número total de células de los blastocistos en B7 y B8 se midió utilizando Hoechst 33342 siguiendo la técnica descrita en el apartado **m.2.2**. Para la evaluación del recuento celular de los embriones (día 7 más día 8), se analizaron 65 embriones de ovocitos derivados de mataderos en el tratamiento de C y 61 embriones en el tratamiento con AAL. Para los embriones de ovocitos derivados de OPU, se analizaron 57 embriones en el tratamiento de C y 60 embriones en el tratamiento con AAL.

3.3.3. Ensayos de H2DCFDA y GSH:

Para la evaluación de los niveles intracelulares de EROs y GSH, los embriones al final del tratamiento (día 4 después de la FIV, embrión 16-32 células) se procesaron siguiendo los pasos descritos en los apartados **m.2.6** para EROs y **m.2.7** para GSH con la sonda intracelular ThiolTracker™ Violet. Se evaluaron un total de 22 embriones del tratamiento C y 33 embriones del tratamiento con AAL en ambas técnicas.

3.3.4. Peroxidación lipídica:

Se evaluaron los niveles de peroxidación lipídica después del tratamiento con AAL en el medio de CIV siguiendo los pasos descritos en el apartado **m.2.4**. Se contabilizaron la cantidad de estructuras fecundadas presentes en el medio al momento del tratamiento.

3.3.5. Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software RStudio. Se utilizó un enfoque bayesiano con una distribución previa normal y no informativa para calcular los ICB del 95 %. Se llevaron a cabo simulaciones y una evaluación de la distribución posterior para analizar la sensibilidad y el poder del modelo estadístico. Los datos de clivaje y tasa de blastocisto se analizaron con la distribución Beta para la comparación de dos proporciones. El número total de células de blastocistos, EROs, GSH y niveles de peroxidación lipídica se analizaron utilizando una comparación bayesiana de dos medias adaptados al enfoque frecuentista de distribución normal. Los ICB se estimaron como diferencia media posterior $\pm (1,645 \times \text{desviación estándar posterior de la diferencia})$ unilateralmente. Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (DE). Se consideraron significativos valores $P \leq 0,05$ y una tendencia de valores $P \leq 0,1$.

3.4. Resultados

3.4.1. Experimento 4: Efecto antioxidante de 2,5 μM AAL sobre el desarrollo y la calidad embrionaria bovina cuando se suplementa durante la etapa de MAGE utilizando ovocitos derivados del matadero.

Para evaluar la producción de embriones, se analizaron las tasas de clivaje (embriones de 2-4 células y >4 células) y de blastocistos (B7 y B8). No hubo diferencias significativas en las tasas de clivaje (embriones de 2-4 células $P = 0,19$; embriones de >4 células $P = 0,43$; **Tabla 3.1**). Además, no se encontraron diferencias significativas en las tasas de B7 y B8 de CIV ($P = 0,33$; $P = 0,36$, respectivamente; **Tabla 3.1**). Para estudiar la calidad de los embriones, se contó el número total de células por blastocisto en los días B7 y B8. La suplementación con AAL durante la MAGE tendió a aumentar el número de células en los blastocistos B7 ($P = 0,06$; **Tabla 3.2**).

Tabla 3.1: Efecto del AAL suplementado con 2,5 μM en la fase MAGE durante el CIV sobre la tasa de desarrollo de embriones bovinos utilizando ovocitos derivados de matadero.

Tratamiento	COCs (n)	Clivados 2 a 4 células (n)		Clivados >4 células (n)		B7 (n)		B8 (n)	
C	366	39,40 \pm 0,02 (144) ^a	P= 0,19	25,27 \pm 0,02 (92) ^a	P= 0,43	21,34 \pm 2,50 (56) ^a	P= 0,33	2,24 \pm 0,00 (5) ^a	P= 0,36
MAGE	350	42,61 \pm 0,02 (149) ^a		24,71 \pm 2,94 (86) ^a		23,94 \pm 2,76 (56) ^a		0,80 \pm 0,00 (1) ^a	

Los resultados del desarrollo embrionario se expresan como porcentaje de la media \pm desvío estándar (n) con respecto a los ovocitos madurados. C: Control (0 μM de AAL); MAGE: activación mayor del genoma embrionario (2,5 μM AAL, 48-96 h después de la FIV); B7: blastocistos totales en el día 7 de cultivo; B8: blastocistos totales en el día 8 de cultivo. ^(a-b) Los valores con superíndices diferentes dentro de cada columna difieren ($P \leq 0,05$).

Tabla 3.2: Efecto de la suplementación con 2,5 μM de AAL en la fase MAGE durante el CIV en el número total de células de embriones bovinos utilizando ovocitos derivados de matadero.

Tratamiento	Número total de células % (n)			
	B7		B8	
C	68,58 \pm 2,41 (43) ^a	P= 0,06	69,59 \pm 3,32 (22) ^a	P= 0,20
MAGE	74,25 \pm 2,80 (47) [*]		74,71 \pm 5,38 (14) ^a	

MAGE: mayor activación del genoma embrionario (48–96 h post FIV). Los resultados del número total de células de los blastocistos en el día 7 (B7) y el día 8 (B8) de CIV se evaluaron con Hoechst 33342, y se presentaron como el valor de la media \pm DE (n). n: número de blastocistos analizados. C: Control (0 μM de AAL); MAGE: 2,5 μM AAL, 48-96 h después de la FIV. ^(a-b) Los valores con superíndices diferentes dentro de cada columna difieren ($P \leq 0,05$). ^(*) Indica tendencia.

El efecto antioxidante del AAL se estudió mediante EROs y GSH en los embriones al finalizar el tratamiento, así como los niveles de MDA en el medio de CIV. Los niveles de EROs se evaluaron con el ensayo de H2DCFDA. Cuando se evaluaron los niveles de EROs, los embriones tratados con AAL tuvieron niveles significativamente más bajos en comparación con el grupo de C ($P < 0,0001$). El tratamiento con AAL condujo a un aumento significativo en los niveles de GSH en comparación con el grupo de C ($P = 0,05$) (**Tabla 3.3**). La peroxidación lipídica se midió mediante un ensayo TBARS, que midió los niveles de MDA en el medio de CIV. Este ensayo no mostró diferencias significativas entre el tratamiento con AAL y el C ($P = 0,32$). Imágenes representativas ilustradas en la **Figura 3.4**.

Tabla 3.3: Efecto de la suplementación con 2,5 μM de AAL durante MAGE sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno intracelular (EROs), el contenido total de glutatión (GSH) en embriones bovinos y la peroxidación lipídica en el medio de CIV al final del tratamiento.

Tratamiento	COCs	EROs (n)		GSH (n)		Peroxidación Lipídica	
C	121	114,38 \pm 10,83 (22) ^a	P < 0,0001	194,53 \pm 9,75 (22) ^a	P = 0,05	0,02 \pm 0,00 ^a	P = 0,32
MAGE	111	73,16 \pm 6,64 (33) ^b		211,46 \pm 3,67 (33) ^b		0,02 \pm 0,00 ^a	

Los resultados se expresan como el valor de la media \pm DE de UA (unidades arbitrarias) de fluorescencia para los niveles intracelulares de EROs y GSH; y como media \pm DE de nmol MDA/cigoto para la peroxidación lipídica. n: número de embriones evaluados. ^(a-b) Los valores con superíndices diferentes dentro de cada columna difieren ($P \leq 0,05$).

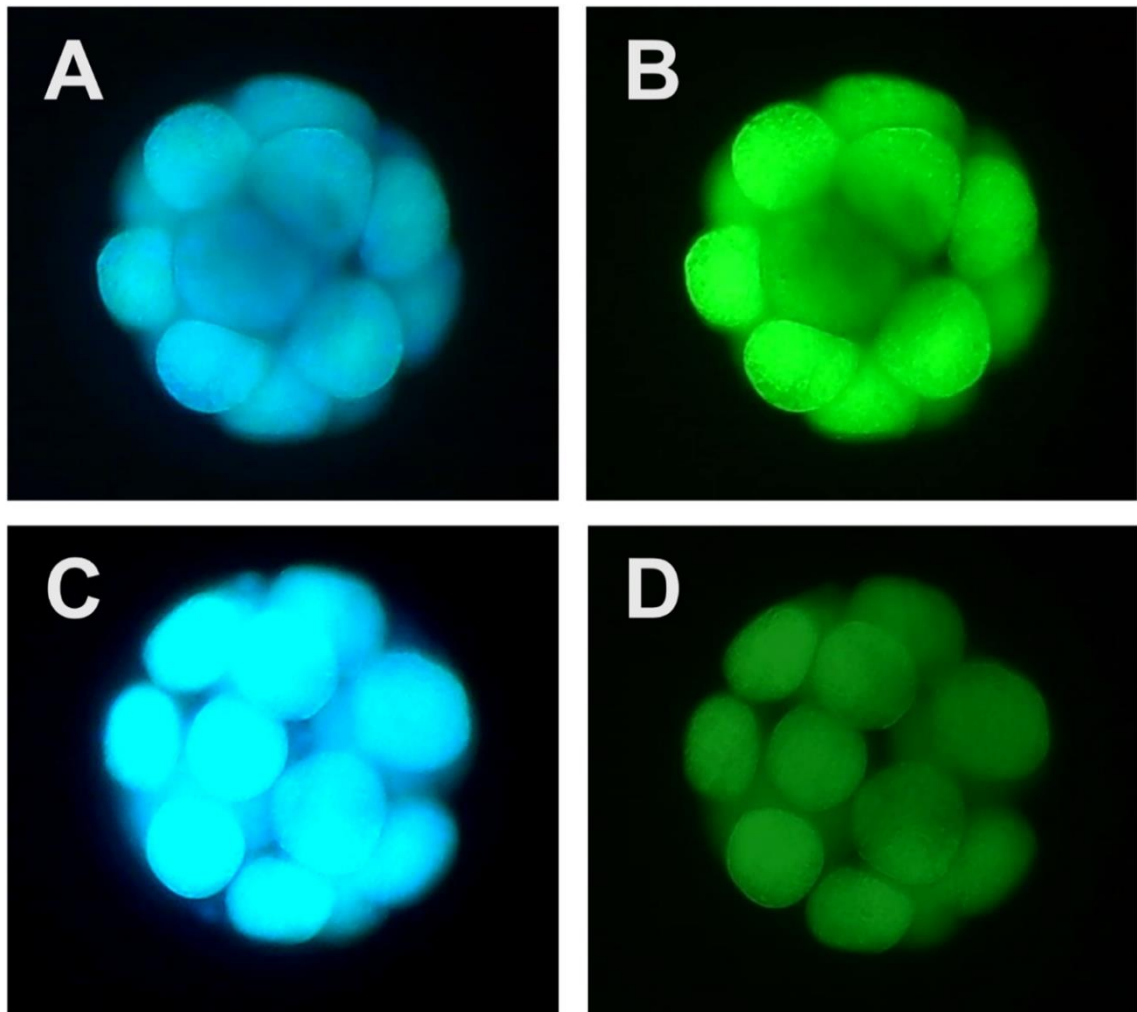


Figura 3.4. Niveles de glutatión (GSH) y especies reactivas de oxígeno (EROs) en embriones bovinos después del CIV suplementado con 2,5 μM de AAL durante la mayor

activación del genoma embrionario (MAGE) utilizando ovocitos derivados de matadero. A y B corresponden a los niveles intracelulares de GSH y EROs en el grupo Control, respectivamente. C y D corresponden a los niveles intracelulares de GSH y EROs en el grupo tratado con AAL, respectivamente. Los embriones se encuentran en el día 4 post FIV, con más de 16 células.

3.4.2. Experimento 5: Efecto antioxidante de 2,5 μ M AAL sobre el desarrollo y la calidad embrionaria bovina cuando se suplementa durante la etapa de mAGE y MAGE, utilizando ovocitos derivados de OPU.

Se utilizaron los mismos parámetros que en el experimento 4 para evaluar la producción y calidad de embriones. No hubo diferencias significativas en las tasas de clivaje (embriones de 2-4 células $P = 0,37$; embriones >4 células $P = 0,14$) entre los tratamientos (**Tabla 3.4**). La tasa de desarrollo embrionario no mostró diferencias significativas entre el tratamiento con AAL durante mAGE y el grupo C ($P \geq 0,24$; **Tabla 3.4**). Sin embargo, la adición de AAL durante MAGE aumentó la tasa total de formación de blastocistos en B8 ($P = 0,04$; **Tabla 3.4**). Cuando se evaluó la calidad del embrión, la suplementación con AAL durante mAGE no modificó el número de células del blastocisto en B7 y B8 ($P = 0,34$; **Tabla 3.5**). Por otro lado, la suplementación de AAL durante MAGE tendió a aumentar el número total de células en el blastocisto B7 ($P = 0,09$).

Para medir la peroxidación lipídica en el medio de CIV, se utilizó el ensayo TBARS. No se observaron diferencias significativas entre el AAL y el grupo C durante el mAGE ($P = 0,33$). Además, durante la etapa de MAGE no hubo diferencias significativas entre el tratamiento con AAL y el C ($P = 0,39$) (**Tabla 3.5**).

Tabla 3.4: Efecto de 2,5 μ M de ácido alfa lipoico (AAL) suplementado en mAGE y MAGE, durante el CIV sobre la tasa de desarrollo del embrión bovino utilizando ovocitos obtenidos por OPU.

Tratamiento	COCs (n)	Clivados 2-4 células (n)	Clivados >4 células (n)	B7 (n)	B8 (n)
C	159	49,06 ± 0,03 (78) ^a	17,30 ± 0,02 (27) ^a	16,77 ± 0,02 (26) ^a	23,60 ± 0,03 (37) ^a
mAGE	171	47,39 ± 0,03 (81) ^a	21,96 ± 0,03 (37) ^a	19,65 ± 0,03 (33) ^a	27,16 ± 0,03 (46) ^a
		P= 0,37	P= 0,14	P= 0,24	P= 0,21
C	110	42,85 ± 0,04 (47) ^a	16,96 ± 0,03 (18) ^a	22,32 ± 0,03 (24) ^a	25,00 ± 0,04 (27) ^a
MAGE	114	43,96 ± 0,04 (50) ^a	20,68 ± 0,03 (23) ^a	25,00 ± 0,04 (28) ^a	35,34 ± 0,04 (40) ^b
		P= 0,43	P= 0,23	P= 0,31	P= 0,04

Los resultados del desarrollo embrionario se expresan como porcentaje de la media ± DE (n) en relación con los COCs madurados. COCs: complejo ovocito-cúmulus; C: Control (0 µM de AAL); mAGE: activación menor del genoma embrionario (2,5 µM AAL, 24-48 h posteriores a la FIV); MAGE: activación mayor del genoma embrionario (2,5 µM AAL, 48-96 h posteriores a la FIV); B7: blastocistos totales al día 7 de CIV; B8: blastocistos totales al día 8 de CIV. ^(a-b) Los valores con diferentes superíndices dentro de cada columna difieren ($P \leq 0,05$).

Tabla 3.5: Efecto de la suplementación de 2,5 µM de AAL durante la ventana de mAGE y MAGE en el CIV de embriones bovinos, utilizando ovocitos obtenidos a partir de OPU sobre el número total de células de blastocistos y la peroxidación lipídica en el medio de CIV al final del tratamiento.

Tratamiento	Número total de células				Peroxidación lipídica	
	B7 (n)		B8 (n)			
C	65,38 ± 3,66 (21) ^a	P= 0,34	71,81 ± 6,36 (11) ^a	P= 0,34	0,09 ± 0,04 ^a	P= 0,33
mAGE	67,82 ± 4,99 (17) ^a		77,33 ± 4,94 (15) ^a		0,07 ± 0,03 ^a	
C	66,75 ± 2,63 (20) ^a	P= 0,09	72,79 ± 6,02 (5) ^a	P= 0,40	0,03 ± 0,00 ^a	P= 0,39
MAGE	75,00 ± 5,61 (17) [*]		75,81 ± 10,39 (11) ^a		0,03 ± 0,00 ^a	

C: Control (0 µM de AAL); mAGE: activación menor del genoma embrionario (2,5 µM de AAL, 24-48 h posteriores a la FIV); MAGE: activación mayor del genoma embrionario (2,5 µM de AAL, 48-96 h posteriores a la FIV). Los resultados del número total de células de blastocistos al día 7 (B7) y al día 8 (B8) de CIV se evaluaron con la tinción de Hoechst 33342, y se expresaron como media ± DE (n). n: número de blastocistos analizados. Resultados de la peroxidación lipídica expresados como la media ± DE de nmol MDA/cigoto. (a-b) Los valores con superíndices diferentes dentro de cada columna difieren ($P \leq 0,05$). * indica una tendencia.

3.5. Conclusión

En conclusión, estos experimentos demostraron que la suplementación con AAL en el medio de CIV durante la fase de MAGE podría ser una posible estrategia para mejorar la calidad embrionaria de los ovocitos derivados de OPU.

4. Discusión final

En el presente trabajo, se evaluaron los efectos de la suplementación con Ácido Alfa Lipoico (AAL) en el medio de cultivo *in vitro* (CIV) sobre el desarrollo y la calidad del blastocisto bovino. Se estudiaron distintas concentraciones de AAL suplementadas bajo diferentes condiciones de CIV. Los ovocitos empleados tuvieron diferente origen dependiendo del objetivo: por un lado, provinieron de ovarios de matadero, y por otro fueron obtenidos por aspiración folicular guiada por ecografía (OPU). Todos estos estudios estuvieron divididos en 5 experimentos.

En el Capítulo 1, se evaluaron los efectos de la suplementación con AAL en el medio CIV sobre el desarrollo y la calidad del blastocisto bovino cultivado bajo una atmósfera de 20 % (Experimento 1) o 7 % (Experimento 2) de O₂. Estudios previos han evaluado el efecto de AAL en el medio CIV de embriones murinos dilucidando mejoras (Yoon et al., 2011; Silva et al., 2015; Mokhtari et al., 2020). Otras investigaciones se han realizado suplementando con AAL durante la maduración ovocitaria. Por ejemplo, en cabras, Zhang et al. (2013) informaron que la suplementación del medio MIV con 25 µM de AAL resultó en un aumento de la maduración de los ovocitos, la tasa de blastocistos, la tasa de eclosión y una reducción de blastómeras apoptóticas. Talebi et al. (2012) demostraron que la suplementación con 100 µM de AAL en cultivo de folículos preantrales aislados de ovario de ratón condujo a mejoras en las tasas de desarrollo de los folículos, la maduración de los ovocitos y el desarrollo embrionario. En bovinos, Hassan et al. (2017) informaron que la suplementación del medio MIV con 10 µM de AAL incrementó las tasas de maduración nuclear, de desarrollo embrionario y aumentó el número total de células de los blastocistos. Otros autores demostraron que la suplementación de diferentes antioxidantes en la etapa de MIV disminuye el estrés oxidativo en ovocitos bovinos, reduciendo los niveles de EROs, aumentando los niveles

de GSH y mejorando el desarrollo hasta el estadio de blastocisto dependiendo del tipo de antioxidante utilizado (Sovernigo et al., 2017). Por el contrario, en el Experimento 1, la suplementación con 25 μ M de AAL resultó en una disminución en el desarrollo del embrión, y la suplementación con 100 μ M de AAL resultó en una menor tasa tanto de desarrollo como de eclosión. Una posible explicación de los efectos negativos del AAL en el presente estudio podría deberse a las diferencias en el diseño experimental debido a que se utilizó AAL en el medio de CIV y el período del tratamiento fue de 7 días. Otra explicación podría estar relacionada con el efecto prooxidante del AAL. Es ampliamente reconocido que después de que el AAL se transporta a la célula, se reduce a ADHL en las mitocondrias (Çakatay U., 2006). Esta molécula no solo tiene propiedades antioxidantes, sino que también induce efectos prooxidantes en determinadas circunstancias, siendo los efectos un equilibrio entre las propiedades prooxidantes y antioxidantes del ADHL en todas las células animales (Çakatay U., 2006). Scott et al. (1994) informaron que el ADHL acelera la peroxidación lipídica y funciona para generar radicales OH \cdot . Si bien ha habido un número limitado de estudios en los que se evaluaron los efectos prooxidantes del AAL (Dieter et al., 2002; Morkunaite-Haimi et al., 2003; Çakatay et al., 2005), el potencial prooxidante del AAL y el ADHL no ha sido bien caracterizado. Algunos investigadores propusieron que la actividad antioxidante de AAL disminuía a altas concentraciones, ya que un aumento de aditivos antioxidantes destruía las mitocondrias de los espermatozoides de cerdos adultos (Shen et al., 2016; Hu et al., 2013). Por esta razón, sugerimos que las concentraciones evaluadas podrían haber generado efectos prooxidantes en nuestro modelo.

Se ha informado que el AAL tiene funciones en el reciclaje de GSH intracelular (Packer et al., 1996; Attia et al., 2020). En consecuencia, en el presente estudio (Experimento 1) se evaluó el estado antioxidante de los embriones después de los tratamientos con AAL. Se sabe que en los embriones bovinos existe un aumento de GSH durante la MIV con concentraciones que se mantienen durante el proceso de

fecundación y siguen presentes en el inicio del desarrollo embrionario temprano (de Matos & Furnus, 2000). En nuestro Experimento 1, las concentraciones de GSH fueron menores en los blastocistos al día 8 de cultivo (B8) cuando se suplemento el medio CIV con 5 μ M de AAL. En cambio, Truong et al. (2016) informaron que hubo mayores concentraciones de GSH en embriones de una célula de ratón cultivados con 5 μ M de AAL combinado con otros antioxidantes y 20 % de O₂. Es importante considerar que, además de ser especies diferentes, en el presente estudio las concentraciones de GSH se evaluaron el día 8 del período de CIV, a diferencia de los embriones de ratón que fueron evaluados al día 1. Se sabe que los niveles de GSH en los embriones de ratón disminuyen a medida que avanza el desarrollo preimplantacional (Gardiner & Reed, 1995). Esta disminución podría ocurrir debido a la oxidación de GSH a GSSG como resultado de las acciones de la enzima glutatión peroxidasa (Gardiner & Reed, 1994). Además, en la mayoría de las células, no hay transporte de GSH a través de las membranas plasmáticas desde el exterior de la célula, el GSH se cataboliza en la membrana celular, y los aminoácidos que lo componen pueden ingresar para que así el GSH sea sintetizado nuevamente dentro de la célula (Reed D., 1994). En bovinos, no se conoce exactamente el momento en el que el embrión sintetiza y/o utiliza GSH del medio, pero podríamos sugerir que una disminución de GSH hallada en B8 podría estar indicando un mayor consumo metabólico del embrión. Además, en el Experimento 1, los grupos experimentales tratados con 5 μ M de AAL presentaron un aumento de la concentración de proteína, por lo cual podemos hipotetizar que la disminución de GSH observada sea debido a que el GSH participó en el metabolismo de la cisteína para la síntesis de proteína embrionaria (Gardiner & Reed, 1995). Se conoce que el tamaño del embrión y el contenido de proteína no aumenta en embriones de bovinos de dos células. Sin embargo, hay aumentos en los valores de estas variables en la etapa de mórula, con un aumento adicional en la etapa de blastocisto expandido (Greal et al., 1996). Considerando que el contenido de proteína es una variable importante para la evaluación del crecimiento y viabilidad del embrión (Greal et al., 1996), el aumento en

la concentración de proteína podría ser un indicador confiable de la calidad embrionaria. Más aún, en humanos, se analiza el contenido de proteínas como parámetro de calidad embrionaria (Freour & Vassena, 2017).

Si comparamos nuestro trabajo con otros autores que estudiaron el efecto de AAL en el CIV, hay poca información al respecto, especialmente cuando se utilizan distintas condiciones de cultivo. Truong et al. (2016) informaron que no hubo diferencias en las proporciones de ovocitos pronucleares que se desarrollaron hasta la etapa de blastocisto expandido el día 5 de cultivo en SOFm con aa y en albúmina suplementada con 5 μ M de AAL combinado con otros dos antioxidantes (N- acetil carnitina y N-acetil cisteína) con un 5 % de O₂ en la atmósfera de cultivo. En concordancia, independientemente de las condiciones de cultivo (medio completo con SFB y aa (+/+), medio sin SFB y con aa (-/+), y medio sin SFB ni aa (-/-)), en el Experimento 2 no hubo diferencias en los porcentajes de embriones que experimentaron clivaje y se desarrollaron hasta la etapa de blastocisto cuando se agregó AAL al medio de CIV. En el grupo de tratamiento A7,5 +/- hubo un menor porcentaje de embriones que eclosionaron, lo que indica nuevamente un efecto negativo de AAL a mayores concentraciones.

Uno de los enfoques para evaluar la calidad del embrión *in vitro* es la cuantificación del número total de células (Tetzner et al., 2011; Lagalla et al., 2015). El número total de células fue evaluado en el Experimento 2, y dio como resultado un aumento significativo en los blastocistos del grupo A2,5 +/+. En concordancia, Truong et al. (2016) informaron un aumento en el número total de células de blastocistos de ratón cultivados con 5 μ M de AAL durante 5 días. Sin embargo, notamos que A2,5 en el medio no tenía efecto en el número total de blastómeras cuando faltaba SFB o aa. La falta de diferencias en el presente estudio, cuando se utilizó un medio completo y un medio sin SFB, podría deberse a que las evaluaciones se realizaron solo en el día 8 del período de cultivo del embrión. En varios informes se ha sugerido que el número de células de

los embriones producidos *in vitro* se ve afectado, no sólo por la etapa de desarrollo, sino también por el tiempo de cultivo (Stojkovic et al., 1998; Mori et al., 2002). Además, Lonergan et al. (1998) demostró que la inclusión de SFB en el medio acelera el desarrollo embrionario debido a que aporta factores de crecimiento y hormonas; proteínas de unión, aminoácidos, lípidos y micronutrientes que favorecen el metabolismo celular y el crecimiento embrionario. Por tal motivo, una posibilidad que no debe descartarse es que el efecto del AAL en el número total de células de los blastocistos podría estar enmascarado por la ausencia de SFB. En condiciones de cultivo sin SFB, es probable que el embrión no disponga del entorno metabólico adecuado para responder al efecto de AAL. Cuando el medio de cultivo también fue desprovisto de aa y suplementado con 2,5 μM de AAL, tampoco hubo un mayor número de células de blastocistos. El AAL interactúa con la cistina, reduciendo esta molécula a cisteína (Han et al., 1997). La cistina es uno de los MEM-NEAA que se añaden habitualmente al medio SOF. En el presente estudio, el medio no contenía ni MEM-NEAA ni MEM-EAA, lo que probablemente explique por qué la suplementación del medio con AAL no afectó al número de células embrionarias en el medio sin aa.

El porcentaje de apoptosis celular de los embriones se utiliza para analizar la calidad embrionaria (Makarevich et al., 2008; Paschoal et al., 2017). El proceso de apoptosis está caracterizado por la fragmentación nuclear y citoplasmática, con condensación de la cromatina y pérdida de la membrana celular (Hardy K., 1997). En bovinos, la adición de polifenoles del té verde en la MIV y el CIV dio como resultado una disminución del índice de apoptosis en blastocistos (Wang et al., 2013). En el Experimento 2, no hubo diferencias significativas entre tratamientos en la tasa de apoptosis cuando se utilizó el medio de CIV completo, pudiendo esto adjudicarse a la baja concentración de O_2 utilizada. Se sabe que los embriones *in vivo*, comparado con los embriones *in vitro*, tienen menores tasas de apoptosis. Una de las razones más importantes para esta diferencia es que una baja concentración de O_2 previene la

formación de EROs y, como ya se ha expuesto a lo largo del presente trabajo, las EROs cumplen un rol esencial en el proceso de apoptosis. Adicionalmente, embriones bovinos (Pomar et al., 2005) y de ratones (Moussa et al., 2004) cultivados en altas concentraciones de O₂ tienen bajas tasas de desarrollo y altas tasas de apoptosis (Ock et al., 2007). Por otro lado, hubo diferencias en la tasa de apoptosis cuando se utilizó el medio con aa y sin SFB, existiendo un mayor número de blastómeras apoptóticas cuando aumentó la concentración de AAL. Como suplemento proteico, el SFB ha llevado a mejoras en la producción de embriones y la calidad de los blastocistos en el ganado (Lonergan et al., 1998; Tetzner et al., 2011). Sugerimos que cuando no hubo suplementación con SFB, podría haber disminuido la calidad embrionaria con una mayor sensibilidad a concentraciones relativamente altas de AAL. Además, como ya se ha mencionado, se sabe que el AAL podría tener un efecto prooxidante cuando existen ciertas condiciones de cultivo (Moini et al., 2002). Múltiples factores pueden inducir estrés oxidativo y afectar potencialmente la calidad de los ovocitos maduros y, en consecuencia, las tasas de desarrollo embrionario (Ferré et al., 2019). Los resultados de experimentos de otros autores en desarrollo embrionario *in vitro* en los que hubo diferentes concentraciones de O₂ (5 % y 20 %) son inconsistentes (Takahashi et al., 2000; Khurana & Niemann, 2000; Yuan et al., 2003; Correa et al., 2008). Sin embargo, el ambiente y los procedimientos en los que se cultivan los embriones y gametas resultan en una mayor producción de EROs, afectando la morfología y funcionalidad de las blastómeras, e incluso causando cambios en el grado de expresión génica y trastornos epigenéticos (Blanco et al., 2012; Urrego et al., 2014). En consecuencia, el uso de compuestos con propiedades antioxidantes y metabólicas en el medio de CIV podría ser una buena estrategia para mejorar la calidad de los embriones.

El desarrollo embrionario preimplantacional se puede dividir en dos fases principales en función de su actividad metabólica, y es coincidente con la transición materno-embrionaria. La razón detrás de dicha reorganización es el requisito de la

reprogramación epigenética del ADN-cromatina, que requiere un periodo de calma transcripcional para garantizar una selección adecuada de los genes que se van a transcribir (Baroux et al., 2008). La primera fase corresponde al período controlado por los ARNm y las proteínas acumuladas en el ovocito durante su periodo de desarrollo, y es caracterizado por una baja actividad metabólica, y la segunda es el período posterior a la activación del genoma embrionario (AGE), que muestra un aumento dramático en el metabolismo concomitantemente con la formación y expansión de la cavidad del blastocele (Rabaglino et al., 2023). Los primeros experimentos en la década de los noventa demostraron que en bovinos la transcripción se activa entre el estadio de 8 a 16 células (Barnes & First, 1991). Posteriormente, se sugirió una activación embrionaria anterior, la cual se denominó “menor” (Memili & First, 1999) basándose en la aparición de nuevas proteínas durante el estadio de 2 a 4 células, y en donde los embriones ya no dependen de los transcriptos maternos y comienzan a depender de los ARNm sintetizados por la activación de su propio genoma (De Sousa et al., 1998b). Se habla entonces de una menor activación del genoma embrionario (mAGE), de 2 a 8 células, donde los cigotos y los embriones tempranos son transcripcional y traduccionalmente activos; y una mayor activación del genoma embrionario (MAGE), de 8 a 16 células, que implica la degradación gradual del ARNm materno, la organización ultraestructural del nucleolo, y cambios en la síntesis de proteínas (Laurincik et al., 2000; Frei et al., 1989; Sirard M., 2008). La transición de la gestión del ARNm materno a embrionario es un evento progresivo durante el cual los ARN maternos se agotan por la traducción y la degradación, y el ARN embrionario aumenta gradualmente con la llegada de nuevo ARN ribosómico (Sirard M., 2011). Este cambio en la actividad metabólica del embrión también está asociado con el paso del embrión del oviducto al útero (Donnay et al., 1999). La comprensión de estos mecanismos ha sido clave para el éxito de la producción de embriones a través de la PIV, atribuida en parte a la creación de medios de cultivo basados en los requisitos metabólicos del embrión y la composición de los fluidos oviductal y uterino (Simintiras et al., 2017; de Souza et al., 2015). En ratones, la

presencia de antioxidantes en la FIV y durante todo el CIV aumenta la velocidad del desarrollo embrionario y el número de células por blastocisto, junto con una reducción en los niveles de H_2O_2 (Truong & Gardner, 2017). Además, se ha demostrado en bovinos que la suplementación de cuatro antioxidantes (cisteína, cisteamina, catalasa y β -mercaptoetanol) durante 7 días de cultivo en baja tensión de O_2 afectó las frecuencias de aparición de blastocistos (de Souza Rocha-Frigoni et al., 2015). Por lo tanto, la administración de antioxidantes en momentos específicos del CIV puede proporcionarnos información valiosa sobre las necesidades del embrión en desarrollo. En el Capítulo 2 (Experimento 3), se estudió el efecto de la suplementación con $2,5 \mu M$ de AAL al inicio del CIV (primeras 24 h correspondientes a la mAGE) sobre los niveles intracelulares de EROs y la viabilidad de los cigotos y embriones clivados en día 2. Además, se evaluó el desarrollo embrionario temprano, la calidad del blastocisto y la criotolerancia posterior a la vitrificación. Los resultados indicaron que la inclusión de AAL no alteró la viabilidad y los niveles de EROs luego de 3 h de tratamiento en cigotos, ni tampoco en embriones clivados con un tratamiento de 24 h. Esto indicaría que a pesar de que el efecto del AAL no se evidenció rápidamente, fue clave para el desarrollo embrionario teniendo en cuenta el resto de los resultados obtenidos. Con respecto a la evaluación de la cinética de desarrollo, observamos que no hubo diferencias en las tasas de clivaje de embriones de 2 a 4 células. De manera consistente con nuestros resultados, otros estudios han reportado que la suplementación con distintos antioxidantes, como L-carnitina, cisteína, N-acetil-L-cisteína y catalasa, en medios de cultivo no generan diferencias en la tasa de clivaje (Carrillo-Gonzalez et al., 2020; Ali et al., 2003). Por otra parte, se demostró que la presencia de AAL aumentó la tasa de blastocistos totales y el número de embriones que aparecieron en el día 7 de cultivo. Previamente, indicamos que el porcentaje de blastocistos no se modifica después de un tratamiento prolongado (7 días) con $2,5 \mu M$ AAL en el CIV. En concordancia con nuestros resultados, Mokhtari et al., (2020) encontraron en ratones, que las tasas de clivaje, compactación de la mórula y blastocisto, no se modificaron con el agregado de 1 y 10

μM AAL al medio de CIV durante 5 días. Esto coincide con el hecho de que el embrión de mamífero preimplantacional es más sensible a su entorno durante las primeras etapas de división (Gardner & Lane, 2005; Wale & Gardner, 2016). Por lo tanto, la suplementación con antioxidantes durante esa etapa puede ser beneficiosa. Durante el desarrollo del embrión posterior a la fecundación, ocurren eventos críticos regulados por una expresión armonizada de genes en condiciones óptimas de cultivo (Niemann & Wrenzycki, 2000). Por lo tanto, el momento del "bloqueo del desarrollo" indica que las condiciones de cultivo impactan directamente sobre la transcripción embrionaria. Este proceso puede atenuarse reduciendo la glucosa en el medio de cultivo. En etapas tempranas de desarrollo, el embrión no utiliza la glucosa ya que la enzima fosfofructoquinasa no está activa (Gardner 1998). Por lo tanto, la poca glucosa utilizada se metabolizaría a través de la vía de las pentosas fosfato. Esta vía produce entre otras cosas GSH, que protege al embrión contra la peroxidación (Rieger 1992). Como mencionamos previamente, se ha informado que el AAL participa en el reciclaje intracelular de GSH (Attia et al., 2020) por lo que la suplementación de AAL durante las primeras 24 h de la CIV podría participar en este proceso. Una mayor concentración de GSH protege a las blastómeras del estrés oxidativo, especialmente durante el cambio de actividad transcripcional del genoma materno al genoma embrionario (Lee et al., 2014; Tadros & Lipshitz, 2009). Nuestros resultados mostraron que el AAL mejoró la calidad del blastocisto bovino ya que el número total de células, el número de blastocistos de Grado 1 de calidad y la tasa de eclosión fue mayor con el agregado de AAL. Además, el número total de células por blastocisto cultivado con $2,5 \mu\text{M}$ de AAL durante 24 h fue mayor que cuando el tratamiento se mantuvo durante todo el cultivo. De la misma manera, Truong et al. (2016) informaron un aumento mayor en el número total de células de blastocistos en embriones de ratón suplementados solo en el período de precompactación con respecto a aquellos cultivados durante 5 días con $5 \mu\text{M}$ de AAL combinado con acetil-L-carnitina y N-acetil-L-cisteína.

Otro parámetro de calidad embrionaria es el evento de eclosión. Las condiciones de un cultivo *in vitro* son subóptimas con respecto a la misma situación *in vivo*, y un *hatching* exitoso refleja un desarrollo embrionario adecuado, mientras que uno retrasado o anómalo puede indicar problemas en las condiciones de cultivo, o en el embrión (Ma et al., 2024). Nuestro estudio demostró que la suplementación con AAL mejora la tasa de eclosión *in vitro* en las condiciones ensayadas (Experimento 3).

La congelación lenta y la vitrificación se utilizan normalmente para criopreservar embriones bovinos (Asgari et al., 2012). La tolerancia a la criopreservación se utiliza rutinariamente como un parámetro de calidad embrionaria. Diversos estudios han demostrado que la suplementación con antioxidantes ha sido eficaz para mejorar el estrés oxidativo generado durante la criopreservación de embriones de mamíferos (Lane et al., 2002; Gaviria et al., 2019; Truong & Gardner 2020). En este contexto, diferentes autores han utilizado el AAL como una estrategia de criopreservación en espermatozoides, ovocitos y embriones. Se demostró que, en cerdos adultos, la adición de AAL al diluyente espermático resultó en un mayor porcentaje de espermatozoides móviles post descongelación, y una mejora en la integridad acrosómica y la actividad mitocondrial, así como también en las actividades de las enzimas antioxidantes endógenas como superóxido dismutasa, lactato deshidrogenasa, transaminasa glutamicoxaloacética y catalasa (Shen et al., 2016). Más aún, espermatozoides de búfalo tratados con AAL durante la criopreservación revelaron una mayor supervivencia espermática (Fayyaz et al., 2017). En ratón, los folículos preantrales criopreservados con AAL también mostraron mayores tasas de supervivencia, formación del antro y ovocitos en metafase II (Hatami et al., 2014). Por otro lado, la combinación de AAL con acetil-L-carnitina y N-acetil-L-cisteína suplementados tanto en la solución de vitrificación como en la de calentamiento condujo a un aumento significativo del número de células de la masa celular interna, y un aumento del área de crecimiento embrionario en ratones, que se correlacionó con el aumento del peso fetal, la longitud cefalocaudal y el desarrollo

de las extremidades después de la transferencia (Truong & Gardner 2020). En nuestros resultados, el número de blastocistos vitrificados Grado 1 fue mayor en el grupo tratado con AAL con respecto al Control (C), y el nivel de EROs fue menor en los blastocistos calentados con suplementación de AAL en el mAGE. Recientemente, dos Anjos et al. (2025) evaluaron la administración de 25 μ M AAL tanto en MIV como en CIV de embriones bovinos, registrando una disminución del estrés oxidativo en embriones Grado 2 de calidad, y un aumento en la eclosión luego de 12 h en embriones Grado 1 al día 7 y embriones Grado 2 al día 8 de cultivo posteriores al calentamiento en el proceso de vitrificación. En nuestro estudio, se observó que la tasa de eclosión después de la vitrificación no mejoró en el grupo AAL, y se registró una diferencia en el grupo C a las 48 h y a las 72 h. Una posible explicación es la diferencia en el diseño experimental con respecto a Anjos et al. (2025) y que, si bien los embriones C tuvieron la capacidad de eclosionar, lo hicieron con una cinética más lenta de eclosión y en presencia de mayores niveles de EROs. Esto sugiere que la capacidad de eclosión por sí sola no define una mayor calidad embrionaria, y no garantiza un mayor éxito en una posible transferencia a hembras receptoras. Recientemente, Truong y Gardner (2020) sugirieron que los antioxidantes deberían estar presentes durante todas las etapas del proceso de criopreservación para reducir efectivamente el estrés oxidativo. Según estos autores, la exposición breve no sería suficiente para proteger a las células frente a las lesiones generadas por la vitrificación, destacando así la importancia de una suplementación continua y estratégica.

En el Capítulo 3 (Experimento 4 y 5) se evaluó la adición de AAL en el CIV durante las dos fases de AGE, como una posible estrategia para mejorar el CIV de embriones bovinos, principalmente aquellos producidos a partir de ovocitos recuperados por OPU. En base a esto, nuestra investigación se centró en evaluar el impacto tanto de la fase específica de AGE como del momento de la suplementación con AAL. Los datos sobre el tratamiento con AAL durante la mAGE en ovocitos derivados del matadero

fueron discutidos previamente al mencionar el Capítulo 2. El Experimento 4 se centró en evaluar el efecto antioxidante del AAL durante la MAGE utilizando ovocitos provenientes de matadero. Los resultados demostraron que la adición de AAL a los medios de CIV durante MAGE aumentó el número total de células en blastocistos de día 7 de cultivo, redujo los niveles de EROs intracelulares, y aumentó los niveles de GSH en los embriones al día 4 de cultivo cuando se utilizaron ovocitos de matadero. Cuando la PIV se realizó con ovocitos provenientes de OPU, y se suplementó AAL en ambas fases de AGE (Experimento 5), la adición de AAL en la fase de mAGE no produjo diferencias con respecto al C. En cambio, cuando AAL se agregó en la fase de MAGE, se registró un aumento de la tasa de blastocistos y una tendencia a aumentar el número de células del blastocisto en el día 7 de cultivo. Rizos et al. (2017), demostraron que el período alrededor del momento de AGE es crítico para la calidad del embrión. Este evento está sujeto a influencias ambientales que posteriormente afectan la calidad del embrión bovino en desarrollo, con consecuencias potencialmente graves en la viabilidad fetal, prenatal y postnatal (Niemann & Wrenzycki, 2000). Gad et al. (2012) estudiaron la influencia de las condiciones de cultivo (*in vivo* o *in vitro*) antes y durante la AGE, y demostraron que el desarrollo embrionario fue similar independientemente del entorno de cultivo; sin embargo, el transcriptoma de los blastocistos se vio claramente influenciado por dichas condiciones. Además, estudios previos han demostrado que, mientras que el origen *in vivo* o *in vitro* de los ovocitos es el principal factor que determina la tasa de desarrollo embrionario, se sabe que el entorno de cultivo posterior a la fecundación es el factor más importante que determina la calidad de los embriones resultantes (Rizos et al., 2002). En esta investigación, el resultado sobre el desarrollo embrionario con el agregado de AAL durante las fases AGE en ovocitos derivados de matadero es diferente al obtenido a partir de ovocitos derivados de OPU. Esto puede deberse como mencionamos previamente al origen de los ovocitos. Karadjole et al. (2010) demostraron que utilizando la misma selección morfológica para ovocitos derivados de matadero y OPU, la tasa de blastocistos aumentó con los ovocitos

derivados de OPU. En este trabajo, los ovocitos provenientes de matadero fueron seleccionados, eligiéndose para la PIV aquellos Grado 1 y 2. En el caso de los ovocitos derivados de OPU, no se realizó tal selección, y se utilizaron todos los ovocitos a excepción de los atrésicos. Aún en condiciones subóptimas de calidad del ovocito, proveniente de OPU, se registró un efecto benéfico de la administración de AAL, evidenciado en un aumento de la tasa de blastocistos y el número total de células. En la fase MAGE, el momento de la suplementación con AAL podría ser más beneficioso para ovocitos de menor calidad como los que obtenemos en OPU. De acuerdo con esto, Merton et al., (2013) observaron un efecto relativamente mayor en el desarrollo del embrión cuando se complementó con cisteamina en la MIV en los COCs derivados de OPU en comparación con los de matadero.

Como mencionamos previamente, el número de células embrionarias es un parámetro correlacionado con el desarrollo y la calidad del embrión. La calidad del embrión se reconoce como un factor clave que influye en las tasas de preñez. Aunque la etapa de desarrollo del embrión no afecta directamente las tasas de preñez, los embriones de mayor calidad están vinculados a tasas más bajas de pérdida embrionaria debido a su potencial superior de desarrollo (Erdem et al., 2020). La suplementación con AAL en los medios de CIV aumentó el número total de células de blastocisto obtenidos a partir de ovocitos derivados de matadero, y tendió a aumentar el número total de células en blastocistos en ovocitos derivados de OPU. Esta tasa de incremento fue similar a la observada con otros antioxidantes como la vitamina C (Hu et al., 2012), crocetina (Dos Santos et al., 2019) y nobiletina (Cañón-Beltrán et al., 2021), sugiriendo que el AAL podría estimular directamente el ciclo celular durante la AGE y mejorar la calidad del embrión. Además, el efecto beneficioso del AAL sobre el desarrollo y la calidad del embrión ha sido observado por nosotros y otros autores (Hassan et al., 2017; Truong & Gardner, 2017).

Como se ha discutido previamente, la técnica PIV induce la formación de EROs en embriones y gametas, afectando la morfología y la funcionalidad (Urrego et al., 2014). En particular, cuando el sistema de reparación dependiente de GSH se daña, se produce una producción excesiva de EROs y la activación de la peroxidación lipídica, lo que provoca daños en la bicapa lipídica de la membrana plasmática a través de la oxidación acelerada de los lípidos de la membrana, lo que finalmente conduce a cambios en la estructura y función celular, afectando la capacidad de desarrollo de los embriones (Stockwell & Jiang, 2020). Las propiedades antioxidantes del AAL se han demostrado en PIV (Zhang et al., 2013). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron diferencias cuando se evaluó la peroxidación lipídica; creemos que la cantidad que se pudo medir con el método utilizado fue muy baja. Por esta razón, se realizaron otras mediciones (contenido de EROs y GSH). Estos ensayos confirmaron que el mecanismo de acción del AAL es a través de la reducción de EROs y el aumento de GSH en los embriones. En concordancia con lo ya expuesto, el desarrollo *in vitro* previo a la implantación en mamíferos es altamente susceptible al estrés oxidativo, lo que puede provocar un estancamiento del desarrollo en torno al momento de la AGE (Betts & Madan, 2008). Las mitocondrias, como reguladores clave de la energía celular, son esenciales para la división celular, la pluripotencia y la diferenciación en embriones tempranos (Yildirim & Seli, 2024). Además, las enzimas mitocondriales son vitales para la AGE y el desarrollo embrionario en general (Nagaraj et al., 2017). Es probable que esta organela influya en el desarrollo temprano al modular el equilibrio redox intracelular y los niveles de estrés oxidativo dentro de las blastómeras, ya que son cruciales para la regeneración del fosfato de dinucleótido de nicotinamida (NADPH), adenina y GSH (Almansa-Ordóñez et al., 2020). Los embriones de mamíferos tienen un bajo metabolismo de la glucosa durante las primeras etapas del desarrollo, ya que tanto la glucólisis como la vía de las pentosas fosfato están suprimidas. Por lo tanto, el ciclo de Krebs mitocondrial es la principal fuente de equivalentes reductores en el citosol, de modo que cualquier cambio en la función mitocondrial en el embrión se reflejará en cambios en el estado redox

intracelular (Dumollard et al., 2009). Por lo tanto, al verse alterada la función mitocondrial, se perjudica el desarrollo temprano (Dumollard et al., 2009). Se han observado niveles elevados de EROs durante la AGE en embriones bovinos (Betts & Madan, 2008). En particular, la elevación transitoria de EROs sigue a un agotamiento inicial de GSH, lo que indica que el aumento del estrés oxidativo puede ser resultado del agotamiento de las defensas antioxidantes del embrión (Luberda Z, 2005). Está bien establecido que la producción de energía en embriones tempranos está respaldada por los nutrientes presentes en el medio de cultivo (Dumollard et al., 2007), y décadas de investigación sobre cultivos *in vitro* han establecido que los requerimientos de nutrientes del embrión temprano cambian durante el desarrollo preimplantacional (Gardner et al., 2002; Johnson et al., 2003). Los efectos beneficiosos del AAL en el desarrollo del blastocisto se pueden atribuir a sus propiedades hidrofóbica e hidrofílica, que le permite atravesar fácilmente las membranas celulares e influir directamente en la bioenergética mitocondrial. El AAL interactúa con la subunidad E2 mitocondrial, sirviendo como un cofactor esencial en la descarboxilación oxidativa de las α -cetoácidos deshidrogenasas mitocondriales (Packer et al., 1995). Además, el AAL desempeña un papel fundamental en el reciclaje de GSH intracelular (Attia et al., 2020). Nuestros resultados demostraron que la suplementación con AAL aumenta el contenido de GSH y disminuye los niveles de EROs en los embriones, al mismo tiempo que reduce la apoptosis embrionaria. Por su parte, un estudio demostró que el AAL aumentó la expresión de GPX4 (el cual codifica para la enzima glutatión peroxidasa 4, que juega un papel crucial en la protección celular contra la peroxidación lipídica y la muerte celular por estrés oxidativo) en blastocistos partenogénéticos y ovocitos madurados (He et al., 2021). Diversos autores, han observado que la sobreexpresión de la familia de genes GPX1 (que codifican para la enzima glutatión peroxidasa 1) tras la suplementación con antioxidantes en el CIV se correlaciona con una mejor calidad del embrión bovino (Cajas et al., 2021; Dos Santos et al., 2019). Además, otros autores evidenciaron que el aumento de GPX1 va acompañado de una regulación positiva de genes esenciales para la progresión del ciclo

celular, como CDK2, que está involucrado en la AGE (Cañón-Beltrán et al., 2021) y se ha relacionado con una mejor calidad del embrión con el uso de antioxidantes como la nobiletina durante el CIV en bovinos (Cajas et al., 2021). Un posible mecanismo de acción del AAL durante la AGE podría darse a través de la modulación de la expresión génica por el antioxidante, estimulando directamente el ciclo celular y mejorando la calidad del embrión. El AAL podría mejorar la expresión de la familia de genes GPX y CDK2 durante la AGE, aumentando así el número total de blastómeras. Además, al elevar el GSH y reducir las EROs, el AAL podría minimizar el daño al ADN, promoviendo una división celular más efectiva. Sin embargo, se requieren estudios de expresión génica para validar estas hipótesis y dilucidar los mecanismos precisos por los cuales el AAL influye en el desarrollo embrionario. En las últimas décadas, avances significativos en la PIV comercial y tecnologías relacionadas, como la OPU, han aumentado el avance genético al reducir los intervalos generacionales en las industrias láctea y de la carne vacuna. Sin embargo, una de las principales razones de las bajas tasas de embriones cuando los ovocitos son derivados de OPU, es la calidad reducida de los ovocitos y la falta de competencia para el desarrollo (Soares et al., 2020).

A lo largo de la discusión de este trabajo de Tesis Doctoral hemos observado como los resultados obtenidos refuerzan el papel beneficioso del AAL como aditivo antioxidante útil en distintos puntos críticos de la PIV de embriones bovinos. Las mejoras evidenciadas en términos de desarrollo embrionario, calidad de blastocistos y tolerancia a la criopreservación respaldan la hipótesis de que el AAL actúa modulando el ambiente oxidativo del cultivo, favoreciendo condiciones más compatibles con el entorno fisiológico del desarrollo temprano. De este modo, el presente estudio contribuye a consolidar la evidencia sobre el impacto positivo del AAL en la eficiencia de los sistemas de PIV, y aporta nuevos datos que podrían ser considerados para el refinamiento de protocolos reproductivos en bovinos.

5. Conclusiones

El presente trabajo de investigación permitió analizar el efecto del ácido alfa lipoico (AAL) en la etapa preimplantacional del desarrollo embrionario de mamíferos, utilizando como modelo el embrión bovino. A partir de los distintos experimentos realizados, se obtuvieron los siguientes resultados principales:

i) La suplementación con AAL en diferentes concentraciones durante los 7 días de cultivo *in vitro* (CIV) de ovocitos provenientes de matadero evidenció que:

- AAL 2,5 μM mejoró el número total de células en los blastocistos.
- AAL (7,5, 25 y 100 μM AAL) tuvieron efectos perjudiciales sobre el desarrollo embrionario, observándose una disminución de número de embriones producidos, menor tasa de eclosión, y una reducción del número total de células.
- La actividad de AAL se vio modulada por las condiciones de cultivo (niveles de O_2 , presencia de SFB y aa).

ii) AAL (2,5 μM) suplementado en el mAGE empleando ovocitos de matadero resultó en:

- Una mejora en la tasa de blastocistos y en el número total de células (indicador de calidad embrionaria).
- Un aumento en la tasa de eclosión.
- Una disminución en los niveles de EROs en blastocistos vitrificados y calentados.

iii) AAL (2,5 μM) suplementado en el MAGE empleando ovocitos de matadero resultó en:

- Un aumento en el número total de células en blastocistos.
- Una disminución en los niveles de EROs intracelulares y un aumento en los niveles de GSH en los embriones al día 4 de cultivo.

iv) AAL (2,5 μ M) suplementado en el mAGE empleando ovocitos de OPU:

- No mostró diferencias significativas en el desarrollo embrionario con respecto al control.

v) AAL (2,5 μ M) suplementado en el MAGE empleando ovocitos de OPU:

- Aumentó la tasa de blastocistos, con una tendencia a aumentar el número total de células por embrión.

Podemos concluir que la administración de AAL durante diferentes períodos de cultivo genera distintos efectos en el desarrollo embrionario de bovinos, tanto en la tasa como en la calidad de los embriones obtenidos. Además, observamos que el origen de los ovocitos que se emplean para un protocolo de PIV también influye en el efecto de AAL. Teniendo en cuenta los datos obtenidos, se sugiere que la suplementación con AAL en el medio de CIV durante la fase de MAGE podría dar resultados promisorios en un protocolo de OPU-PIV, representando no solo un aporte al conocimiento sino además una apuesta por mejorar las biotecnologías reproductivas.

Por otra parte, cabe destacar que la presente Tesis Doctoral aporta evidencia sólida sobre el potencial del AAL como agente antioxidante en la biotecnología reproductiva y sienta bases para futuras investigaciones orientadas a optimizar las condiciones de cultivo embrionario, relacionadas con:

- Estudios del efecto antioxidante del AAL en las soluciones de vitrificación/calentamiento para embriones.

- Estudios de expresión génica para dilucidar los mecanismos precisos por los cuales el AAL influye en la calidad embrionaria.
- Estudios de la funcionalidad mitocondrial embrionaria en presencia de AAL.
- Estudios a campo con transferencia embrionaria, para evaluar las tasas de preñez y nacimiento luego del tratamiento con AAL en el protocolo OPU-PIV.



Anexo I

Listado del equipamiento usado en el desarrollo de este trabajo:

- 1- Estereomicroscopio binocular (Diaphot, Nikon, Tokio, Japón).
- 2- Incubadora gaseada (Thermo Scientific).
3. Cámara de cultivo a 39 °C con ambiente gaseado con de 5 % (v/v) de CO₂ y 7 % (v/v) de O₂ en aire humidificado (Modular Incubator Chamber, Bishops-Rothenberg Inc. USA).
4. Platinas térmicas (Sistel).
5. Campana de flujo laminar (Esco Class II BSC).
6. Baño termostático de agua (Vicking modelo Masson).
7. Cámara de Neubauer (Marienfeld Superior Germany).
8. Termo de nitrógeno líquido (MVE Millenium xc 47/11).
9. Ecógrafo (Mindray Dp 10 Ultrasound Scanner) con transductor micro-convexo con guía de aspiración (Watanabe Applied Technology, Brazil).
10. Bomba de vacío (Cook Veterinary Products, Queensland, Australia).
11. Incubadora transportadora (MiniTube).
12. Microscopio de fluorescencia (Olympus BX40).
13. Microscopio óptico (Olympus BH-2).
14. Balanza granataria (Mettler Toledo).
15. pHmetro (Mettler Toledo).
16. Vórtex (Dragon Lab MX-S).
17. Lector de ELISA EZRead (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido).
18. Lupas Estereoscópicas (Nikon SMZ 800).
19. Microcentrifuga (Thermo Scientific MySpin 12).
20. Pipetas y materiales descartables (Eppendorf, Gibco y Corning).

Anexo II

Reactivos utilizados:

Compuesto	CASRN o N° de catálogo	Origen
5,50-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)	69-78-3	Sigma Chemical Co.
β-estradiol	50-28-2	Sigma Chemical Co.
Aceite mineral	8042-47-5	Thermo Fisher Scientific.
Ácido Tiobarbiturico (TBA)	504-17-6	Sigma Chemical Co.
Agua ultrapura	7732-18-5	Sigma Chemical Co.
Albúmina de suero bovino libre de Ácidos Grasos (BSA – FAF)	9048-46-8	Sigma Chemical Co.
Alpha lipoic acid	1077-28-7-T1395 Peso molecular: 206,33 gr/mol Solubilidad: 50mg/ml de ETOH	Sigma Chemical Co.
b-Nicotinamida adenina dinucleótido 2'-fosfato reducido tetra-sodio sal hidrato	2646-71-1	Sigma Chemical Co.
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	144-55-8	Sigma Chemical Co.
Bradford	B-6916	Sigma Chemical Co.

Cloruro de calcio dihidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O)	10035-04-8	Sigma Chemical Co.
Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl ₂ .6H ₂ O)	7791-18-6	Sigma Chemical Co.
Cloruro de potasio (KCl)	7447-40-7	Sigma Chemical Co.
Cloruro de sodio (NaCl)	7647-14-5	Sigma Chemical Co.
Dextrosa	50-99-7	Sigma Chemical Co.
Dimetilsulfóxido (DMSO)	67-68-5	Sigma Chemical Co.
Estreptomina	3810-74-0	Sigma Chemical Co.
Etanol (ETOH)	64-17-5	Merck Kga A
Etilenglicol (EG)	107-21-1	Sigma Chemical Co.
Hormona Folículo Estimulante (FSH)	9002-68-0	Bioniche (Belleville, Ontario, Canadá)
Fluorescein diacetate (FDA)	596-09-8	Sigma Chemical Co.
Formaldehído 37%	50-00-0	Sigma Chemical Co.
Fosfato de sodio monobásico monohidratado (NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O)	10049-21-5	Sigma Chemical Co.
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	7778-77-0	Sigma Chemical Co.
Glutamina	56-85-9	Sigma Chemical Co.
Glutathione reductase H	9001-48-3	Sigma Chemical Co.
Glutathión (GSH)	70-18-8	Sigma Chemical Co.

Heparina	9041-8-1	Sigma Chemical Co.
Heparina sódica	B01AB01 M2	Veinifar, Argentina
HEPES (free acid)	7365-45-9	Sigma Chemical Co.
HEPES (salt Na)	75277-39-3	Sigma Chemical Co.
Hipotaurina	300-84-5	Sigma Chemical Co.
Hoechst 33342	R37165	Invitrogen™.
Kanamicina	25389-94-0	Sigma Chemical Co.
L-Glutathione oxidized disodium salt	103239-24-3	Sigma Chemical Co.
Lactato de Sodio	72-17-3	Sigma Chemical Co.
Malondialdehido (MDA)	100683-54-3	Sigma Chemical Co.
MEM-EAA	11130051	Gibco™.
NEAAS	11140050	Gibco™.
Penicilina	69-57-8	Sigma Chemical Co.
Piruvato	113-24-6	Sigma Chemical Co.
RANDOX	SD125	Randox Lab.
Rojo de fenol	34487-61-1	Sigma Chemical Co.
Solucion salina tamponada con fosfato (PBS)	DC1901	Serendipia Lab., Argentina
Suero Fetal Bovino (SFB)	16000-069	Gibco™.
Superóxido dismutasa (SOD)	9054-89-1	Sigma Chemical Co.

TCM 199	11554426	Gibco™.
TCM - 199 HEPES	11570596	Gibco™.
Tri- chloroacetic acid (TCA)	76-03-9	Sigma Chemical Co.
TUNEL In Situ Cell death Detection Fluorescein	7791-13-1	Roche Diagnosis

Anexo III

Medios de PIV

- *Medio de Mantenimiento:* HEPES-199 (TCM-199 con 15 mM ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinaetanosulfónico + 10 % SFB.
- *Medio de Miv:* TCM-199 suplementado con 10 % (v/v) de SFB, 1 µg/ml de FSH, 0,2 mM piruvato de sodio, 1 mM glutamina 1 µg/ml de 17 β-estradiol.
- *Medio de Fiv:* medio Fert-TALP (Tyrode con lactato, piruvato y albúmina) suplementado con 2 % (v/v) de aminoácidos esenciales (MEM-EAA), 1 % (v/v) de aminoácidos no esenciales (MEM-NEAA), 6 mg/ml de albúmina libre de ácidos grasos (BSA-FAF), 20 µM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina y 10 mg/ml de sulfato de heparina.
- *Medio de Civ:* medio SOF (fluido oviductal sintético; Tervit et al., 1972) suplementado con 1 mM de glutamina, 2 % (v/v) de MEM-EAA, 1 % (v/v) de MEM-NEAA y 8 mg/ml BSA-FAF. La osmolaridad del medio de cultivo completo fue de 274-276 mOsm/kg.
- *Medio TL:* HEPES-TALP suplementado con 3 mg/ml BSA-FAF.

Procesamiento de semen:

- *Gradiente de Percoll:* El semen se procesó mediante un gradiente de Percoll. El *Percoll* es una solución coloidal isotónica compuesta por partículas de sílica recubiertas de polivinilpirrolidona diluidas en medio buffer (TALP). La columna de densidad se preparó a partir de *Percoll* al 100 %, del cual se obtuvieron las soluciones al 45% y 90% mediante dilución en medio HEPES-TALP.

Medios de criopreservación:

- *Medio de Mantenimiento (MM)*: TCM 199-HEPES + 20% SFB.
- *Medio de Sacarosa (SM)*: 0,5 M de sacarosa y TCM 199-HEPES.

A partir de estos medios, se prepararon las soluciones de vitrificación y calentamiento:

- Solución de Vitrificación 1 (SV1): 850 μ l MM + 7,5 % etilenglicol (EG) + 7,5 % DMSO.
- Solución de Vitrificación 2 (SV2): 670 μ l MS + 16,5 % EG + 16,5 % DMSO.
- Solución de Calentamiento 1 (SC1): 800 μ l MM + 400 μ l MS (0,25 M).
- Solución de Calentamiento 2 (SC2): 800 μ l MM + 200 μ l MS (0,15 M).

Bibliografía

Abdelrazik, H., Sharma, R., Mahfouz, R., & Agarwal, A. (2009). L-carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertility and sterility*, 91(2), 589-596.

Abdel-Wahab, A., Aziz, R. L. A., Helmy, N. A., & Ibrahim, S. S. (2018). The impact of using newborn bovine serum as fetal calf serum substitute in the in vitro bovine embryos production system. *Porto Biomedical Journal*, 3(2), e3.

Abe, H., Shiku, H., Aoyagi, S., & Hoshi, H. (2004). In vitro culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. *Journal of Mammalian Ova Research*, 21(1), 22-30.

Abe, H., Yamashita, S., Itoh, T., Satoh, T., & Hoshi, H. (1999). Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and-fertilized oocytes: Comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 53(3), 325-335.

Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., & Hoshi, H. (2002). Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Molecular reproduction and development*, 61(1), 57-66.

Adams GP, Singh J. (2015). Ovarian Follicular and Luteal Dynamics in Cattle. Book Editor(s):Richard M. Hopper DVM, Diplomate ACT.

- Aerts**, J. M. J., & Bols, P. E. J. (2010). Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reproduction in domestic animals*, 45(1), 171-179.
- Aguila**, L., Treulen, F., Therrien, J., Felmer, R., Valdivia, M., & Smith, L. C. (2020). Oocyte selection for in vitro embryo production in bovine species: noninvasive approaches for new challenges of oocyte competence. *Animals*, 10(12), 2196.
- Ahumada**, C. J., Salvador, I., Cebrián-Serrano, A., Lopera, R., & Silvestre, M. A. (2013). Effect of supplementation of different growth factors in embryo culture medium with a small number of bovine embryos on in vitro embryo development and quality. *Animal*, 7(3), 455-462.
- Albertini**, D. F. (1992). Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 296(1-2), 57-68.
- Ali**, A. A., Bilodeau, J. F., & Sirard, M. A. (2003). Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology*, 59(3-4), 939-949.
- Almansa-Ordonez**, A., Bellido, R., Vassena, R., Barragan, M., & Zambelli, F. (2020). Oxidative stress in reproduction: a mitochondrial perspective. *Biology*, 9.
- Alvarez**, J. G., Minaretzis, D., Barrett, C. B., Mortola, J. F., & Thompson, I. E. (1996). The sperm stress test: a novel test that predicts pregnancy in assisted reproductive technologies. *Fertility and sterility*, 65(2), 400-405.
- Amoushahi**, M., Salehnia, M., & Hosseinkhani, S. (2013). The effect of vitrification and in vitro culture on the adenosine triphosphate content and mitochondrial distribution of mouse pre-implantation embryos. *Iranian Biomedical Journal*, 17(3), 123–128.

- Andrade** GM, Collado M del, Meirelles FV, Silveira JC da, Perecin F, Andrade GM, Collado M del, Meirelles FV, Silveira JC da, Perecin F. (2019). Intrafollicular barriers and cellular interactions during ovarian follicle development. *Anim. Reprod.*16: 485–496.
- Asgari**, V., Hosseini, S. M., Forouzanfar, M., Hajian, M., & Nasr-Esfahani, M. H. (2012). Vitrification of in vitro produced bovine embryos: Effect of embryonic block and developmental kinetics. *Cryobiology*, 65(3), 278–283.
- Attia**, M., Essa, E. A., Zaki, R. M., & Elkordy, A. A. (2020). An overview of the antioxidant effects of ascorbic acid and alpha lipoic acid (in liposomal forms) as adjuvants in cancer treatment. *Antioxidants*, 9(5), 359.
- Austin**, C. R. (1948a). Function of hyaluronidase in fertilization. *Nature*, 162(4106), 63-64.
- Austin**, C. R. (1948b). Number of sperms required for fertilization. *Nature*, 162(4118), 534-535.
- Austin**, C.R. (1951). Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Australian journal of biological sciences*, 4(4), 581-596.
- Baker**, T. G., & Franchi, L. L. (1967). The fine structure of chromosomes in bovine primordial oocytes. *Reproduction*, 14(3), 511-513.
- Barnes**, F. L., & First, N. L. (1991). Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Molecular reproduction and development*, 29(2), 117-123.
- Barnett**, D. K., & Bavister, B. D. (1996). What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence?. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 43(1), 105-133.
- Baroux**, C., Autran, D., Gillmor, C. S., Grimanelli, D., & Grossniklaus, U. (2008, January). The maternal to zygotic transition in animals and plants. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 73, pp. 89-100). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Bavister, B. D.** (1995). Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human reproduction update*, 1(2), 91-148.
- Bavister, B. D., & Squirrell, J. M.** (2000). Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Human reproduction*, 15(suppl_2), 189-198.
- Berglund, B.** (2008). Genetic improvement of dairy cow reproductive performance. *Reproduction in domestic animals*, 43, 89-95.
- Betts, D. H., & Madan, P.** (2008). Permanent embryo arrest: Molecular and cellular concepts. *Molecular Human Reproduction*, 14(8), 445–453.
- Biewenga, G. P., and Bast, A.** (1995). Reaction of lipoic acid with ebselen and hypochlorous acid. *Methods in Enzymology*, 251, 303-314.
- Biggers, J. D., & Stern, S.** (1973). Metabolism of the preimplantation embryo. *Adv. Rep & Physiol.*, 6, 1-59.
- Bilodeau-Goeseels, S., & Panich, P.** (2002). Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 71(3-4), 143-155.
- Blanco, M.R., Demyda, S., Moreno Millán, M., Genero, E.** (2012). Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: a review. *Anim. Reprod. Sci.* 9 (3), 281–289.
- Blandau, R. J., & Odor, D. L.** (1949). The total number of spermatozoa reaching various segments of the reproductive tract in the female albino rat at intervals after insemination.
- Bó, G. A., Cedeño, A., & Mapletoft, R. J.** (2019). Strategies to increment in vivo and in vitro embryo production and transfer in cattle. *Animal Reproduction*, 16, 411–422.
- Bondioli, K.** (2014). Cryopreservation of bovine embryos. *Bovine reproduction*, 718-722.

- Boni**, R., Tosti, E., Roviello, S., & Dale, B. (1999). Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. *Biology of reproduction*, 61(4), 1050-1055.
- Boone** W.R. and Shapiro .S.S. (1990). Quality control in the in vitro fertilization laboratory. *Theriogenology*, 33, 23-50.
- Brackett**, B. G. and Oliphant, G. (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 12:260-274.
- Brackett**, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., & Evans, J. F. (1981). Pregnancy following cow in vitro fertilization. *Biol. Reprod.*, 34(1), 173-190.
- Brackett**, B. G., Oh, Y. K., Evans, J. F. and Donawick, W. J. (1977). Bovine fertilization and early development in vivo and in vitro. 10th Ann. Mtg. Soc. Study Reprod., Abstr. 86, 56-57.
- Bradford**, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Breining**, E., Cetica, C., and Beconi, M. (2010). Capacitation inducers act through diverse intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm. *Theriogenology* 74: 1036–1049.
- Budras** K-D. (2003). *Bovine Anatomy: An Illustrated Text*. Hannover, Germany: Schlütersche.
- Bukovsky** A, Caudle MR, Svetlikova M, Upadhyaya NB. (2004). Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2: 20.
- Caamaño**, J. N., Gomez, E., & Trigal, B. (2015). Survival of vitrified in vitro-produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure. *Theriogenology*, 83(5), 881–890.

Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology and medicine*, 29(3-4), 222-230.

Cajas, Y. N., Cañón-Beltrán, K., Núñez-Puente, C., Gutierrez-Adán, A., González, E. M., Agirregoitia, E., & Rizos, D. (2021). Nobiletin-induced partial abrogation of deleterious effects of AKT inhibition on preimplantation bovine embryo development in vitro †. *Biology of Reproduction*, 105, 1427–1442.

Çakatay, U. (2006). Pro-oxidant actions of α-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Med. Hypotheses* 66, 110–117.

Çakatay, U., Kayalı, R., Sivas, A., Tekeli, F. (2005). Prooxidant activities of α-lipoic acid on oxidative protein damage in the aging rat heart muscle. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 40, 231–240.

Campbell, B. K., Picton, H. M., Mann, G. E., McNeilly, A. S., & Baird, D. T. (1991). Effect of steroid-and inhibin-free ovine follicular fluid on ovarian follicles and ovarian hormone secretion. *Reproduction*, 93(1), 81-96.

Cañón-Beltrán, K., Cajas, Y. N., Pérez-Cerezales, S., Leal, C. L. V., Agirregoitia, E., Gutierrez-Adan, A., González, E. M., & Rizos, D. (2021). Nobiletin enhances the development and quality of bovine embryos in vitro during two key periods of embryonic genome activation. *Scientific Reports*, 11, 11796.

Carrillo-González, D. F., Rodríguez-Osorio, N., Long, C. R., Vásquez-Araque, N. A., & Maldonado-Estrada, J. G. (2020). L-carnitine supplementation during in vitro maturation and in vitro culture does not affect the survival rates after vitrification and warming but alters Inf-T and ptgs2 gene expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5601.

Chang, C. C., Shapiro, D. B., & Nagy, Z. P. (2022). The effects of vitrification on oocyte quality. *Biology of Reproduction*, 106(2), 316–327.

Chang, M. C. (1968). In vitro fertilization of mammalian eggs. *Journal of Animal Science*, 27(suppl_1), 15-21.

Cheng, S., Altmepfen, G., So, C., Welp, L. M., Penir, S., Ruhwedel, T., ... & Schuh, M. (2022). Mammalian oocytes store mRNAs in a mitochondria-associated membraneless compartment. *Science*, 378(6617), eabq4835.

Corcoran, D., Fair, T., Park, S., Rizos, D., Patel, O. V., Smith, G. W., ... & Lonergan, P. (2006). Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. *Reproduction*, 131(4), 651-660.

Correa, G.A., Rumpfa, R., Duarte Mundim, T.C., Franco, M.M., Dode, M. (2008). Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Anim. Reprod. Sci.* 104, 132–142.

Crosier, A. E., Farin, P. W., Dykstra, M. J., Alexander, J. E., & Farin, C. E. (2000). Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced in vivo or in vitro. *Biology of reproduction*, 62(5), 1459-1465.

Crowley, L. C., Marfell, B. J., & Waterhouse, N. J. (2016). Analyzing cell death by nuclear staining with Hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(9).

De La Fuente, R. (2006). Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Developmental biology*, 292(1), 1-12.

de Lima, C. B., Dos Santos, É. C., Ispada, J., Fontes, P. K., Nogueira, M. F. G., Dos Santos, C. M. D., & Milazzotto, M. P. (2020). The dynamics between in vitro culture and metabolism: embryonic adaptation to environmental changes. *Scientific Reports*, 10(1), 15672.

de Matos, D. G., & Furnus, C. C. (2000). The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: Effect of betamercaptoethanol, cysteine, and cystine. *Theriogenology*, 53(3), 761–771.

De Sousa, P. A., Caveney, A., Westhusin, M. E., & Watson, A. J. (1998a). Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. *Theriogenology*, 49(1), 115-128.

de Souza Rocha-Frigoni, N. A., da Silva Leão, B. C., Nogueira, É., Accorsi, M. F., & Mingoti, G. Z. (2015). Effects of gaseous atmosphere and antioxidants on the development and cryotolerance of bovine embryos at different periods of in vitro culture. *Zygote*, 23(2), 159-168.

De Souza, D. K., Salles, L. P., & Rosa e Silva, A. A. M. (2015). Aspects of energetic substrate metabolism of in vitro and in vivo bovine embryos. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(3), 191-197.

Delgobo, M., Agnes, J. P., Goncalves, R. M., Dos Santos, V. W., Parisotto, E. B., Zamoner, A., & Zanotto-Filho, A. (2019). N-acetylcysteine and alpha-lipoic acid improve antioxidant defenses and decrease oxidative stress, inflammation and serum lipid levels in ovariectomized rats via estrogen-independent mechanisms. *The Journal of nutritional biochemistry*, 67, 190-200.

Dictier, N., Zecharia, M., Tirosh, O. (2002). α -Lipoic acid inhibits glycogen synthesis in rat soleus muscle via its oxidative activity and the uncoupling of mitochondria. *J. Nutr.* 132, 3001–3006.

Dissanayake, K., Nömm, M., Lättekivi, F., Ressaissi, Y., Godakumara, K., Lavrits, A., Midekessa, G., Viil, J., Bæk, R., Jørgensen, M. M., Bhattacharjee, S., Andronowska, A., Salumets, A., Jaakma, Ü., & Fazeli, A. (2020). Individually cultured bovine embryos produce extracellular vesicles that have the potential to be used as non-invasive embryo quality markers. *Theriogenology*, 149, 104–116.

Do, V. H., Catt, S., Kinder, J. E., Walton, S., & Taylor-Robinson, A. W. (2019). Vitrification of in vitro-derived bovine embryos: Targeting enhancement of quality by refining technology and standardizing procedures. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(5), 837–846.

Donnay, I., & Leese, H. J. (1999). Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 53(2), 171-178.

Donnay, I., Partridge, R. J., & Leese, H. J. (1999). Can embryo metabolism be used for selecting bovine embryos before transfer? *Reproduction, Nutrition, Development*, 39, 523–533.

Dos Anjos, M. M., de Paula, G. R., Yokomizo, D. N., Costa, C. B., Bertozzi, M. M., Verri Jr, W. A., ... & Seneda, M. M. (2025). Effect of Alpha-Lipoic Acid on the Development, Oxidative Stress, and Cryotolerance of Bovine Embryos Produced In Vitro. *Veterinary Sciences*, 12(2), 120.

Dos Santos, E. C., da Fonseca Junior, A. M., de Lima, C. B., Ispada, J., da Silva, J. V. A., & Milazzotto, M. P. (2021). Less is more: reduced nutrient concentration during in vitro culture improves embryo production rates and morphophysiology of bovine embryos. *Theriogenology*, 173, 37-47.

Dos Santos, E. C., Varchetta, R., De Lima, C. B., Ispada, J., Martinho, H. S., Fontes, P. K., ... & 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.

Dowling, D. K., & Simmons, L. W. D. K. (2009). Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1663), 1737–1745.

Driancourt, M. A. (1991). Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, 35(1), 55-79.

Driancourt, M.A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55(6), 1211-1239.

- Duby** RT, Hill JL, O'Callaghan D, Overstrom EW, Boland MP. (1997). Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. *Theriogenology*, 47, 332.
- Dumollard**, R., Carroll, J., Duchen, M. R., Campbell, K., & Swann, K. (2009). Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 346–353.
- Dumollard**, R., Duchen, M., & Carroll, J. (2007). The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Current Topics in Developmental Biology*, 77, 21–49.
- Dupre**, S.; Spoto, G.; Matarese, R. M.; Orlando, M.; Cavallini, D. (1980). Biosynthesis of lipoic acid in the rat: Incorporation of 3sSand J4C-labeled precursors. *Arch. Biochem. Biophys.* 202:361-365.
- Elomda** AM, Saad MF, Saeed AM, Elsayed A, Abass AO, Safaa HM and Mehaisen GMK (2018). Antioxidant and developmental capacity of retinol on the in vitro culture of rabbit embryos. *Zygote* 26, 326–32.
- Erdem**, H., Karasahin, T., Alkan, H., Dursun, S., Satilmis, F., & Guler, M. (2020). Effect of embryo quality and developmental stages on pregnancy rate during fresh embryo transfer in beef heifers. *Tropical Animal Health and Production*, 52, 2541–2547.
- Erickson**, B. H. (1966). Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of animal science*, 25(3), 800-805.
- Erickson** GF. (2000). The Graafian Follicle: A Functional Definition. En: *Ovulation*, Nueva York, EEUU, Springer New York, p. 31–48.
- Fair**, T. (2003). Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal reproduction science*, 78(3-4), 203-216.
- Fair**, T., Hulshof, S. C. J., Hyttel, P., Boland, M., & Greve, T. (1997). Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*, 195, 327–336.

Fair, T., Hyttel, P., & Greve, T. (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular reproduction and development*, 42(4), 437-442.

Fair, T., Lonergan, P., Dinnyes, A., Cottell, D. C., Hyttel, P., Ward, F. A., & Boland, M. P. (2001). Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. *Molecular Reproduction and Development*, 58, 186–195.

Fayyaz, M. H., Ahmad, M., & Ahmad, N. (2017). Survival of buffalo bull spermatozoa: Effect on structure and function due to alpha-lipoic acid and cholesterol-loaded cyclodextrin. *Andrologia*, 49(4).

Fekete, E., and Dvran-Reynalds, F. (1943). *Proc. Soc. Exp. Biol., N.Y.* 52: 119.

Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991-1004.

Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: Reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14, 991–1004.

Ferré, L.B., Kjelland, M.E., Strøbech, P., Hyttel, P., Mermillod, P., Ross, P.L. (2019). Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology.

Ferreira T, & Rasb W. (2012). ImageJ user guide: IJ 1.46 r.

Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., & Navarro, P. A. D. A. S. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71(5), 836-848.

Fischer, B., & Bavister, B. D. (1993). Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Reproduction*, 99(2), 673-679.

Florman HM and Wassarman PM (1985) O-Linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity *Cell* 41 313–324.

Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Crowe MA. (2011). Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 124: 163–169.

Frei, R. E., Schultz, G. A., & Church, R. B. (1989). Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8–16-cell-stage of embryogenesis in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, 86, 637–641.

Freour, T., & Vassena, R. (2017). Transcriptomics analysis and human preimplantation development. *Journal of Proteomics*, 162, 135-140.

Fukui, Y., McGowan, L., James, R. et al. (1991). Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 92: 125–131.

Fulka Jr, J., First, N. L., & Moor, R. M. (1998). Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Molecular human reproduction*, 4(1), 41-49.

Furnus, C. C., Valcarcel, A., Dulout, F. N., & Errecalde, A. L. (2003). The hyaluronic acid receptor (CD44) is expressed in bovine oocytes and early stage embryos. *Theriogenology*, 60(9), 1633-1644

Gad, A., Schellander, K., Hoelker, M., Tesfaye, D., 2012. Transcriptome profile of early mammalian embryos in response to culture environment. *Anim. Reprod. Sci.* 134, 76–83

Gandolfi, F. (1994). Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology* 41, 95–100.

Gandolfi, F., and Moor, R. M. (1987). Stimulation of early embryonic development in sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.* 81, 23–8.

Gardiner, C. S., & Reed, D. J. (1995). Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. *Archives of biochemistry and biophysics*, 318(1), 30-36.

Gardiner, C.S., Reed, D.J. (1994). Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biol. Reprod.* 51 (6), 1307–1314.

Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB. Physiology and culture of the human blastocyst. *J Reprod Immunol* 2002;55 (1-2):85–100.

Gardner, D. K. (1994). Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biology International*, 18(12), 1163-1180.

Gardner, D. K. (1998). Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*, 49(1), 83-102.

Gardner, D. K. (2021). Embryo development and culture techniques. *Animal Breeding*, 13-46.

Gardner, D. K., & Lane, M. (1998). Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Human reproduction*, 13(suppl_3), 148-159.

Gardner, D. K., & Lane, M. (2005). Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting. *Reproduction, Fertility and Development*, 17(3), 361–370.

Gardner, D. K., Lane, M., Spitzer, R., and Batt, P. (1994). Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol. Reprod.* 50, 390–400.

Gardner, D. K., Pool, T. B., & Lane, M. (2000). Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 18, No. 02, pp. 205-218).

- Gaviria**, S. M., Morado, S. A., Herrera, A. L., Betancur, G. R., Álvarez, R. A. U., Zuluaga, J. E., & Cética, P. D. (2019). Resveratrol supplementation promotes recovery of lower oxidative metabolism after vitrification and warming of in vitro-produced bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(3), 521-528.
- Ginther**, O. J., Wiltbank, M. C., Fricke, P. M., Gibbons, J. R., & Kot, K. (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of reproduction*, 55(6), 1187-1194.
- Gomes**, R. G., Silva, C. B., González, S. M., Oliveira, R. L., Max, M. C., Lisboa, L. A., ... & Seneda, M. M. (2018). Alpha lipoic acid (ALA) effects on developmental competence of equine preantral follicles in short-term culture. *Theriogenology*, 105, 169-173.
- Gopichandran**, N., & Leese, H. J. (2003). Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid. *Reproduction*, 126(3), 299-308.
- Goraça**, A., Huk-Kolega, H., Piechota, A., Kleniewska, P., Ciejka, E., & Skibska, B. (2011). Lipoic acid—biological activity and therapeutic potential. *Pharmacological Reports*, 63(4), 849-858.
- Goto**, K., Iwai, N., Ide, K. et al. (1994). Viability of one-cell bovine embryos cultured in vitro: Comparison of cell-free culture and co-culture. *J. Reprod. Fertil.* 100: 239–243.
- Goto**, Y., Noda, Y., Mori, T., & Nakano, M. (1993). Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, 15(1), 69-75.
- Götz**, M. E., Dirr, A., Burger, R., Janetzky, B., Weinmüller, M., Chan, W. W., ... & Riederer, P. (1994). Effect of lipoic acid on redox state of coenzyme Q in mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine and diethyldithiocarbamate. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, 266(3), 291-300.

Grealy, M., Diskin, M. G., & Sreenan, J. M. (1996). Protein content of cattle oocytes and embryos from the two-cell to the elongated blastocyst stage at day 16. *Reproduction*, 107(2), 229-233.

Hafez E.S.E (1996) Reproducción e inseminación artificial en animales 542 pp (Ed Interamericana, 6ta edición)

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (Eds.). (1989). Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon Press.

Han, D., Handelman, G., Marcocci, L., Sen, C. K., Roy, S., Kobuchi, H., Tritschler, H. J., Flohé, L., & Packer, L. (1997). Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. *Biofactors*, 6, 321–338.

Hanada, A., Enya, Y., & Suzuki, T. (1986). Birth of calves by non-surgical transfer of in vitro fertilized embryos obtained from oocytes matured in vitro. *Japanese Journal of Animal Reproduction*, 32, 208 (Abstract).

Handelman, G. J., Han, D., Tritschler, H., & Packer, L. (1994). α -Lipoic acid reduction by mammalian cells to the dithiol form and release into the culture medium. *Biochemical Pharmacology*. (En prensa).

Hansen, P. J. (2014). Current and future assisted reproductive technologies for mammalian farm animals. *Current and future reproductive technologies and world food production*, 1-22.

Hansen, P. J. (2020). The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle—Why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? *Journal of Animal Science*, 98, skaa288.

Hardy, K. (1997). Cell death in the mammalian blastocyst. *Molecular Human Reproduction*, 3(10), 919-925.

Harter, B. T. (1948).-Anat. Rec. 102: 349

Harvey, A. J. (2007). The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Animal reproduction science*, 98(1-2), 113-128.

Hasler, J. F., & Barfield, J. P. (2021). In vitro fertilization. *Bovine reproduction*, 1124-1141.

Hasler, J. F., Henderson, W. B., Hurtgen, P. J., Jin, Z. Q., McCauley, A. D., Mower, S. A., ... & Trimmer, S. A. (1995). Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43(1), 141-152.

Hasler, J. F., McCauley, A. D., Lathrop, W. F., & Foote, R. H. (1987). Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, 27(1), 139-168.

Hassan, B. M. S., Fang, X., Roy, P. K., Shin, S. T., & Cho, J. K. (2017). Effect of alpha lipoic acid as an antioxidant supplement during in vitro maturation medium on bovine embryonic development. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 32, 123–130.

Hassan, B. M., Fang, X., Roy, P. K., Shin, S. T., & Cho, J. K. (2017). Effect of alpha lipoic acid as an antioxidant supplement during in vitro maturation medium on bovine embryonic development. *Journal of Embryo Transfer*, 32(3), 123-130.

Hatami, S., Zavareh, S., Salehnia, M., Lashkarbolouki, T., Ghorbanian, M. T., & Karimi, I. (2014). Total oxidative status of mouse vitrified pre-antral follicles with pretreatment of alpha lipoic acid. *Iranian Biomedical Journal*, 18(3), 181–188.

Havlicek, V., Kuzmany, A., Cseh, S., Brem, G., & Besenfelder, U. (2010). The effect of long-term in vivo culture in bovine oviduct and uterus on the development and cryo-tolerance of in vitro produced bovine embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(5), 832-837.

He, Y., Wang, Y., Zhang, H., Zhang, Y., & Quan, F. (2021). Alpha-lipoic acid improves the maturation and the developmental potential of goat oocytes in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, 56, 545–554.

- Himaki T, Hano K. (2023).** Effects of alpha lipoic acid treatment during in vitro maturation on the development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Animal Science Journal*, 94(1), e13889.
- Holm, P., Booth, P. J., Schmidt, M. H., Greve, T., & Callesen, H. (1999).** High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, 52(4), 683-700.
- Hoshi, H. (2003).** In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology*, 59(2), 675-685.
- Hosseini, S. M., Forouzanfar, M., Hajian, M., Asgari, V., Abedi, P., Hosseini, L., ... & Nasr-Esfahani, M. H. (2009).** Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important?. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26, 355-364.
- Houghton, F. D. (2006).** Energy metabolism of the inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. *Differentiation*, 74, 11–18.
- Houghton, F. D., Humpherson, P. G., Hawkhead, J. A., Hall, C. J., & Leese, H. J. (2003).** Na⁺, K⁺, ATPase activity in the human and bovine preimplantation embryo. *Developmental Biology*, 263, 360–366.
- Hu, J., Cheng, D., Gao, X., Bao, J., Ma, X., & Wang, H. (2012).** Vitamin C enhances the in vitro development of porcine pre-implantation embryos by reducing oxidative stress. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 873–879.
- Hu, J.H., Sun, X.Z., Li, Q.W., Zhang, T., Hu, X.C., Hu, J.H. & Wang, L.Q. (2013).** The effect of Laminaria japonica polysaccharide on sperm characteristics and biochemical parameters in cryopreserved boar sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 139, 95–100.

Hulshof, S. C. J., Bevers, M. M., van der Donk, H. A., & van den Hurk, R. (1992). The isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. In Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction (Vol. 1, pp. 336–338). The Hague.

Humblot, P., Le Bourhis, D., Fritz, S., Colleau, J. J., Gonzalez, C., Guyader Joly, C., Malafosse, A., Heyman, Y., Amigues, Y., Tissier, M., et al. (2010). Reproductive technologies and genomic selection in cattle. *Veterinary Medicine International*, 2010, 192787.

International Embryo Transfer Society—IETS (2022). Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals.

Iritani, A. and Niwa, K. (1977). Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.* 50:119-121.

Jiang, Y., Hansen, P. J., Xiao, Y., Amaral, T. F., Vyas, D., & Adesogan, A. T. (2019). Aflatoxin compromises development of the preimplantation bovine embryo through mechanisms independent of reactive oxygen production. *Journal of Dairy Science*, 102(11), 10506–10513.

Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 428: 145–150.

Johnson, M. T., Mahmood, S., & Patel, M. S. (2003). Intermediary metabolism and energetics during murine early embryogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 31457–31460.

Jones, G. M., Trounson, A. O., Gardner, D. K., Kausche, A., Lolatgis, N., & Wood, C. (1998). Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Human Reproduction*, 13(1), 169–177.

Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: Outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 4642.

Kagan, V. E.; Serbinova, E. A.; Forte, T.; Scita, G.; Packer, L. (1992). Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, 33(3), 385-397.

Kagan, V., Serbinova, E., & Packer, L. (1990). Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 169, 851–857.

Kang, Y. H., and Hyun, S. H. (2017). Effect of alpha lipoic acid on in vitro maturation of porcine oocytes and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation. *Journal of Embryo Transfer*, 32(4), 267-274.

Kaňka, J., Kepkova, K., & Němcová, L. (2009). Gene expression during minor genome activation in preimplantation bovine development. *Theriogenology*, 72(4), 572-583.

Karadjole, M., Getz, I., Samardžija, M., Mačesić, N., Matković, M., Makek, Z., Karadjole, T., Bačlić, G., Dobranić, T., & Poletto, M. (2010). The developmental competence of bovine immature oocytes and quality of embryos derived from slaughterhouse ovaries or live donors by ovum pick up. *Veterinarski Arhiv*, 80, 445–454.

Keane, J. A., & Ealy, A. D. (2024). An overview of reactive oxygen species damage occurring during in vitro bovine oocyte and embryo development and the efficacy of antioxidant use to limit these adverse effects. *Animals*, 14, 59.

Khurana, N. F., & Niemann, H. (2000). Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, 54, 741–766.

Khurana, N. K., & Niemann, H. (2000). Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biology of Reproduction*, 62, 847–856.

- Kim JY.** (2012). Control of ovarian primordial follicle activation. *Clin. Exp. Reprod. Med.* 39: 10–14.
- King, W. A., Niar, A., Chartrain, I., Betteridge, K. J., & Guay, P.** (1988). Nucleolus organizer regions and nucleoli in preattachment bovine embryos. *Reproduction*, 82(1), 87-95.
- Kojima, Y., Tam, O. H., & Tam, P. P. L.** (2014). Timing of developmental events in the early mouse embryo. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 34, 65–75.
- Krisher, R. L., Lane, M., & Bavister, B. D.** (1999). Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biology of Reproduction*, 60, 1345–1352.
- Kruip, T. A. M., & Den Daas, J. H. G.** (1997). In vitro produced and cloned embryos: Effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology*, 47, 43–52.
- Lagalla, C., Barberi, M., Orlando, G., Sciajno, R., Bonu, M. A., & Borini, A.** (2015). A quantitative approach to blastocyst quality evaluation: morphometric analysis and related IVF outcomes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(5), 705–712.
- Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P.** (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in lipid research*, 46(5), 244-282.
- Lambert, R. D., Bernard, C., Rioux, J. E., Ealand, R., D'Amours, D., & Montreuil, A.** (1983). Endoscopy in cattle by the paralumbar route: Technique for ovarian examination and follicular aspiration. *Theriogenology*, 20, 149–161.
- Lane, M., Maybach, J. M., & Gardner, D. K.** (2002). Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. *Human Reproduction*, 17(10), 2686–2693.

Laurincik, J., Thomsen, P. D., Hay-Schmidt, A., Avery, B., Greve, T., Ochs, R. L., & Hyttel, P. (2000). Nucleolar proteins and nuclear ultrastructure in preimplantation bovine embryos produced in vitro. *Biology of Reproduction*, 62(4), 1024–1032. .

Law, A. S., Logue, D. N., O’Shea, T., & Webb, R. (1992). Evidence for the action of bovine follicular fluid factor(s) other than inhibin in suppressing follicular development and delaying estrus in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 96, 603–616.

Leach, E. H. (1947).-Stmn Tech. 22: 73.

Lee S, Jin JX, Taweechaipaisankul A, Kim GA and Lee BC (2018). Synergistic effects of resveratrol and melatonin on in vitro maturation of porcine oocytes and subsequent embryo development. *Theriogenology* 114, 191–8.

Lee, E. S., Fukui, Y., Lee, B. C., Lim, J. M., & Hwang, W. S. (2004). Promoting effect of amino acids added to a chemically defined medium on blastocyst formation and blastomere proliferation of bovine embryos cultured in vitro. *Animal Reproduction Science*, 84(3-4), 257-267.

Lee, M. T., Bonneau, A. R., & Giraldez, A. J. (2014). Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 581–613.

Lee, S. Y., & Song, X. Y. (2004). Evaluation of the Bayesian and maximum likelihood approaches in analyzing structural equation models with small sample sizes. *Multivariate Behavioral Research*, 39(4), 653–686.

Leese, H. J. (1992). Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. In S. R. Milligan (Ed.), *Oxford Reviews of Reproductive Biology* (Vol. 13, pp. 35–72). Oxford University Press.

Leese, H. J. (2002). Quiet please, do not disturb: A hypothesis of embryo metabolism and viability. *BioEssays*, 24, 845–849.

- Leese, H. J.** (2012). Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction*, 143, 417–427.
- Leese, H. J., Alexiou, M., Comer, M. T., Lamb, V. K., and Thompson, J. G.** (1995). Assessment of the embryo nutritional requirements and role of co-culture techniques. In 'Assisted Reproduction. Progress in Research and Practice'. *Adv. Reprod. Endocrinol. Series 7*, 11–23. (Ed. R. W. Shaw.) (Parthenon Publishing: Carnforth, UK.)
- Leese, H. J., Baumann, C. G., Brison, D. R., McEvoy, T. G., & Sturmey, R. G.** (2008). Metabolism of the viable mammalian embryo: Quietness revisited. *Molecular Human Reproduction*, 14, 667–672.
- Lei, T., Guo, N., Tan, M. H., & Li, Y. F.** (2014). Effect of mouse oocyte vitrification on mitochondrial membrane potential and distribution. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science*, 34(1), 99–102.
- Lequarré, A. S., Marchandise, J., Moreau, B., Massip, A., & Donnay, I.** (2003). Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for in vitro produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. *Biology of reproduction*, 69(5), 1707-1713.
- Lonergan, P., Khatir, H., Piumi, F., Rieger, D., Humblot, P., & Boland, M. P.** (1999). Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117(1), 159–167.
- Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., & First, N. L.** (1986). Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biology of reproduction*, 35(4), 850-857.
- Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Parrish, J. J., & First, N. L.** (1989). In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 31(1), 61-74.

- Leibo, S. P.** (1986). Cryobiology: Preservation of mammalian embryos. *Basic Life Sciences*, 37, 251–272..
- Leonard, S. L., and Kurzrok, R.** (1945). A study of hyaluronidase-effects on the follicle cells of ovulated rat ova. *Endocrinology*, 37(3), 171-176.
- Leonard, S. L., Perlman, P. L., and Kurzrok, R.** (1947).-*Proc. Soc. Exp. Biol.* 66: 517
- Lewis, W. H., and Wright, E. S.** (1935). *Carnegie Insf. Wash., Contrib. Embryol.* 25: 113
- Li, G. P., Liu, Y., Bunch, T. D., White, K. L., & Aston, K. I.** (2005). Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase III. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 71(2), 220-226.
- Lim, K. T., Jang, G., Ko, K. H., Lee, W. W., Park, H. J., Kim, J. J., ... & Kang, S. K.** (2007). Improved in vitro bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology*, 67(2), 293-302.
- Liu, Z. and Foote, R.** (1996). Sodium chloride, osmolyte and osmolarity effects on blastocysts formation in bovine embryos produced by in vitro fertilization (IVF) and cultured in simple serum-free media. *J. Assist. Reprod. Genet.* 13: 562–568.
- Lonergan, P.** (2007). State-of-the-art embryo technologies in cattle. *Society for Reproduction and Fertility Supplement*, 64, 315–325.
- Lonergan, P., & Fair, T.** (2014). The ART of studying early embryo development: progress and challenges in ruminant embryo culture. *Theriogenology*, 81(1), 49–55.
- Lonergan, P., Fair, T., & Khatir, H.** (1998). Effect of protein synthesis inhibition before or during in vitro maturation on subsequent development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 50, 417–431.
- Lonergan, P., Khatir, H., Piumi, F., Rieger, D., Humblot, P., & Boland, M. P.** (1999). Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics,

sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117, 159–167.

Loneragan, P., Rizos, D., Kanka, J., Nemcova, L., Mbaye, A. M., Kingston, M., Wade, M., Duffy, P., & Boland, M. P. (2003a). Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction*, 126, 337–346.

Loneragan, P., Rizos, D., Ward, F., & Boland, M. P. (2001). Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, 41, 427–437.

Lu KH, Gordon I, Chen HB, Mc Govern H. (1987). In vitro culture of early bovine embryos derived from in vitro fertilization of follicular oocytes matured in vitro. *Proceeding of the Third Scientific Meeting of the European Embryo Association (Lyon, 70).*

Luberda, Z. (2005). The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol*, 5(1), 5-17.

Luchetti, C.G., Cruzans, P.G., & Lombardo, D.M. (2017). Antioxidant effects of metformin plus ITS during in vitro maturation of porcine COC. *Medicina*, 77(1), 543.

Lucy, M. C., Savio, J. D., Badinga, L., De La Sota, R. L., & Thatcher, W. W. (1992). Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of animal science*, 70(11), 3615-3626.

Ma, M., Zhang, L., Liu, Z., et al. (2024). Effect of blastocyst development on hatching and embryo implantation. *Theriogenology*, 214, 66–72.

Makarevich, A. V., Chrenek, P., Massanyi, P., Lukac, N., & Pivko, J. (2008). Apoptosis detection as a tool for the determination of animal embryo quality. *Slovak Journal of Animal Science*, 41(4), 153–159.

Marques TC, da Silva Santos EC, Diesel TO, Leme LO, Martins CF, Dode M, Alves BG, Costa F, de Oliveira EB and Gambarini ML (2018). Melatonin reduces apoptotic cells,

SOD2 and HSPB1 and improves the in vitro production and quality of bovine blastocysts. *Reprod Domest Anim* 53, 226–36.

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.

Matton, P., Adalakoun, V., Couture, Y., & Dufour, J. J. (1981). Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle. *Journal of Animal Science*, 52(4), 813-820.

Mayer, H. (1842).-Arch. Anat. PhVsivl., Lpz. p. 17.

Mclean, D., and Rowlands, I. W. (1942).-Nature 150: 627.

Méduri G, Charnaux N, Driancourt M-A, Combettes L, Granet P, Vannier B, Loosfelt H, Milgrom E. (2002). Follicle-Stimulating Hormone Receptors in Oocytes? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 2266–2276.

Meirelles, F. V., Caetano, A. R., Watanabe, Y. F., Ripamonte, P., Carambula, S. F., Merighe, G. K., & Garcia, S. M. (2004). Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Animal reproduction science*, 82, 13-20.

Memili, E., & First, N. L. (1999). Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. *Biology of Reproduction*, 61(5), 1198-1207.

Memili, E., & First, N. L. (2000). Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote*, 8(1), 87-96.

Menchero, S., Rayon, T., Andreu, M. J., & Manzanares, M. (2017). Signaling pathways in mammalian preimplantation development: Linking cellular phenotypes to lineage decisions. *Developmental Dynamics*, 246(4), 245-261.

- Ménézo**, Y. J., & Hérubel, F. (2002). Mouse and bovine models for human IVF. *Reproductive biomedicine online*, 4(2), 170-175.
- Merton**, J. S., Knijn, H. M., Flapper, H., Dotinga, F., Roelen, B. A. J., Vos, P. L. A. M., & Mullaart, E. (2013). Cysteamine supplementation during in vitro maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. *Theriogenology*, 80(4), 365-371.
- Mihm**, M., Curran, N., Hyttel, P., Knight, P. G., Boland, M. P., & Roche, J. F. (1999). Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 116, 293–304.
- Mikkola**, M., Desmet, K. L. J., Kommisrud, E., & Riegler, M. A. (2024, August 12). Recent advancements to increase success in assisted reproductive technologies in cattle. *Animal Reproduction*, 21(3), e20240031.
- Ming**, H., Zhang, M., Rajput, S., Logsdon, D., Zhu, L., Schoolcraft, W. B., Krisher, R. L., Jiang, Z., & Yuan, Y. (2024). In vitro culture alters cell lineage composition and cellular metabolism of bovine blastocyst. *Biology of Reproduction*, 111(1), 11–27.
- Moini**, H., Packer, L., & Saris, N. E. (2002). Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 182(1), 84–90.
- Mokhtari**, S., Mahdavi, A. H., Hajian, M., Kowsar, R., Varnosfaderani, S. R., & Nasr-Esfahani, M. H. (2020). The attenuation of the toxic effects of LPS on mouse pre-implantation development by alpha-lipoic acid. *Theriogenology*, 143, 139-147.
- Mondou**, E., Dufort, I., Gohin, M., Fournier, E., & Sirard, M. A. (2012). Analysis of microRNAs and their precursors in bovine early embryonic development. *Molecular human reproduction*, 18(9), 425-434.

Monget P, Bobe J, Gougeon A, Fabre S, Monniaux D, Dalbies-Tran R. (2012). The ovarian reserve in mammals: A functional and evolutionary perspective. *Mol. Cell. Endocrinol.* 356: 2–12.

Moniruzzaman, M., and Miyano, T. (2010). Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. *Journal of Reproduction and Development*, 56(6), 559-566.

Moore, K., Rodriguez-Sallaberry, C. J., Kramer, J. M., Johnson, S., Wroclawska, E., Goicoa, S., & Niasari-Naslaji, A. (2007). In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. *Theriogenology*, 68(9), 1316-1325.

Mori, M., Otoi, T., & Suzuki, T. (2002). Correlation between the cell number and diameter in bovine embryos produced in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, 37(3), 181-184.

Morkunaite-Haimi, S., Kruglov, A. G., Teplova, V. V., Stolze, K., Gille, L., Nohl, H., & Saris, N. E. L. (2003). Reactive oxygen species are involved in the stimulation of the mitochondrial permeability transition by dihydrolipoate. *Biochemical pharmacology*, 65(1), 43-49.

Moussa, M., Tremoleda, J. L., Duchamp, G., Bruyas, J. F., Colenbrander, B., Bevers, M. M., & Daels, P. F. (2004). Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5 °C. *Theriogenology*, 61(5), 921-932.

Mucci, N., Aller, J. F., Kaiser, G. G., Hozbor, F., & Alberio, R. H. (2006). In vitro production of bovine embryos: serum supplementation to the culture media.

Nagaraj, R., Sharpley, M. S., Chi, F., Braas, D., Zhou, Y., Kim, R., Clark, A. T., & Banerjee, U. (2017). Nuclear localization of mitochondrial TCA cycle enzymes as a critical step in mammalian zygotic genome activation. *Cell*, 168(1–2), 210–223.e11.

Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of catalase in oxidative stress- and age-associated degenerative diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019(1), 9613090.

- Nasr-Esfahani**, M. M., & Johnson, M. H. (1991). The origin of reactive oxygen species in mouse embryo cultured in vitro. *Development*, 113(2), 551–560.
- Nebel**, R., and DeJarnette, M. (2011). *Anatomía y fisiología de la reproducción bovina*. SELECT SIRE INC, 6.
- Nemcova**, L., Bartkova, A. R., Kinterova, V., & Toralova, T. (2023). Importance of Supplementation during In Vitro Production of Livestock Animals. *Theriogenology*.
- Niemann**, H., & Wrenzycki, C. (2000). Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*, 53(1), 21–34.
- Nikoloff**, N., Campagna, A., Luchetti, C., Carranza-Martín, A. C., Pascua, A. M., Anchordoquy, J. M., ... & Furnus, C. C. (2020). Effects of EPA on bovine oocytes matured in vitro with antioxidants: Impact on the lipid content of oocytes and early embryo development. *Theriogenology*, 146, 152-161.
- Noda**, Y., Matsumoto, H., Umaoka, Y., Tatsumi, K., Kishi, J., & Mori, T. (1991). Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Molecular reproduction and development*, 28(4), 356-360.
- Nohales-Corcoles**, M., Sevillano-Almerich, G., Di Emidio, G., Tatone, C., Cobo, A. C., Dumollard, R., & De Los Santos Molina, M. J. (2016). Impact of vitrification on the mitochondrial activity and redox homeostasis of human oocyte. *Human Reproduction*, 31(8), 1850–1858.
- Nordberg**, J., & Arnér, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine*, 31(11), 1287-1312.
- O'Shea**, T., Hilliard, M. A., Anderson, T., Bindon, B. M., Findlay, J. K., Tsonis, C. G., & Wilkins, J. F. (1994). Inhibin immunization for increasing ovulation rate and superovulation. *Theriogenology*, 41, 3–17.

- Ock, S. A., Lee, S. L., Kim, J. G., Kumar, B. M., Balasubramanian, S., Choe, S. Y., & Rho, G. J. (2007).** Development and quality of porcine embryos in different culture system and embryo-producing methods. *Zygote*, 15(1), 1–8.
- Orsi, N. M., & Leese, H. J. (2004).** Ammonium exposure and pyruvate affect the amino acid metabolism of bovine blastocysts in vitro. *Reproduction*, 127, 131–140.
- Oyamada, T., & Fukui, Y. (2004).** Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *Journal of Reproduction and Development*, 50, 107–117.
- Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. (1995).** Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free radical biology and medicine*, 19(2), 227-250.
- Packer, L., Roy, S., & Sen, C. K. (1996).** A-lipoic acid: A metabolic antioxidant and potential redox modulator of transcription. *Advances in Pharmacology*, 38, 79–101.
- Packer, L., Witt, E. H., & Tritschler, H. J. (1995).** Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(3), 227–250.
- Palma, G. A. (2001).** Producción in vitro de embriones bovinos. *Biología de la Reproducción*. Buenos Aires: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), 225-294.
- Palma, G. A. (2001).** Producción in vitro de embriones bovinos. *Biología de la Reproducción*. Buenos Aires: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), 225-294.
- Parrish, J. J., Krogenaes, A., & Susko-Parrish, J. L. (1995).** Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, 44(6), 859-869.

Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H., & First, N. L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25(4), 591-600.

Paschoal, D. M., Sudano, M. J., Schwarz, K. R. L., Maziero, R. R. D., Guastali, M. D., Crocomo, L. F., ... & da Cruz Landim-Alvarenga, F. (2017). Cell apoptosis and lipid content of in vitro–produced, vitrified bovine embryos treated with forskolin. *Theriogenology*, 87, 108-114.

Pavlok, A., Kopečný, V., Lucas-Hahn, A., & Niemann, H. (1993). Transcriptional activity and nuclear ultrastructure of 8-cell bovine embryos developed by in vitro maturation and fertilization of oocytes from different growth categories of antral follicles. *Molecular reproduction and development*, 35(3), 233-243.

Peinado, J.; Sies, H.; Akerboom, T. P. M. (1989). Hepatic lipoate uptake. *Archives of biochemistry and biophysics*, 273(2), 389-395.

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*, 30, 11-26.

Pierson RA and OJ Ginther (1987a) Follicular population during the estrous cycle in heifers I. Influence of day Anim Reprod Scie 14, 165-176.

Pieterse, M. C., Kappen, K. A., Kruij, T. A., & Taverne, M. A. (1988). Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30(4), 751–762.

Pincus, G. (1930). Observations on the living eggs of the rabbit. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 107(749), 132-167.

Pincus, G. (1939). The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. IV. The development of fertilized and artificially activated rabbit eggs. *Exp.Zool.* 82: 85-129.

Pincus, G., and Enzmann, E. V. (1932). Fertilisation in the rabbit. *Journal of Experimental Biology*, 9(4), 403-408.

Pincus, G., and Enzmann, E. V. (1935). The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs. *The Journal of experimental medicine*, 62(5), 665-675.

Pincus, G., and Enzmann, E. V. (1934). Can mammalian eggs undergo normal development in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 20(2), 121-2.

Podda, M., Han, D., Koh, B., Fuchs, J., & Packer, L. (1994, April). Conversion of lipoic acid to dihydrolipoic acid in human keratinocytes. In *Journal of Investigative Dermatology* (Vol. 102, No. 4, pp. 598-598). 238 MAIN ST, CAMBRIDGE, MA 02142: BLACKWELL SCIENCE INC.

Pomar, F. J. R., Teerds, K. J., Kidson, A., Colenbrander, B., Tharasanit, T., Aguilar B., & Roelen, B. A. J. (2005). Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: A comparative study. *Theriogenology*, 63(8), 2254-2268.

Pons-Rejraji, H., Bailey, J., and Leclerc, P. (2009). Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. *Reprod. Fertil. Dev.* 21: 525–537.

Quinn, P., Lydic, M. L., Ho, M., Bastuba, M., Hendee, F., & Brody, S. A. (1998). Confirmation of the beneficial effects of brief coincubation of gametes in human in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, 69(3), 399-402.

Rabaglino, M. B., Forde, N., Besenfelder, U., Havlicek, V., Blum, H., Graf, A., Wolf, E., & Lonergan, P. (2023). Maternal metabolic status and in-vitro culture conditions during embryonic genome activation deregulate the expression of energy-related genes in the bovine 16-cells embryo. *PLOS ONE*, 18(8), e0290689.

- Rajkovic** A, Pangas SA, Matzuk MM. (2006). Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier p. 383–424.
- Reddy** P, Zheng W, Liu K. (2010). Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. Trends Endocrinol. Metab. 21: 96–103.
- Reed**, D. J. (1994). Mechanisms of chemically induced cell injury and cellular protection mechanisms. In E. Hodgson & P. E. Levi (Eds.), Introduction to Biochemical Toxicology (pp. 265–295). Norwalk: Appleton & Lange.
- Reed**, L. J. (1974). Multienzyme complexes. Accounts of chemical Research, 7(2), 40–46.
- Reed**, L. J. (2001). A trail of research from lipoic acid to α -keto acid dehydrogenase complexes. Journal of Biological Chemistry, 276(42), 38329–38336.
- Rexroad**, C. E. J., and Powell, A. M. (1986). Co-culture of sheep ova and cells from sheep oviduct. Theriogenology 25, 187.
- Rexroad**, C., Vallet, J., Matukumalli, L. K., Reecy, J., Bickhart, D., Blackburn, H., ... & Wells, K. (2019). Genome to phenome: improving animal health, production, and well-being—a new USDA blueprint for animal genome research 2018–2027. Frontiers in genetics, 10, 327.
- Rieger**, D. (1992). Relationship between energy metabolism and development of early mammalian embryos. Theriogenology, 37(1), 75–93.
- Rieger**, D., Grisart, B., Semple, E. et al. (1995). Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell-conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. J. Reprod. Fertil. 105: 91–98.
- Risso**, M. A., & Risso, P. (2017). Introducción a la estadística bayesiana: uso de Lenguaje R y WinBUGS (1ª ed.). La Plata: Vuelta a Casa.

Rizos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-Garcia R, Pintado B, de la Fuente J, Gutierrez-Adan A. (2002b). Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol Reprod* 66, 589–595.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. (2002a). 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.

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. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 44-50.

Rizos, D., Fair, T., Papadopoulos, S., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2002). Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 62(3), 320-327.

Rizos, D., Maillo, V., Sánchez-Calabuig, M.-J., & Lonergan, P. (2017). The consequences of maternal-embryonic cross talk during the periconception period on subsequent embryonic development. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1014, 69–86.

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. *Molecular Reproduction and Development*, 61(2), 234–248.

Rocha, J. C., Passalia, F. J., Matos, F. D., Takahashi, M. B., Ciniciato, D. D. S., Maserati, M. P., ... & Nogueira, M. F. G. (2017). A method based on artificial intelligence to fully automatize the evaluation of bovine blastocyst images. *Scientific reports*, 7(1), 7659.

Rosenberg, H. R., & Culik, R. (1959). Effect of alpha-lipoic acid on vitamin C and vitamin E deficiencies. 86:93

Rozenkrans, C. F., Jr., and First, N. L. (1994). Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rates of bovine zygotes in vitro. *J. Anim. Sci.* 72, 434–7.

Salek, F., Guest, A., Johnson, C., Kastelic, J. P., & Thundathil, J. (2025). Factors Affecting the Success of Ovum Pick-Up, In Vitro Production and Cryopreservation of Embryos in Cattle. *Animals*, 15(3), 344.

Satoh, T., Kobayashi, K., Yamashita, S., Kikuchi, M., Sendai, Y., and Hoshi, H. (1994). Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) produced by granulosa and oviduct cells enhances in vitro development of bovine embryo. *Biol. Reprod.* 50, 835–44.

Savio, J. D., Keenan, L., Boland, M. P., & Roche, J. F. (1988). Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, 83, 663–671.

Schenk, L. (1878). Mitteilungen aus dem embryologischen Institut der Universität Wien, 1, 107.

Scott, B. C., Aruoma, O. I., Evans, P. J., O'Neill, C., Van Der Vliet, A., Cross, C. E., Tritschler, H., & Halliwell, B. (1994). Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation. *Free Radical Research*, 20(2), 119–133.

Selivanov, V. A., Zeak, J. A., Roca, J., Cascante, M., Trucco, M., & Votyakova, T. V. (2008). The role of external and matrix pH in mitochondrial reactive oxygen species generation. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 29292–29300.

Seneda, M. M., Marinho, L. S. R., Untura, R. M., Morotti, F., Moino, L. L., Rigo, A. G., et al. (2012). Large-scale programs for recipients of in vitro-produced embryos. *Animal Reproduction*, 9, 323–328.

- Seneda**, M. M., Zangirolamo, A. F., Bergamo, L. Z., & Morotti, F. (2020). Follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology*, 150, 180-185.
- Shay**, K. P., Moreau, R. F., Smith, E. J., Smith, A. R., & Hagen, T. M. (2009). Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(10), 1149-1160.
- Shen**, T., Jiang, Z. L., Li, C. J., Hu, X. C., & Li, Q. W. (2016). Effect of alpha-lipoic acid on boar spermatozoa quality during freezing-thawing. *Zygote*, 24(2), 259–265.
- Silva**, E., Greene, A. F., Strauss, K., Herrick, J. R., Schoolcraft, W. B., & Krisher, R. L. (2015). Antioxidant supplementation during in vitro culture improves mitochondrial function and development of embryos from aged female mice. *Reproduction, Fertility and Development*, 27(6), 975-983.
- Simintiras**, C. A., Fröhlich, T., Sathyapalan, T., Arnold, G. J., Ulbrich, S. E., Leese, H. J., & Sturmey, R. G. (2017). Modelling aspects of oviduct fluid formation in vitro. *Reproduction*, 153, 23–33.
- Sirard**, M. A. (2011). Activation of the embryonic genome. *Reproduction in Domestic Ruminants*, 7, 145-158.
- Sirard**, M. A. (2012). Factors affecting oocyte and embryo transcriptomes. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 148-155.
- Slimane**, W., Heyman, Y., Lavergne, Y., Humblot, P., & Renard, J. P. (2000). Assessing chromosomal abnormalities in two-cell bovine in vitro-fertilized embryos by using fluorescent in situ hybridization with three different cloned probes. *Biology of reproduction*, 62(3), 628-635.
- Soares**, A.C.S., Sakoda, J.N., Gama, I.L., Bayeux, B.M., Lodde, V., Luciano, A.M., Buratini, J. (2020). Characterization and control of oocyte large-scale chromatin configuration in different cattle breeds. *Theriogenology*, 141, 146–152.

- Sovernigo**, T. C., Adona, P. R., Monzani, P. S., Guemra, S., Barros, F. D. A., Lopes, F. G., & Leal, C. L. V. (2017). Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(4), 561-569.
- Spicer**, L. J., & Echtenkamp, S. E. (1986). Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle: a review. *Journal of Animal Science*, 62(2), 428-451.
- Steeves**, T. E., & Gardner, D. K. (1999). Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. *Biology of Reproduction*, 61, 731–740.
- Stockwell**, B.R., and Jiang, X. (2020). The chemistry and biology of ferroptosis. *Cell chemical biology*, 27, 365–375.
- Stojkovic**, M., Buttner, M., Zakhartchenko, V., Brem, G., Wolf, E. (1998). A reliable procedure for differential staining of in vitro produced bovine blastocysts: Comparison of tissue culture medium 199 and Menezes's B2 medium. *Animal Reproduction Science*, 50, 1–9.
- Stringfellow**, D. A., & Givens, M. D. (2010). *Manual of the International Embryo Transfer Society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures*. International Embryo Transfer Society.
- Sturmey**, R. G., & Leese, H. J. (2003). Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction*, 126, 197–204.
- Sturmey**, R. G., Bermejo-Alvarez, P., Gutiérrez-Adán, A., Rizos, D., Leese, H. J., & Lonergan, P. (2010). Amino acid metabolism of bovine blastocysts: A biomarker of sex and viability. *Molecular Reproduction and Development*, 77, 285–296.
- Sturmey**, R. G., Hawkhead, J. A., Barker, E. A., & Leese, H. J. (2008). DNA damage and metabolic activity in the preimplantation embryo. *Human Reproduction*, 24, 81–91.

Sun, W. S., Jang, H., Park, M. R., Oh, K. B., Lee, H., Hwang, S., ... & Lee, J. W. (2021). N-acetyl-L-cysteine improves the developmental competence of bovine oocytes and embryos cultured in vitro by attenuating oxidative damage and apoptosis. *Antioxidants*, 10(6), 860.

Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MP, Roche JF and JJ Ireland (1994) Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers *J Reprod Fert* 101, 547-555

Suzuki, Y. J., Tsuchiya, M., & Packer, L. (1991). Thiocetic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. *Free radical research communications*, 15(5), 255-263.

Swyer, G. I. M. (1946). Role of hyaluronidase in fertilisation. *Lancet* 251: 755.

Swyer, G. I. M. (1947). The release of hyaluronidase from spermatozoa. *Biochemical Journal*, 41(3), 413.

Tadros, W., & Lipshitz, H. D. (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*, 136(18), 3033-3042.

Takahashi, M., Keicho, K., Takahashi, H., Ogawa, H., Schultz, R. M., Okano, A. (2000). Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. *Theriogenology*, 54, 137–145.

Takahashi, M., Nagai, T., Okamura, N., Takahashi, H., & Okano, A. (2002). Promoting effect of β -mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. *Biology of reproduction*, 66(3), 562-567.

Takahashi, M., Nagai, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Okamura, N., & Okano, A. (1993). Effect of Thiol Compounds on in Vitro Development and Intracellular Glutathione Content of Bovine Embryos. *Biology of Reproduction*, 49(2), 228-232.

- Talebi A**, Zavareh S, Kashani MH, Lashgarbluki T, Karimi I. (2012). The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 29, 175-183.
- Talebi, A.**, Zavareh, S., Kashani, M. H., Lashgarbluki, T., Karimi, I. (2012). The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(2), 175–183.
- Tarazona**, A. M., Rodríguez, J. I., Restrepo, L. F., & Olivera-Angel, M. (2006). Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(1), 5–11.
- Tatone**, C., Di Emidio, G., Vento, M., Ciriminna, R., & Artini, P. G. (2010). Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecological Endocrinology*, 26(8), 563–567.
- Telford**, N. A., Watson, A. J., & Schultz, G. A. (1990). Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. *Molecular Reproduction and Development*, 26, 90–100.
- Tervit**, H. R., Whittingham, D. G., & Rowson, L. E. A. (1972). Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *Reproduction*, 30(3), 493-497.
- Tetzner**, T. A. D., Saraiva, N. Z., Perecin, F., Niciura, S. C. M., Ferreira, C. R., Oliveira, C. S., Garcia, J. M. (2011). The effects of ovalbumin as a protein source during the in vitro production of bovine embryos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(10), 2135–2141.
- Thannickal**, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005-L1028.
- Thompson**, J. G. (1996). Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology* 45, 27–40.

Thompson, J. G. (1997). Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 9(3), 341–354.

Thompson, J. G. E., Simpson, A. C., Pugh, P. A., Donnelly, P. E., & Tervit, H. R. (1990). Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *Reproduction*, 89(2), 573-578.

Thompson, J. G., Allen, N. W., McGowan, L. T., Bell, A. C. S., Lambert, M. G., & Tervit, H. R. (1998). Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer. *Theriogenology*, 49(6), 1239-1249.

Thompson, J. G., Partridge, R. J., Houghton, F. D., Cox, C. I., & Leese, H. J. (1996). Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *Reproduction*, 106(2), 299-306.

Truong T, Gardner DK. (2017). Antioxidants improve IVF outcome and subsequent embryo development in the mouse. *Human Reproduction*, 32(12), 2404-2413.

Truong TT, Soh YM, Gardner DK. (2016). Antioxidants improve mouse preimplantation embryo development and viability. *Human Reproduction*, 31(7), 1445-1454.

Truong, T. T., & Gardner, D. K. (2017). Antioxidants improve IVF outcome and subsequent embryo development in the mouse. *Human Reproduction*, 32(12), 2404–2413.

Truong, T. T., & Gardner, D. K. (2020). Antioxidants increase blastocyst cryosurvival and viability post-vitrification. *Human Reproduction*, 35(1), 12–23.

Truong, T. T., Gardner, D. K. (2017). Antioxidants improve IVF outcome and subsequent embryo development in the mouse. *Human Reproduction*, 32(12), 2404–2413.

Truong, T. T., Soh, Y. M., & Gardner, D. K. (2016). Antioxidants improve mouse preimplantation embryo development and viability. *Human Reproduction*, 31(7), 1445–1454.

Truong, T., & Gardner, D. K. (2017). Antioxidants improve IVF outcome and subsequent embryo development in the mouse. *Human Reproduction*, 32, 2404–2413.

Urrego, R., Rodriguez-Osorio, N., & Niemann, H. (2014). Epigenetic disorders and altered gene expression after use of assisted reproductive technologies in domestic cattle. *Epigenetics*, 9(6), 803-815.

Urrego, R., Rodriguez-Osorio, N., Niemann, H. (2014). Epigenetic disorders and altered gene expression after use of assisted reproductive technologies in domestic cattle. *Epigenetics*, 9(6), 803–815.

Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P. J., Jacobsen, H., Greve, T., & Callesen, H. (1998). Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 51(1), 53-58.

Van der Valk, J., Bieback, K., Buta, C. et al. (2018). Fetal bovine serum (FBS) past – present – future. *ALTEX* 35 (1): 99–118.

Van Soom, A., Ysebaert, M. T., & de Kruif, A. (1997). Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 47(1), 47-56.

Viuff, D., Rickords, L., Offenberg, H., Hyttel, P., Avery, B., Greve, T., ... & Thomsen, P. D. (1999). A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. *Biology of reproduction*, 60(6), 1273-1278.

- Wade**, P. R. (2000). Bayesian methods in conservation biology. *Conservation Biology*, 14(5), 1308–1316.
- Wale**, P. L., & Gardner, D. K. (2016). The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Human Reproduction Update*, 22(1), 2–22.
- Walker**, S. K., Heard, T. M., Bee, C. A., Frensham, A. B., Warnes, D. M., and Seamark, R. F. (1992). Culture of embryos of farm animals. In 'Embryonic Development and Manipulation in Animal Production'. (Eds A. Lauria and F. Gandolfi.) pp. 77–92. (Portland Press: London.)
- Wallraff**, J., and Beckert H. (1939).-Z. mikr.-anat. Forsch. 45: 510.
- Wang**, L. Y., Wang, D. H., Zou, X. Y., & Xu, C. M. (2009). Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *Journal of Zhejiang University Science B*, 10(7), 483-492.
- Wang**, Z., Fu, C., & Yu, S. (2013). Green tea polyphenols added to IVM and IVC media affect transcript abundance, apoptosis, and pregnancy rates in bovine embryos. *Theriogenology*, 79(1), 186-192.
- Wassarman** PM (1988) Zona pellucida glycoproteins *Annual Review of Biochemistry* 57 415–442.
- Watson**, A. J. (1992). The cell biology of blastocyst development. *Molecular Reproduction and Development*, 33, 492–504.
- Watson**, A. J., & Barcroft, L. C. (2001). Regulation of blastocyst formation. *Frontiers in Bioscience*, 6, D708–D730.
- Watson**, A. J., De Sousa, P., Caveney, A., Barcroft, L. C., Natale, D., Urquhart, J., & Westhusin, M. E. (2000). Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript

levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biology of Reproduction*, 62(2), 355–364.

Webb R., and Armstrong, D. G. (1998). Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. *Livestock Production Science*, 53(2), 95-112.

Wilding, M., Coppola, G., Dale, B., & Di Matteo, L. (2009). Mitochondria and human preimplantation embryo development. *Reproduction*, 137(4), 619.

Wislocki, G. B., Bunting, H., and Dempsey, E. W. (1947).-*Amer. J. Anat.* 81: 1.

Wolfsdorf, K. E., Diaz, T., Schmitt, E. J. P., Thatcher, M. J., Drost, M., & Thatcher, W. W. (1997). The dominant follicle exerts an interovarian inhibition on FSH-induced follicular development. *Theriogenology*, 48, 435–447.

Wood, S. C., Glencross, R. G., Bleach, E. C., Lovell, R., Beard, A. J., & Knight, P. J. (1993). The ability of steroid-free bovine follicular fluid to suppress FSH secretion and delay ovulation persists in heifers actively immunized against inhibin. *Journal of Endocrinology*, 136, 137–148.

Wrenzycki, C., Herrmann, D., & Niemann, H. (2007). Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, 68, S77-S83.

Wrenzycki, C., Herrmann, D., Lucas-Hahn, A., Korsawe, K., Lemme, E., & Niemann, H. (2005). Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reproduction, Fertility and Development*, 17, 23–35

Yamane, J. (1930).The proteolytic action of mammalian spermatozoa and its bearing upon the second maturation division of ova. *Cytologia*, 1(4), 394-403. (Cited by Pincus 1936.)

- Yamane, J.** (1935). Kausal-analytische Studien über die Befruchtung des Kanincheneies I. Die Dispersion der Follikelzellen und die Ablösung der Zellen der Corona radiata des Eies durch Spermatozoen. *Cytologia*, 6(2-3), 233-255.
- Yanagamachi, R.** (1994). Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*, 2e (eds. E. Knobil and J. Neill), 189–317. New York: Raven Press
- Yi, X., & Maeda, N.** (2005). Endogenous production of lipoic acid is essential for mouse development. *Molecular and cellular biology*, 25(18), 8387-8392.
- Yildirim, R. M., & Seli, E.** (2024). The role of mitochondrial dynamics in oocyte and early embryo development. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 159–160, 52–61.
- Yoon, J., Juhn, K., Yoon, S., Ko, Y., & Lim, J. H.** (2011). Effects of alpha-lipoic acid on the mouse embryonic development in vitro. *Fertility and Sterility*, 96(3), S251.
- Yoshida, M.** (1993). Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 35(1), 76-81.
- Yuan, Y. Q., Van Soom, A., Coopman, F. O. J., Mintiens, K., Boerjan, M. L., Van Zeveren, A., de Kruif, A., & Peelman, L. J.** (2003). Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology*, 59(7), 1585–1596.
- Zhang, H., Wu, B., Liu, H., Qiu, M., Liu, J., Zhang, Y., & Quan, F.** (2013). Improving development of cloned goat embryos by supplementing α -lipoic acid to the oocyte in vitro maturation medium. *Theriogenology*, 80(3), 228–233.
- Zhao, X. M., Du, W. H., Wang, D., Hao, H. S., Liu, Y., Qin, T., & Zhu, H. B.** (2011). Recovery of mitochondrial function and endogenous antioxidant systems in vitrified bovine oocytes during extended in vitro culture. *Molecular Reproduction and Development*, 78(12), 942–950.
- Zoheir, K. M., Harisa, G. I., Allam, A. A., Yang, L., Li, X., Liang, A., ... & Harrath, A. H.** (2017). Effect of alpha lipoic acid on in vitro development of bovine secondary preantral follicles. *Theriogenology*, 88, 124-130.

Publicaciones:

Fabra, M. C., Izquierdo, I., Anchordoquy, J. M., Anchordoquy, J. P., Carranza-Martín, A. C., Nikoloff, N., & Furnus, C. C. (2020). Effect of alpha-lipoic acid during preimplantation development of cattle embryos when there were different in vitro culture conditions. *Animal Reproduction Science*, 221, 106550.

Fabra, M. C., Anchordoquy, J. P., Carranza-Martín, A. C., Farnetano, N., Anchordoquy, J. M., Furnus, C. C., & Nikoloff, N. (2023). Alpha-lipoic acid improves bovine preimplantation blastocyst quality and cryotolerance. *Theriogenology*, 198, 61-68.

Fabra, M. C., Campagna, A. A., Farnetano, N., Anchordoquy, J. P., Anchordoquy, J. M., Carranza-Martin, A. C., ... & Nikoloff, N. (2025). Alpha-Lipoic acid supplementation during in vitro culture of abattoir-and OPU-derived bovine oocytes improves embryonic quality. *Animal Reproduction Science*, 272, 107667.