



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00097

Matrícula: 2183801801

Efecto de la adición de antioxidantes durante la maduración de ovocitos y su repercusión en la fertilización y desarrollo embrionario *in vitro* en especies de importancia económica: una revisión



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 16:00 horas del día 30 del mes de marzo del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE  
DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA  
DR. JUAN JOSE RODRIGUEZ MERCADO  
DRA MARIA DEL CARMEN NAVARRO MALDONADO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: JESSICA RUBI HERNANDEZ HERNANDEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

**APROBAR**

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

JESSICA RUBI HERNANDEZ HERNANDEZ

ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE

VOCAL

DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA

VOCAL

DR. JUAN JOSE RODRIGUEZ MERCADO

SECRETARIA

DRA MARIA DEL CARMEN NAVARRO MALDONADO

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella

## Declaración de originalidad

El (La) que suscribe: Jessica Rubí Hernández Hernández, alumno (a) del posgrado Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **“Efecto de la adición de antioxidantes durante la maduración de ovocitos y su repercusión en la fertilización y desarrollo embrionario *in vitro* en especies de importancia económica: una revisión”**.

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante la comisión de la maestría en Biología de la Reproducción Animal para lo obtención del grado de **Maestra de Biología de la Reproducción Animal** es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de esta, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 23 de marzo del 2021.

Atentamente



Jessica Rubí Hernández Hernández

Nombre y firma del alumno

*Este documento debe ser firmado con tinta azul y debe anexarse copia en la tesis o idónea comunicación de resultados (tesina, reporte, etc.), el documento original será conservado por el Coordinador del Posgrado.*

---

*Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa*



**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

**Maestría en Biología de la Reproducción Animal**

**“Efecto de la adición de antioxidantes durante la maduración de ovocitos  
y su repercusión en la fertilización y desarrollo embrionario *in vitro* en especies de  
importancia económica: *una revisión*”**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de**

**Maestra en Biología de la Reproducción Animal**

**P R E S E N T A**

**Biól. Jessica Rubí Hernández Hernández**

Comité Tutorial

Codirectores:

**Dr. Filiberto Fernández Reyes**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
UAM- Xochimilco

Departamento de Producción Agrícola y Animal

**Dra. Miriam Fahiel Casillas Ávalos**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
UAM-Iztapalapa

Departamento de Biología de la Reproducción

Asesor: **Dr. José Miguel Betancourt Rule**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud UAM-Iztapalapa

Departamento Ciencias Biológicas y de la Salud.

---

“El programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT registro 003797”. Número de CVU: 935123.

---

---

## DEDICATORIAS

A *Dios*, que no me desampara en ningún momento. Gracias por ayudarme a retomar el camino que había perdido. Por darme salud y fuerza para salir adelante. Por llegar hasta este día.

Con todo mi amor a mis *padres*:

A ti *mamá* por dar todo por mí. Por tus muestras de amor que siempre me das incondicionalmente. Por saber respetar mis decisiones y darme tu apoyo. Gracias por tu entrega y por sacrificar muchas cosas para darme lo mejor; por ti he llegado a ser la persona que soy hoy en día. No tengo más que agradecimiento con la vida y con *Dios* por tenerte como mi madre. Te amo y te amaré siempre.

A ti *papá*: Gracias por demostrarme que con dedicación y esfuerzo se puede lograr lo que sea. Por enseñarme que la vida es dura y que está lleno de tropiezos, pero que hay que afrontarla con carácter y sabiduría para llegar al éxito. Eres mi mayor ejemplo de trabajo y disciplina. Te debo todo, me diste las bases para emprender el vuelo. Te amo.

A mis hermanos por los momentos compartidos de felicidad y a veces de tristeza. Los quiero mucho.

---

---

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Filiberto Fernández Reyes**. Por su paciencia y apoyo desde el inicio. Si algo he aprendido de usted, es que en el camino de la ciencia hay que ser perseverantes. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la clave para hacer ciencia “perseverancia y paciencia”.

Al **Dr. Miguel Betancourt**. Este sendero empezó desde el servicio social. Sus contribuciones para esta tesis han sido clave, le estaré siempre agradecida por compartir su conocimiento conmigo y la paciencia que siempre me ha tenido.

A la **Dra. Fahiel Casillas**. Por involucrarse desde el inicio; le externo mi cariño, admiración y respeto. Los consejos que me ha brindado en el aspecto profesional me han servido mucho. Agradezco su apoyo que me ha brindado en todo momento.

Agradezco al **Dr. Demetrio Ambriz** y a la **Dra. Carmen Navarro** por aceptar ser parte del jurado y por su apoyo brindado en todo el proceso, en el cual se hizo presente su cálidez humana.

Al **Dr. José Mercado** por su profesionalismo y disposición en todo momento, así como su constante entusiasmo.

Con todo el cariño a la **Dra. Edith Arenas**. Gracias por fomentar el pensamiento crítico durante las clases y el apoyo brindado durante la maestría. Usted es un ejemplo de dedicación.

A mis *amigos*:

A mi amiga la **M. en BRA. Luisa Jiménez Sánchez**. Gracias por tu valiosa amistad, tus consejos y los momentos divertidos que compartimos durante la maestría; por los momentos de lágrimas que nos han ayudado a desahogarnos; por no juzgar mi pasado. Por estar conmigo y alentarme siempre cuando me encontraba triste; influiste en una de las decisiones más importantes de mi vida. Construimos esa confianza mediante el respeto y lealtad. Te quiero.

Con toda mi admiración, respeto y cariño al **Dr. Iván Arredondo Morales**. Por ti aprendí el significado de la lealtad. Gracias por darme apoyo, ánimos, tiempo y momentos de calidad; aún cuando tus ocupaciones son muchas, siempre haces un espacio en tu vida para mí. Por tus consejos tan acertados tanto en lo personal como en lo profesional. Sin temor a equivocarme puedo asegurar que eres de las mejores personas que he conocido. Espero llegar a ser como tú algún día. Quiero que estés conmigo siempre. *Te amo, Iván*.

Al **M. C. y en Recursos Genéticos Francisco Javier Lazo**. Por iluminar mis días grises, por darme esa calma que a veces necesita mi espíritu. Por ser tan paciente. Eres ese amigo que no se encuentra dos veces. De ti aprendí que hay que ser buenas personas, aunque los demás no lo sean. Por tu apoyo a la distancia y tus consejos certeros, la tesis que hoy culmino es gracias a ti “*gordis*”. *Te amo*.

---

---

Con profundo cariño y admiración a mi amiga la **Dra. Evelyn Huerta**, por recibirme siempre con gusto en su casa. Gracias por esos momentos de calidad, de buenas charlas y profundas reflexiones que me han ayudado en mi crecimiento personal. Indudablemente, eres un increíble ser humano y una profesional excelente del cual tengo mucho que aprender.

Con todo mi cariño al próximo **Dr. Michael Adán Martínez**. Gracias por tus consejos, por estar para mí siempre; por los momentos divertidos que pasamos además de las pláticas llenas de sabiduría, eres un ejemplo. Cuando te conocí, no pensé que te convertirías en un gran amigo para mí. En definitiva, eres una persona de mucha calidad humana sumado a tus cualidades profesionales; tengo mucho que aprender de ti. Te quiero y *te admiro*.

A la **M. en BRA. Angie Campos Rentería**. A pesar de que en las clases no convivimos mucho, quiero expresarte que tus consejos y tu cariño siempre los tengo presentes. Me enseñaste que la amistad no respeta el tiempo ni la distancia. Gracias por tus pláticas, tu tiempo y la paciencia que me tuviste cuando más necesitaba ayuda. Por tu honestidad y por ser siempre tan linda conmigo. Te quiero.

Con todo mi cariño al **Biol. Exp. Alan Rodríguez**. Definitivamente me ayudaste a ver las cosas desde otra perspectiva e influiste mucho en decisiones importantes. Aunque a veces choquemos o no coincidamos, te quiero agradecer genuinamente por ser mi cómplice y por estar siempre cuando yo lo he necesitado. Por hablarme fuerte cuando es necesario, pero al mismo tiempo tratar de entenderme. *Te amo*.

Al **M. en C. Rodrigo Martínez y a la Q.B.P. Marisela** por su cariño, apoyo y momentos de calidad brindados. Por hacerme sentir una más de la familia. No cabe duda de que también les debo mucho.

Al **M. en BRA. Roberto Vázquez**, por compartir su sabiduría conmigo y por enseñarme que para seguir el camino de la ciencia se requiere humildad y dedicación. Gracias por creer en mí y darme atinadas sugerencias para el mejoramiento de la tesis. Eres un ejemplo a seguir.

A la **M. en T. E. Vero Taumori**. De usted aprendí que nunca hay que darse por vencidos. Gracias por los consejos, su amistad, por estar para mí siempre; además del buen trato que siempre me dio. Usted es de las pocas personas que siempre recibe a los demás con una sonrisa. Quiero externarle mi admiración por la vocación y amor que otorga a su trabajo. La quiero.

A mis vecinos: especialmente a **Lalo Martínez, Belén, Nohemí y Cecilia**; gracias muchas gracias por apoyarnos a mi familia y a mí en la enfermedad; especialmente a mis padres.

A mi amigo **Fernando Hernández Muñoz**. Recuerdo los momentos divertidos que pasamos de niños y en la adolescencia; a pesar de que no éramos muy unidos siempre me daba gusto verte y reunirme contigo. Un abrazo hasta el cielo amigo. Siempre te recuerdo.

Con respeto y gran cariño a mi profesor el **Biól. Javier Olvera Castillo**. Por usted empecé a descubrir que mi camino era la *biología*. Como olvidar sus consejos tanto en lo personal como en lo académico. Gracias por haber creído en mí y en mis capacidades. Le recuerdo siempre.

---

---

A mi maestro **Gerry Sánchez**. Porque aprendí con usted que nada es casualidad y porque gracias a sus enseñanzas he podido progresar. Apareció en el momento indicado. No le fallaré. *Memento Mori*.

A los miembros del Laboratorio de “Manejo de la Reproducción” **Lucio, Ary, Cecilia y Alan** por sus enseñanzas y apoyo.

Al **Fis. Milton Rodríguez (“piedras”)** y al **Quim. Anibal Sánchez (“chivo”)** por su apoyo brindado en momentos difíciles y divertidos. Por los consejos brindados y por estar para mí.

A la **M. en C. Laura Díaz** por su apoyo moral en momentos importantes. Gracias por recalcar que la salud emocional es importante para desarrollarse en el ámbito profesional.

A las personas que han estado en mi vida y se han “ido”. Indudablemente me quedé con la enseñanza de ustedes...



---

---


**Miembros del Comité de Tutores**

**Codirectores**



**Dr. Filiberto Fernández Reyes**

Laboratorio de Manejo de la Reproducción  
Departamento de Producción Agrícola y Animal  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-Xochimilco  
Correo: [freyes@correo.xoc.uam.mx](mailto:freyes@correo.xoc.uam.mx)



---

**Dra. Miriam Fahiel Ávalos Casillas**

Laboratorio de Neuropsicoendocrinología Reproductiva  
Departamento de Biología de la Reproducción.  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud UAM-Iztapalapa  
Correo: [fahiel@xanum.uam.mx](mailto:fahiel@xanum.uam.mx)

**Asesor**



---

**Dr. José Miguel Betancourt Rule**

Profesor Titular "C" Laboratorio de Biología Celular.  
Departamento Ciencias de la Salud.  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud UAM-Iztapalapa  
Correo: [bet@xanum.uam.mx](mailto:bet@xanum.uam.mx)

---

---

Los miembros del Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: “Efecto de la adición de antioxidantes durante la maduración de ovocitos y su repercusión en la fertilización y desarrollo embrionario *in vitro* en especies de importancia económica: *una revisión*” que presentó:

Biól. Jessica Rubí Hernández Hernández

El día 30 de marzo del 2021.

Sinodales:

**Presidente: Dr. José Miguel Betancourt Rule**



**Secretaria: Dra. Maria del Carmen Navarro Maldonado**



**Vocal: Dr. Demetrio Alonso Ambriz García**



**Vocal: Dr. Juan José Rodríguez Mercado**



---

---

*“Si te sirve de algo, nunca es demasiado tarde, o en mi caso, demasiado pronto para ser quien quieres ser. [...]”*

*Espero que vivas una vida de la que te sientas orgullosa. Y si ves que no es así, espero tengas la fortaleza para empezar de nuevo”.*

**F.Scott Fitzgerald**

*“Todo lo que te ocurre es una enseñanza si prestas la atención debida.”*

**Robert Greene**

*“Cualquier camino que elijas, asegúrate de que tenga corazón. Un camino sin corazón es un camino desperdiciado”*

**Gerry Sánchez**

---

---

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>PÁGINA</b>
1.- La importancia de la obtención de embriones <i>in vitro</i> en la reproducción asistida (RA)	<b>11</b>
1.1.- Definición de RA y sus aplicaciones	<b>12-14</b>
1.2.- Técnicas de RA: FIV (Fertilización <i>in vitro</i> ), ICSI (Inyección Intracitoplásmica del Espermatozoide) y PCSI (Inyección Fisiológica Intracitoplásmica del Espermatozoide).	<b>15-18</b>
2.- Producción de embriones <i>in vitro</i> (PEIV)	<b>18-19</b>
2.1.- Maduración <i>in vitro</i>	<b>19-20</b>
2.2.- Medio de maduración <i>in vitro</i> y componentes	<b>20</b>
2.3.- Medio de cultivo TCM-199	<b>20</b>
2.4.- Compuestos añadidos al medio	<b>20-21</b>
3.- Fertilización <i>in vitro</i> (FIV)	<b>21</b>
3.1.- Componentes del medio de cultivo para FIV	<b>22</b>
3.2.- Medio TBM	<b>22</b>
3.3.- Compuestos añadidos al medio	<b>23</b>
4.- Desarrollo embrionario	<b>23</b>
4.1.- Medios de cultivo para el desarrollo embrionario	<b>23-25</b>
4.2.- Medio NCSU (North Caroline State University)	<b>25</b>
4.3.- Compuestos añadidos al medio	<b>25-26</b>
5.- Uso de la solución tampón HEPES	<b>26</b>
5.1.- Componentes añadidos al medio	<b>26</b>
6.- Utilización de DPBS (solución tamponada de fosfato Dulbecco's) como medio de lavado y capacitación de espermatozoides	<b>27</b>
6.1.- Componentes añadidos al medio	<b>27</b>

---

---

7.- Especies reactivas de oxígeno (ERO)	27
7.1.- Definición e importancia de las ERO	27-28
7.2.- Principales ERO	28-29
7.3.- Funciones y mecanismos de acción de las ERO	29-31
7.4.- Factores que inducen la producción de las ERO	31-32
8.-Fisiología de las ERO en los gametos	32-33
8.1.- Fisiología de las ERO en el ovocito	33-35
8.2.- Fisiología de las ERO en el espermatozoide	36-37
8.3.- Fisiología de las ERO en el embrión	37
9.-Antioxidantes	
9.1.- Breve historia de los antioxidantes	38
9.2.- Definición y tipos de antioxidantes	38-39
9.3.- Clasificación de los antioxidantes	39-43
9.4.-Mecanismos de acción de los antioxidantes	44-47
<b>10.- ANTECEDENTES</b>	<b>48-50</b>
<b>11.- OBJETIVO GENERAL</b>	<b>51</b>
<b>12.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>51</b>
<b>13.- JUSTIFICACIÓN</b>	<b>51</b>
<b>14.- METODOLOGÍA</b>	<b>52</b>

---

---

<b>15.- Estado actual de los estudios sobre el efecto de las ERO en la maduración, fertilización y desarrollo embrionario <i>in vitro</i> en diversas especies animales de interés económico (porcino, bovino, ovino, caprino, equino) y humano.</b>	<b>53</b>
15.1.- Antioxidantes añadidos a los medios de cultivo para la PEIV	53
15.1.1.- Antioxidantes utilizados en el ganado porcino	53-59
15.1.2.- Antioxidantes utilizados en el ganado bovino	59-62
15.1.3.- Antioxidantes utilizados en el ganado caprino	63-64
15.1.4.- Antioxidantes utilizados en el ganado ovino	65-67
15.1.5.- Antioxidantes utilizados en el ganado equino	67-68
15.1.6.- Antioxidantes utilizados en el humano	68-70
15.2.1.- Antioxidantes utilizados en espermatozoides	70-72
15.2.2.- Antioxidantes utilizados en espermatozoides de porcino	72-75
15.2.3.- Antioxidantes utilizados en espermatozoides de bovino	75-77
15.2.4.- Antioxidantes utilizados en espermatozoides de caprino	77-78
15.2.5.- Antioxidantes utilizados en espermatozoides de ovino	79-80
15.2.6.- Antioxidantes utilizados en espermatozoides de equino	81-82
15.2.7.- Antioxidantes utilizados en espermatozoides de humano	82-83
<b>16.- Futuras tendencias del uso de antioxidantes en la PEIV</b>	<b>84-85</b>
<b>17.- DISCUSIÓN</b>	<b>86-89</b>
<b>18.- CONCLUSIÓN</b>	<b>89</b>
<b>19.- REFERENCIAS</b>	<b>90-113</b>

---

---

## Abreviaturas

A•= Radical ascorbilo	ICSI= Inyección intracitoplásmica de espermatozoides
AGP= Ácidos grasos poliinsaturados	KSM= Mouse Embryo Media
BMP15= Proteína morfogenética del hueso	LH= Hormona Luteinizante
BSA= Albúmina sérica bovina	MIV= Maduración
CAR•= Radical carotenoide	mTBM= Tris-buffer modificado
CAT= Catalasa	NADPHOX= Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
CDK1= Ciclina 1	NCSU= North Caroline State University
CE= Cultivo embrionario	O <sub>2</sub> = Oxígeno molecular
COC= Complejo ovocito-cúmulo	O <sub>2</sub> <sup>1</sup> = Anión superóxido
Co-Q= Coenzima-Q	OH= Hidroxilo
CP= Cuerpo polar	PEIV= Producción de embriones <i>in vitro</i>
CR1= Medio Charles Rosenkrans	PICSI= Inyección fisiológica intracitoplásmica de espermatozoide
DHA= Ácido dehidroascórbico	PVA= Polivinilalcohol
DPBS= Solución salina de fosfatos amortiguada de Dulbecco	PM= Pronúcleo masculino
EGF= Factor de crecimiento epidérmico	PZD= : Disección parcial de la zona
ERO= Especies reactivas de oxígeno	RA= Reproducción asistida
FF= Fluido folicular	ROO•= Peroxilo
FIV=Fertilización <i>in vitro</i>	ROOH= Lipoperóxido
FSH= Hormona foliculoestimulante	SFB= Suero fetal bovino
GPx= Glutatión peroxidasa	SOD= Superóxidodismutasa
GR= Glutatión reductasa	SOF= Fluído oviductal sintético
GSH= Glutatión reducido	SOP= Síndrome de ovario poliquístico
HO <sub>2</sub> = Hidroperóxido	SUZI= Inseminación Subzonal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = Peróxido de hidrógeno	TALP= Tyrode's albúmina lactato piruvato

---

---

**Resumen:**

La producción de embriones *in vitro* (PEIV) es una tecnología que permite obtener una gran cantidad de embriones en condiciones de laboratorio. La primera etapa que es la maduración *in vitro* (MIV) es una de las más imprescindibles para el éxito del potencial embrionario, sin embargo, el estrés oxidativo es considerado como un interruptor de la competencia del ovocito y para disminuir sus efectos sobre la viabilidad celular se han probado compuestos conocidos como antioxidantes, los cuales procuran disminuir los niveles suprafisiológicos de moléculas oxidantes conocidas como especies reactivas de oxígeno (ERO). La mayoría de los trabajos en donde suplementan medios de cultivo con antioxidantes son realizados en especies animales de interés económico. Hasta el momento la mayoría de los suplementos son agregados al medio de MIV esperando que los resultados positivos se vean reflejados en la calidad del desarrollo embrionario.

Por lo tanto, los programas para la PEIV buscan estrategias que permitan optimizar los medios de cultivo y disminuir los niveles de ERO para proteger al ovocito y/o embrión del estrés oxidativo. Teniendo en cuenta la importancia de este último y su impacto en la competencia del ovocito, es trascendente el estudio a profundidad de compuestos que puedan ayudar a establecer mejores protocolos para la PEIV y la transferencia embrionaria.

**Abstract:**

In vitro embryo production (IVP) is a technology that makes it possible to obtain many embryos under laboratory conditions. The first stage, which is in vitro maturation (IVM), is one of the most essential for the success of the embryonic potential, however, oxidative stress is considered as a switch of the oocyte's competition and to reduce its effects on cell viability. A myriad of compounds known as antioxidants have been tested, which seek to lower the supra-physiological levels of oxidant molecules known as reactive oxygen species (ROS). Most of the works in which the culture media are supplemented with antioxidants are carried out in species of economic interest. Until now, most of the additives are added to the IVM medium, hoping that the positive results will be reflected in the quality of embryonic development.

Therefore, IVP programs seek strategies that optimize culture media and decrease ROS levels to protect the oocyte from oxidative stress. Considering the importance of the latter and its impact on the competence of the oocyte. The in-depth study of compounds that can help establish better protocols for IVP and embryo transfer is conclusive.



---

---

## INTRODUCCIÓN

Aunque esta breve introducción no puede abarcar de manera completa todos los temas acerca de la **reproducción asistida** (RA) en mamíferos domésticos de interés económico, es importante mencionar algunos de los aspectos más relevantes de cómo obtener embriones en condiciones *in vitro*. Durante el transcurso de los años, se han desarrollado técnicas de RA no invasivas; aunque inicialmente el desarrollo de estas técnicas empezó con la implementación de cocultivos con células oviductales. No obstante, con la investigación dedicada a mejorar los medios de cultivo, los cocultivos se hicieron de lado y se empezó a efectuar el uso de una amplia variedad de compuestos a diferentes concentraciones para estandarizarlos. Los principales compuestos que han sido probados son: hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, ácidos grasos, oligoelementos y aminoácidos. Lo anterior, dio lugar al desarrollo y creación de diversos medios de cultivo para el desarrollo de embriones semejanado las condiciones *in vivo*. A la fecha se siguen probando varios compuestos químicos entre los que se encuentran los antioxidantes (Torres-Osorio *et al.*, 2019).

Los antioxidantes son considerados un recurso prometedor para la mejora de los medios de cultivo, tomando en cuenta que el exceso de producción de **especies reactivas de oxígeno** (ERO), son una de las causas principales por las que no se obtiene un porcentaje alto de embriones con capacidad de ser transferibles en el útero de las hembras receptoras. El tracto reproductor tanto masculino como femenino (fluido oviductal y uterino) cuentan con sistemas antioxidantes enzimáticos que regulan los niveles de ERO. Pese a ello, existen variaciones entre ovocitos de las diferentes especies animales acerca de estos antioxidantes y estas particularidades representan el punto de partida para determinar las cantidades adecuadas de estos compuestos que pueden ser añadidos al medio de cultivo para la **producción de embriones *in vitro*** (PEIV), el cual es definido como una serie de procesos fisiológicos emulando en su efecto, las condiciones *in vivo* para obtener embriones. La importancia de añadir antioxidantes además de disminuir los niveles de ERO, es que producir un efecto favorable sobre el metabolismo celular, considerando que la mitocondria es el centro principal energético y también fuente de generación de la mayor parte de las ERO. Por lo tanto, el metabolismo celular, es clave para mantener adecuadamente las funciones que permiten al ovocito adquirir su competencia de desarrollo, misma que se ve reflejado en el potencial de desarrollo embrionario y mantener el equilibrio redox que es imprescindible para la viabilidad de los embriones.

---

---

## 1.- La importancia de la obtención de embriones *in vitro* en la reproducción asistida (RA)

La **fertilización *in vivo*** es un proceso por medio del cual, un espermatozoide penetra al ovocito para formar el cigoto, mismo que contiene un genoma derivado de ambos progenitores y así llevar a cabo el desarrollo embrionario y fetal, hasta que se logre el nacimiento de o individuo. Con los avances de la ciencia y tecnología , ha sido posible obtener embriones *in vitro*, es decir, en condiciones de laboratorio, haciendo de esta técnica, una herramienta fundamental para la PEIV.

Actualmente, en el campo de la RA hay múltiples procedimientos para la PEIV, los cuales son herramientas que han permitido manipular y modificar el genoma de varias especies, incluyendo a los mamíferos (Fernández *et al.*, 2007). Al mismo tiempo, la RA ha llevado consigo sus propios desafíos, esto se debe a que falta mejorar las condiciones *in vitro*, lo que quiere decir que se necesitan estrategias para abastecer la demanda de la PEIV. Aun así, estos procedimientos presentan ventajas como:

- a) Control sobre la cantidad de ovocitos que se desean obtener , este se refleja en un mayor número de embriones producidos en comparación con los que se obtienen *in vivo* en promedio de cada especie animal.
- b) Selección de ovocitos y espermatozoides con características genéticas dominantes, mismas que se sean reflejadas en la descendencia; por ejemplo, mejor calidad de la carne, mayor producción de leche, mayor tiempo de fertilidad. Con ello, se pueden implementar programas de mejoramiento genético.
- c) Contribución a los conocimientos base de la **fertilización *in vitro*** (FIV), hacia otras metodologías como la transgénesis, sexado de embriones, transferencia nuclear embrionaria (clonación) y bipartición embrionaria.
- d) Propagación de semen con carga genéticamente importante (tamaño, fuerza, razas puras).
- e) Control de enfermedades reproductivas; lo que implica, que en los descendientes se disminuya el sacrificio en individuos enfermos (enfermedades como la influenza porcina, diarrea bovina, criptorquidia etcétera).

---

---

La demanda de PEIV en los últimos años, ha tenido un gran aumento del 23% (Joao., 2018) para su uso en los distintos ámbitos: el económico, el científico y el médico. Las diferentes técnicas empleadas en RA se requieren para aumentar el número de crías con los fines ya mencionados. Estas especies son generalmente: bovina, porcina, equina y caprina (Torres-Osorio *et al.*,2019).

### **1.1.- Definición de RA y sus aplicaciones**

Son todas aquellas técnicas y metodologías que permiten facilitar y/o sustituir los procesos que ocurren antes, durante y después de la fertilización. Estos procedimientos tienen lugar en el laboratorio para la obtención de embriones (Álvarez-Lopez.,2018). Finalmente debe traducirse su aplicación en la resolución de problemas para lograr una gestación y que éste continúe a término.

#### Producción animal

La población mundial ha aumentado de forma exponencial en los últimos 20 años pasando de 6.06 a 7.50 mil millones de personas, por lo que la demanda del consumo de carne de ganado ha tenido un crecimiento espectacular (Errecart *et al.*, 2015). Por tal motivo, es importante que las técnicas de RA se enfoquen específicamente en elevar la producción de especies animales con importancia económica como el ganado porcino, ovino, bovino etcétera, por mencionar algunas especies (Ducolomb *et al.*, 2012 en *Avances en Biología de la Reproducción*). En consecuencia, el mejoramiento y estudio de los protocolos para especies domésticas sigue en avance y aunque en la PEIV existen progresos, los resultados del porcentaje de la PEIVson bajos (<50 %) (Poniedzialek-Kempny *et al.*, 2020).

#### Conservación de especies en peligro de extinción

En la actualidad, a la temática de conservación de especies no se le ha prestado el interés debido. Sin embargo, en el ámbito ecológico y veterinario, las técnicas de RA sí mantienen el rumbo para su implementación en especies animales silvestres.De acuerdo con Alfonsín y Buceto (2019), la extinción de las especies ha ido en aumento acelerado; se calcula una tasa de extinción de especies de 10 a 100 veces superior a la que se considera que sería sin la intervención del hombre y se prevé que siga aumentando esta tasa durante los próximos 10 años. Consecuentemente, con la aplicación de estas técnicas, se puede llevar a cabo la reproducción garantizando la perpetuación de las especies amenazadas por causas antropocéntricas, tales como el consumo de recursos naturales y perturbación del ecosistema (Bernal Sánchez., 2018).

---

---

De las técnicas de RA para la conservación de las especies que también ha tenido gran impacto, es la criopreservación. Pero, a pesar de ello los protocolos establecidos en especies domésticas no son del todo favorables para usarse como base son su modificación respectiva en los animales de vida silvestre en peligro de extinción, ya que pueden existir variaciones en el ciclo reproductivo (duración, hormonas, diferencias en la señalización celular etcétera) entre especies (Ducolomb *et al.*, 2012).

#### Infertilidad en humanos

La infertilidad es definida como la incapacidad de lograr un embarazo después de 1 año de mantener relaciones sexuales sin protección. Se calcula, que afecta entre el 8 y el 12 % de la población mundial (Vander-Borghet *et al.*, 2018) y su aumento ha requerido de alternativas; una de ellas es la FIV, misma que representa una solución para tratar las causas y problemas de concepción. Por ello, ha sido trascendental el establecimiento de un protocolo utilizando como modelos, animales de importancia económica o de laboratorio, debido a la fisiología similar (Ducolomb *et al.*, 2012).

Actualmente, la situación de la obtención de embriones en humanos es más avanzada que en otras especies. Sin embargo, el desarrollo de patologías disminuye las probabilidades de lograr un embarazo, situación que puede ocasionarse por enfermedades como el síndrome de ovario poliquístico o la endometriosis en la mujer; o bien la calidad seminal o baja viabilidad espermática en el varón, por mencionar algunas causas. Las técnicas de RA como la **inseminación artificial (IA)**, la **FIV** o la **inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI)**, son algunas de las soluciones propuestas a las parejas que acuden a las consultas de reproducción con problemas de fertilidad por las causas ya mencionadas (Álvarez-López., 2018).

---

---

## 1.2.- Técnicas de RA: FIV (Fertilización *in vitro*), ICSI (Inyección intracitoplásmica del espermatozoide) y PICSI (Inyección fisiológica intracitoplásmica del espermatozoide)

### Fertilización *in vitro*

La historia temprana de la FIV hacia el S. IV a.C. está plasmada en un texto de carácter religioso llamado el “*Kalpasutra*”, en donde se relata la idea de “transferir” un feto de una madre a otra. Lo último fue hecho realidad, por primera vez hacia finales del 1890, donde se traspasaron exitosamente dos embriones de conejo a un ciervo belga. El proceso de FIV se efectuó hacia el año de 1930 en ovejas y cabras; en gazapos se lograron los nacimientos en 1959. Para el caso del humano, los primeros intentos fracasaron, no fue hasta que Robert Edwards y Patrick Steptoe en 1978, lograron el primer nacimiento de una niña llamada “Lois Brown”, misma que fue denominada como el “bebé del siglo” o “bebé probeta”, marcando así el inicio de las técnicas de RA (Mata-Miranda y Vázquez-Zapién., 2018).

Actualmente, la FIV en humanos ha tenido relevantes avances en la solución de los problemas causantes de infertilidad en las parejas. Sin embargo, existen inconvenientes como la tasa considerable de aneuploidías en los embriones después de su transferencia (Swain., 2019)(a), además de que, en los laboratorios de FIV, se ha reportado la existencia de tasas de polispermia elevadas y embarazos múltiples (Casillas., 2018). Aunado a lo anterior, sólo el 50% de los embriones humanos alcanza la etapa de blastocisto (McCollin *et al.*, 2020).

En especies de mamíferos domésticos como el porcino, ovino, equino y bovino , los resultados no han sido tan favorables en cuanto a la calidad y porcentaje de obtención de blastocistos que está entre 10 y 35 % aproximadamente, porcentajes que varían entre laboratorios. Todavía faltan estudios enfocados al mejoramiento de los medios de cultivo que permitan recrear el ambiente natural para el desarrollo adecuado de los embriones de mamíferos (Torres-Osorio *et al.*, 2019).

---

---

## **Inyección intracitoplásmica del espermatozoide (ICSI)**

La ICSI, es considerada de las técnicas más utilizadas y consiste en la selección de un espermatozoide (utilizando micromanipuladores) bajo criterios subjetivos, es decir, realizar la selección basándose en la evaluación morfológica del espermatozoide al microscopio (Figura 1). Esta técnica elimina los procesos naturales que ocurren *in vivo* tal como la reacción acrosomal, la unión a la zona pelúcida y la unión de membranas de los gametos (Casillas., 2018) seleccionando un espermatozoide desconociendo la presencia de alguna alteración en el núcleo o fragmentación del material genético (Castillo-Baso y García-Villafaña., 2012). Aunque lo anterior podría representar desventajas, la selección de un solo espermatozoide evita la polispermia y conjuntamente permite estudiar la interacción entre el ovocito y el espermatozoide (Hernández-Pichardo *et al.*, 2012).

La ICSI es empleada bajo ciertas condiciones entre las que se encuentran: baja fertilidad del espermatozoide, selección de espermatozoides con carga genética importante, obtención de crías de determinado sexo, conservación de especies en peligro de extinción, así como en el uso de espermatozoides criopreservados que se caracterizan por haber disminuido su movilidad o incluso cuando la pierden de manera natural evitando así la penetración del ovocito (Hernández y Fernández., 2013) (Hernández-Pichardo *et al.*, 2016).

Los antecedentes de la ICSI fueron 2 técnicas de RA en humanos: La **dissección parcial de la zona** (PZD) y la **inseminación subzonal** (SUZI). La primera consistió en realizar una abertura pequeña de la zona pelúcida para que los gametos masculinos pudieran interactuar directamente con el oolema, mientras que la segunda, se realizó la microinyección de espermatozoides a través del espacio perivitelino. Ambas técnicas se dejaron de lado por el bajo porcentaje de ovocitos fertilizados (20%), descartándose la transferencia embrionaria (Devroy *et al.*, 2004). Los reportes indican que la ICSI se utilizó por primera vez en erizo de mar en 1960 (Hiramoto., 1962). Posteriormente se aplicó la técnica en mamíferos en 1966 y en 1974 en anfibios (Brun., 1974); los primeros reportes de nacimientos de crías vivas a través de ICSI fueron en conejos y bovinos. En 1992, se reportó el primer nacimiento en humanos mediante el uso de esta técnica. A partir de ese momento, el número de nacimientos a través de ICSI en todo el mundo se acrecentó. (Hosoi., 1988; Goto *et al.*, 1990; Iritani.,1991).

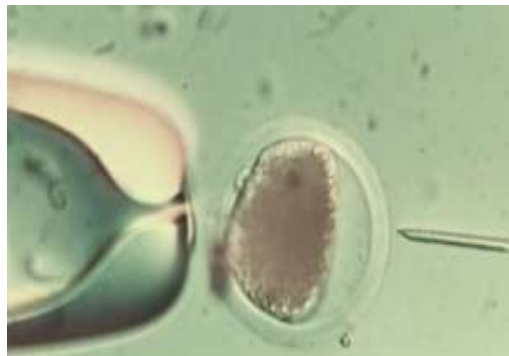
Al presente, la ICSI se ha convertido en una herramienta fundamental de la industria ganadera especialmente en caballos de élite, que ha aumentado en las 2 últimas décadas. A pesar de los resultados poco reproducibles, el caballo se mantiene a la delantera en la utilización de la ICSI y

---

---

protocolos de esta metodología podrían ser a futuro la base para el rescate genético de equinos silvestres (Choi *et al.*, 2016).

No obstante, en otras especies domésticas, la ICSI no se aplica a menos que el macho tenga un alto valor genético. Esto se ve reflejado en la tasa de obtención de embriones en etapa de blastocisto que sigue muy por debajo de lo esperado, específicamente en bovinos (13%) y en ovejas (8%) (Hernández *et al.*, 2012), lo que se ha buscado paliar con la activación artificial del ovocito (Salamone *et al.*, 2017). Sin embargo, el uso de esta tecnología reproductiva ha sido prometedora para la procreación de animales de alto valor genético del sexo deseado, y más recientemente en la obtención de animales transgénicos (García-Vázquez., 2010). La ICSI se ha desarrollado con éxito, en el humano, ya que se han logrado más de 8 millones de nacimientos (ESHRE., 2012).



**Figura 1. ICSI en ovocito maduro 40x.  
(tomado de Casillas., 2018).**

### **Inyección fisiológica intracitoplásmica del espermatozoide (PICSI)**

Aunque la ICSI, es de las técnicas de RA más utilizadas, tiene el inconveniente de desconocer la calidad del ADN espermático. En respuesta a este problema se desarrolló la inyección fisiológica intracitoplásmica del espermatozoide (PICSI) (Castillo-Baso y García-Villafaña., 2012). Para llevar a cabo el método, se requiere añadir gotas de ácido hialurónico en una caja petri rehidratadas con medio de cultivo. Posteriormente, se coloca la muestra espermática en dichas gotas (Figura 2) donde los espermatozoides seleccionados quedarán inmóviles facilitando su captura (Casillas., 2018).

El fundamento de esta metodología se basa en que, durante la fertilización *in vivo*, la cabeza del espermatozoide presenta una fuerte afinidad por la matriz de ácido hialurónico (polisacárido presente en el tracto reproductor de la hembra involucrado en el mecanismo de selección del espermatozoide

---

---

más competente) que envuelve al *cumulus oophorus*. Esto no ocurre en la selección de gametos masculinos que son inmaduros porque no han completado su madurez nuclear, extrusión citoplásmica y remodelación de la membrana plasmática, por lo que también se relaciona la influencia del daño sobre el ADN espermático (Castillo-Baso y García-Villafaña., 2012).

En estudios *in vitro*, se ha reconocido el papel fundamental en el que participa este glucosaminoglicano para seleccionar un espermatozoide, maduro y disminuyendo el riesgo de anomalías cromosómicas (Amira *et al.*, 2016). El ácido hialurónico es menos tóxico en comparación con la polivinilpirrolidona. No obstante, confiere un control de selección espermática debido a su aspecto y composición viscosa (Simoupolou *et al.*, 2016).

En especies domésticas, la PICSÍ no se ha utilizado de manera importante (Park *et al.*, 2005; Casillas., *et al* 2018; Menéndez-Blanco *et al.*, 2019).



**Figura 2.** En el método por PICSÍ se añade ácido hialurónico en la caja de Petri para inmovilizar espermatozoides (tomado de Casillas., 2018).

## **2.- Producción de embriones *in vitro* (PEIV)**

La PEIV es definida como una tecnología de RA cuyo propósito es la obtención de embriones aptos para ser transferibles. Sus aplicaciones han ido aumentando conforme se actualizan tanto los conocimientos, como la metodología (Soto-Heras y Paramio., 2020).

Esta metodología, comprende fundamentalmente 3 pasos:

- a) La maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos inmaduros recuperados de los folículos ováricos
- b). La FIV que consiste en realizar la unión del espermatozoide con el ovocito.



---

---

c) El **cultivo embrionario** (CE). En esta última los gametos ya fusionados comienzan el proceso de división y diferenciación celular hasta alcanzar el estado de blastocisto, para después ser transferidos a una hembra receptora para que continúe su crecimiento y desarrollo hasta lograr una cría viva (Granleese *et al.*, 2015; Soto-Heras y Paramio., 2020).

Algunos autores consideran que en la PEIV se aplican 4 pasos, si se toma en cuenta la recolección de los ovarios (Meriem., 2013).

Sin embargo, la PEIV continúa en desarrollo, ya que aún falta por comprender los mecanismos que ocurren *in vivo* para reproducir el microambiente óptimo *in vitro* (Meriem., 2013).

### **2.1.- Maduración *in vitro***

La **maduración *in vitro*** (MIV), tiene la finalidad de que los ovocitos reinicien la meiosis y maduren. Del total de ovocitos que inician el proceso de maduración, sólo el 80 a 90% logran pasar con éxito esta etapa (Cortés., 2011).

La MIV al igual que en la maduración *in vivo* abarca dos eventos, la maduración citoplásmica y la maduración nuclear (Abeydeera., 2002). Ambos sucesos deben alcanzar la sincronía para que los ovocitos se desarrollen correctamente (Poniedzialek-Kempny., 2020). La maduración citoplásmica, corresponde con la adquisición de la competencia del ovocito que es la habilidad para ser fertilizado y después dividirse hasta desarrollar el estado de blastocisto. Este evento es visiblemente caracterizado por la expansión de las células del *cumulus*; mientras que la maduración nuclear involucra la reanudación de la meiosis, es decir el progreso de la profase I a la metafase II, distinguida finalmente por la expulsión del primer **cuerpo polar** (CP) (Casillas *et al.*, 2014). La meiosis se completa después de la unión del espermatozoide con el ovocito, con la manifestación del segundo CP (Poniedzialek-Kempny., 2020).

La MIV, es considerada una etapa significativa, pues aún después de la selección cuidadosa de la población homogénea de **complejos células del cúmulo-ovocito** (COC's), sólo la tercera parte de los ovocitos alcanzan la maduración citoplásmica y adquieren la competencia de producir blastocitos, que es considerada como no óptima a comparación *in vivo* (Tarazona *et al.*, 2010).

Los procesos *in vitro* se ven afectados por diversos factores que, al no reproducirlos correctamente, tienen efectos perjudiciales en la competencia del ovocito, entre estos están la temperatura, la concentración de oxígeno y CO<sub>2</sub> de la incubadora; la composición de los medios de cultivo (Poniedzialek-Kempny., 2020) y su posible deficiencia (Eppig *et al.*, 1996) así como el estrés

---

---

oxidativo, siendo éste de los principales factores que perjudican los resultados de cada etapa de la PEIV (Soto-Heras y Paramio., 2020). Por último, y no menos importante se encuentra la manipulación del ovocito, que probablemente no permite alcanzar un porcentaje alto en las tasas de MIV, FIV y PEIV (Córdova-Veizaga., 2011); lo cual depende del éxito de la emulación de las complejas vías de señalización, metabolismo y comunicación entre los ovocitos junto con las células de la granulosa circundantes y el líquido folicular, que ocurren en el tracto reproductor femenino (Eppig *et al.*, 1996).

## **2.2.- Medio de maduración *in vitro* y sus componentes**

Los medios de cultivo para la MIV han sido formulados con compuestos que el ovocito metaboliza para cumplir sus necesidades y poder completar los eventos de la maduración citoplásmica y nuclear. Para lo anterior, se han añadido diversos compuestos a los medios como hormonas, factores de crecimiento, proteínas, aminoácidos y antioxidantes, entre otros (Eppig *et al.*, 1996).

## **2.3.- Medio de cultivo TCM-199**

El medio de maduración TCM-199, es utilizado de forma tradicional en ovocitos de mamíferos como porcino, bovino, ovino y equino, ya que se han obtenido porcentajes satisfactorios de maduración en comparación con otros medios (Sutton *et al.*, 2003). Este medio, está formulado con sales inorgánicas, vitaminas y aminoácidos que van a metabolizarse en las vías de producción de energía. (Miran-Kim., 2011).

## **2.4.- Compuestos añadidos al medio**

Las tasas de maduración han ido en aumento, gracias a la adición de moléculas como el SFB y hormonas proteicas (LH y FSH), estas últimas participan en el reinicio de la meiosis y la formación del **pronúcleo masculino** (PM) (Mattioli *et al.*, 1991; Brackett., 1997). La participación de la glucosa en la MIV es importante, ya que es considerado el primer sustrato de energía (Barnett y Bavister., 1996).

Dado que está bien reconocido que el tipo de compuestos que se añaden al medio de maduración influyen sobre la regulación del metabolismo de los ovocitos, éstos se deben de escoger cuidadosamente, ya que pueden afectar los resultados del desarrollo embrionario. Por tal motivo, se han agregado para que la maduración citoplásmica y nuclear se sincronicen correctamente. Los componentes comúnmente más usados para activar la maduración citoplásmica *in vitro* son: SFB (suero fetal bovino), FF (fluido folicular), EFG (factor de crecimiento epidérmico), HG (hormona del crecimiento) LH (hormona luteinizante), FSH (hormona foliculoestimulante), PVA

---

---

(polivinilalcohol) (Fernández-Reyes *et al.*, 2007). Otro compuesto importante, es la cisteína que participa en la síntesis de glutatión en el ovocito, este último compuesto va a ser importante para mantener el estado redox de la célula (mantenimiento de las reacciones de ganancias y pérdidas de electrones), protegiendo al ovocito de los daños del estrés oxidativo de la célula (Hernández-Fernández y Hernández-Fonseca., 2010). La adición de glucosa junto con piruvato, aumenta los porcentajes de ovocitos que alcanzan la maduración nuclear, así como la obtención de blastocistos (31 %) (Yuan *et al.*,2016), (Lattanzi., 2010).

### **3.- Fertilización *in vitro* (FIV)**

La fertilización *in vivo* se define como la penetración del espermatozoide en el ovocito para que se logre la formación de un cigoto. En la fertilización *in vitro* se busca emular los eventos que ocurren *in vivo* desde la capacitación espermática hasta la unión de los dos pronúcleos y la expulsión del segundo cuerpo polar. La capacitación espermática *in vivo*, se define como un conjunto de eventos en el espermatozoide, que le proporcionan los cambios bioquímicos necesarios para adquirir su capacidad de penetrar la zona pelúcida y subsecuentemente el ovocito (Leemans *et al.*, 2019).

Las modificaciones que se llevan a cabo en la membrana plasmática del espermatozoide incluyen:

- a) La eliminación de sustancias adquiridas durante su trayecto en el epidídimo y en las glándulas accesorias.
- b) La disminución de la concentración de colesterol, que da lugar a la desestabilización de la membrana plasmática desencadenando eventos como el aumento en la permeabilidad de la membrana activando los canales de calcio y sodio/potasio, aumentando la generación de ERO, además de la fosforilación de tirosina de las proteínas y aumento de pH. En general, los sucesos mencionados tienen como objetivo el aumento del metabolismo y la hiperactivación espermática (Rodríguez-Martínez., 2008).

La capacitación espermática, se lleva a cabo en el tracto reproductor de la hembra. Es allí donde sucede el contacto entre las proteínas seminales y los fosfolípidos presentes en las secreciones de la hembra, lo que origina la reacción acrosomal. Ésta se define como la liberación del contenido del acrosoma a consecuencia de la interacción del espermatozoide con el ovocito, debido a la presencia de moléculas que participan en el reconocimiento específico (Arenas *et al.*,2010).

---

---

### 3.1.- Componentes del medio de cultivo para la FIV

Todos los medios de cultivo están basados en fórmulas similares a los medios de maduración de ovocitos, que suelen incluir iones, compuestos energéticos (glucosa, lactato o piruvato), aminoácidos, alguna macromolécula biológica (albúmina sérica bovina, BSA) o sintética como el PVA, vitaminas, agentes quelantes, antioxidantes, hormonas o factores de crecimiento, antibióticos y un sistema amortiguador para mantener estable el pH (Gardner., 2008).

La comprensión de los eventos *in vivo* de la capacitación espermática es vital, ya que es la base para reproducir dicho proceso en condiciones *in vitro* utilizando medios como la solución salina de fosfatos amortiguada de Dulbecco (DPBS), suplementada con diversos compuestos que promueven la capacitación espermática *in vitro*. Posteriormente a la capacitación, se realiza la FIV utilizando medios de cultivo suplementados con diversos compuestos. Entre los medios utilizados para hacer el cocultivo de los gametos están el medio Tris-buffer modificado (mTBM), TCM-199, y el medio tyrode's albúmina lactato piruvato (TALP). Éstos, contienen aminoácidos y proteínas que controlan la osmolaridad, regulan el pH intracelular, además de que funcionan como sustratos de energía, precursores de proteínas y ácidos nucleicos (Abeydeera., 2002). El papel de estos compuestos es la participación en los eventos moleculares antes y durante la fertilización. La cafeína, induce capacitación espermática y disminuye la polispermia en un 40%; comúnmente los cultivo para FIV son suplementado con BSA para aumentar la fertilización (Romar *et al.*, 2015).

### 3.2.- Medio TBM

De los medios elaborados para realizar la co-incubación de los gametos se encuentra el TBM. Este medio busca reducir las tasas de polispermia y la baja formación de pronúcleos, al ser considerado amortiguador biológico para estabilizar el pH, tiene efectos importantes en el ovocito. Se ha reportado que influye sobre su maduración y fertilización específicamente en la distribución de los organelos; mientras que su utilización en el desarrollo embrionario retarda el crecimiento y metabolismo del embrión. En el espermatozoide, tiene efectos importantes en la movilidad y, por ende, en su unión al ovocito (Abeydeera *et al.*, 1997).

---

---

### **3.3.- Compuestos añadidos al medio**

El medio TBM posee cloruro de calcio, cloruro de sodio y cloruro de potasio que sirven para estabilizar el pH semejando al de los fluidos biológicos, mismo que oscila entre 7 y 8. Los compuestos como el TRIS, se utilizan ampliamente como amortiguadores y éste se caracteriza ampliamente como componente principal del TBM; además de que también ha sido usado ampliamente como diluyente en la criopreservación de semen. El benzoato de cafeína ejerce su función sobre la hipermovilidad espermática (Barak *et al.*,2015).

### **4.- Desarrollo embrionario**

Está conformado por una serie de eventos y mecanismos que participan en la diferenciación del nuevo organismo. Los sucesos principales son la segmentación y la gastrulación. En la primera se dan los procesos de división mitótica hasta lograr un blastocisto que es la etapa transferible, donde los blastómeros se reparten por todo el citoplasma adoptando una posición en lo que se conoce como masa celular interna y trofotodermo. En la gastrulación culmina con la formación de la gástrula que se caracteriza por la formación de las capas germinales: epiblasto e hipoblasto, a partir de las cuales se van a diferenciar en ectodermo, mesodermo y endodermo (Plusa y Hadjantonakis., 2016).

#### **4.1.- Medios de cultivo para el desarrollo embrionario**

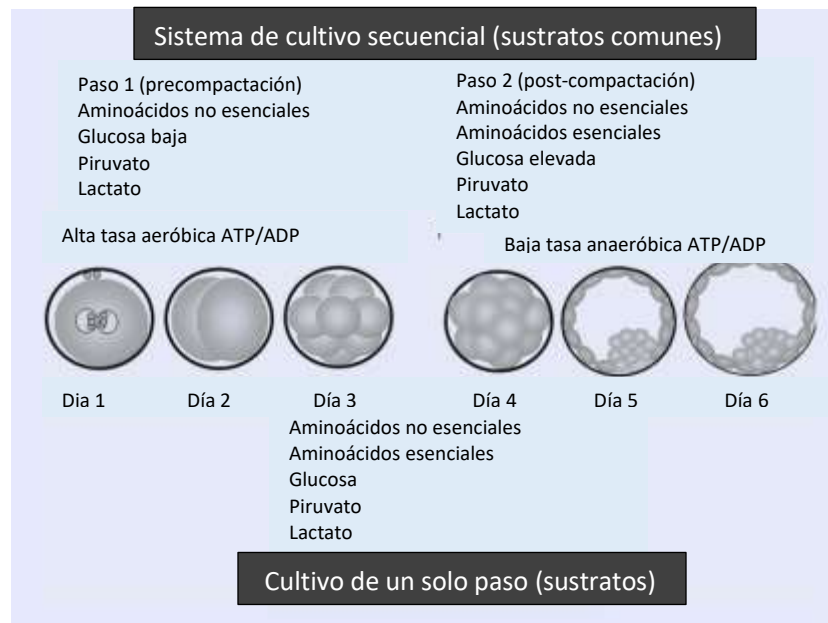
Desde el establecimiento de la FIV, se han formulado medios de cultivo para contribuir al desarrollo embrionario, aplicado a diferentes especies animales incluyendo la humana. En los últimos años, se ha venido dando un aumento sustancial sobre el conocimiento y bioquímica del desarrollo embrionario. La función de los componentes de los medios de cultivo permite que se lleven a cabo los eventos moleculares durante el desarrollo embrionario (Lane y Gardner., 2007).

La importancia de la composición de los medios de cultivo tiene una influencia sobre esta etapa al impactar sobre el número de ovocitos fertilizados que se convierten en blastocisto y su fisiología celular (metabolismo, expresión de genes y regulación del desarrollo normal). En la suplementación del medio para el desarrollo embrionario se procura disminuir el daño celular, el cual tiene repercusión en la viabilidad y calidad del embrión, mismo que se ve reflejado en la compactación embrionaria (Lane y Gardner., 2007).

Los cambios que ocurren en la formación del embrión requieren gran cantidad de energía considerable; la diferenciación celular requiere una adecuada expresión de genes para realizar el

metabolismo y homeostasis celular. Además, la finalidad del uso de los medios de cultivo es satisfacer las necesidades cambiantes del embrión intentando emular lo que sucede *in vivo*, donde la composición del líquido oviductal difiere de la del líquido uterino (Swain., 2019) (b).

Se ha reportado que los cigotos, inicialmente dependen completamente del metabolismo de la mitocondria para la producción de ATP y por lo tanto presentan una baja actividad metabólica o quiescente; esto quiere decir que los metabolitos para mantener las funciones del cigoto son diferentes a los que generalmente se conocen como la glucosa; siendo los sustratos preferidos los ácidos pirúvico y carboxílico, además del aspartato (Lane., 2006). Es por ello, la importancia de promover el desarrollo de los embriones en medios de cultivo adecuados, para proveer sustratos y eliminar subproductos metabólicos potencialmente dañinos, como el amoníaco, resultado del metabolismo de la glutamina. Dado lo anterior, se ha optado por los medios de cultivo secuenciales en lugar de los monocultivos, debido a que se asemeja más a los eventos metabólicos observados *in vivo* (Swan., 2019) (b). Los componentes clave se observan en la Figura 3.



**Figura 3. Componentes clave del sustrato energético de los medios de cultivo de embriones (modificado de Swain, 2019) (b).**

---

---

Los medios de cultivo más utilizados para esta etapa se encuentran: los análogos de fluido oviductal, como TALP (Tyrode con albumina, lactato y piruvato), KSOM (“Mouse Embryo Media”), CR1 (“Medio Charles Rosenkrans”) y SOF (“Fluido Oviductal Sintético”) (Cortés., 2011).

El sistema de PEIV limita el desarrollo embrionario, posiblemente por ausencia de algunos componentes (Yuan y Krisher., 2010), los tiempos de maduración, por ejemplo, en ovocitos porcinos, es de 42 a 44 h, mientras que en bovinos y ovinos es de 22- 24 h, la FIV es de 5 a 6 h y la formación de blastocistos hasta 144 h, en condiciones apropiadas de temperatura (38.5 °C), CO<sub>2</sub> (5 %) y de humedad (95 %); parámetros importantes en los protocolos de PEIV (Casillas., 2014)

#### **4.2.- Medio NCSU**

Este medio es de los más utilizados, al mismo tiempo que con su aplicación se han obtenido embriones de calidad. Considerado como de más los fáciles de preparar y que a diferencia de otros medios como el medium Eagle’s, se obtiene una mayor cantidad de embriones en etapa de blastocisto (Hashem *et al.*, 2007).

#### **4.3.- Compuestos añadidos al medio**

Las sales NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCHO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O (fuente de iones de calcio) y Mg SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O funcionan como amortiguadores de pH, se caracterizan por su solubilidad y pH de 7.2 a 7.5. La glucosa participa en el metabolismo del embrión, aunque varias publicaciones reportan que a altas concentraciones (4.5 Mm) (Iwata *et al.*, 1998), retrasan la división celular de los embriones de humano, caprino y bovino, atribuyendo que el posible retraso puede deberse a la presencia de otros compuestos que no actúan de manera sinérgica (Lane., 2007).

El SFB y la BSA estimulan la progresión del desarrollo embrionario de la etapa de cigoto a blastocistos. Las proteínas, son fuente de nutrientes para los embriones en estadios tempranos y proporcionan factores de crecimiento que estimulan la progresión de su desarrollo, también reducen la toxicidad de algunos suplementos del medio y productos del metabolismo embrionario. Los aminoácidos no esenciales (como la cisteína y glutamina), promueven la división celular en etapas tempranas de desarrollo y promueven la del blastocisto; mientras que los aminoácidos esenciales (como la metionina y triptofano) desarrollan la masa celular interna de los blastocistos. Abeydeera *et al.*, (2002) proponen la adición de piruvato y lactato como sustratos energéticos durante las primeras 72 h de cultivo. En el caso de la hipotaurina, precursor de la taurina, se ha visto su efecto en los

---

---

medios de cultivo sobre la inducción de la capacitación espermática, movilidad, fertilización y desarrollo embrionario. Además de que, por el estrés oxidativo, las células pueden sufrir lipoperoxidación; tanto la taurina como la hipotaurina participan como “antioxidantes”. La función antioxidante de la hipotaurina en los medios de cultivo de desarrollo embrionario es prevenir la lipoperoxidación espermática que, y durante este último proceso se oxida a taurina y esta puede ser clorinada por medio de la enzima mieloperoxidasa cuando reacciona con el  $H_2O_2$  (Guerin y Menezo., 1995).

## **5.- Uso de la solución tampón HEPES**

El HEPES es considerado como un compuesto amortiguador al igual que el TBM, es utilizado para el lavado y criopreservación de ovocitos. Además de que es una mezcla de amortiguadores, se utiliza ampliamente en los cultivos celulares. Posee una alta solubilidad, impermeabilidad a la membrana, limitado efecto en las reacciones bioquímicas y enzimáticamente estable (Swan., 2019).

### **5.1.- Componentes añadidos al medio**

El HEPES es un amortiguador y juntamente con los compuestos NaCl, KCl,  $NaH_2PO_4$ , lactato de sodio,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , piruvato de sodio y  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , va a mantener el pH adecuado, además de no intervenir en las reacciones metabólicas del ovocito. Aunado a esto, mantienen una osmolaridad adecuada, ya que en exceso afecta el desarrollo embrionario (Swan., 2019). La gentamicina y penicilina G son los antibióticos aminogluosidos más usados. (Zhou *et al.*, 2000).

## **6.- Utilización de DPBS (solución tamponada de fosfato Dulbecco's) como medio de lavado y capacitación de espermatozoides**

La capacitación espermática *in vitro* requiere medios de cultivo con los que se pueda emular los eventos *in vivo*. Yanagimachi y Chang (1963), fueron pioneros en desarrollar un medio para capacitación *in vitro* (Echeverry., 2008). Actualmente se han desarrollado diferentes medios para apoyar este proceso; de los medios más utilizados es el DPBS, que es una solución isotónica suplementado con agentes capacitantes para mantener la integridad y estructura de las células (Echeverry., 2008).



---

---

## 6.1.- Componentes añadidos al medio

La penicilina y estreptomina cumplen la misma función que en los otros medios de cultivo. El cloruro de calcio anhidro, promueve la entrada del flujo de calcio para activar la hipermovilidad espermática. La BSA, al estar presente *in vivo* en el tracto reproductor femenino, participa en el proceso de capacitación espermática.

## 7.- Especies reactivas de oxígeno (ERO)

El uso de los medios de cultivo para la PEIV requiere de mayor estudio. Sobre todo, el tipo de componentes que se les añaden; éstos deben ser cuidadosamente seleccionados ya que influyen directamente sobre los gametos y en el potencial del desarrollo del embrión (García-Díaz *et al.*, 2013). Dicho potencial, además de ser afectado por la composición de los medios de cultivo, también se ve afectado por el exceso de las concentraciones de ERO presentes en la fisiología normal de un organismo, específicamente en los procesos reproductivos. En la actualidad los estudios enfocados en la PEIV determinan que una de las principales causas de la ineficiencia de los medios de cultivo, que es la producción de ERO. En los sistemas de cultivo para embriones, es común la formación de estas moléculas y se ha determinado, que tienen efecto en los ovocitos, espermatozoides y embriones, alterando la fisiología celular (Martín-Romero *et al.*, 2008).

### 7.1.- Definición e importancia de las ERO

Las ERO se caracterizan por ser lábiles químicamente. Son definidas como moléculas inestables y metabolitos parcialmente reducidos derivados del oxígeno. En consecuencia, su vida media es corta con la capacidad de reaccionar con todas las moléculas de importancia biológica (lípidos, ácidos nucleicos y proteínas) (Córdova *et al.*, 2018). Las moléculas que constituyen la naturaleza, cuentan con máximo 2 electrones en su último orbital, pero con espines opuestos confiriéndoles estabilidad química (Camargo y Ramírez., 1999). Sin embargo, existen moléculas que son producto de la reducción parcial del **oxígeno molecular** (O<sub>2</sub>) durante los procesos metabólicos, llamadas ERO. Algunas de estas moléculas se caracterizan principalmente, por poseer uno más electrones sin su par correspondiente (radical libre), lo que le confiere gran reactividad química (Torres-Osorio *et al.*, 2019).

---

---

En las funciones normales del metabolismo aeróbico celular, se producen las ERO y su participación de éstas tiende a ser de gran trascendencia, al actuar como una molécula de señalización de varias vías y de regulación de ciertos procesos celulares, por ejemplo, en la actividad de las fosfatasa, quinasas y la expresión de factores de transcripción, donde alteran su unión a elementos genómicos. Es aquí donde la concentración de ERO es dependiente de estos procesos, jugando un papel importante de modulación oxidativa (González *et al.*, 2007).

## **7.2.- Principales ERO**

Dentro del grupo de ERO, se encuentran al oxígeno molecular ( $O_2$ ), el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), hidroperóxido ( $HO_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). También existe otro grupo, que abarca ciertos metales de transición ( $Fe^{3+}$  o  $Cu^{2+}$ ) que pueden actuar como catalizadores en la formación del radical hidroxilo. En el Cuadro 1, se describen las características de las ERO.

**Cuadro 1. Principales ERO y sus características (modificado de González *et al.*, 2000).**

Radical	Nombre	Características
$O_2^-$	Superóxido	Es producido en todas las células eucariotas, principalmente en el retículo endoplásmico, NADPHOX (nicotinamida adenina dinucleotido fosfato) citocromo-P450, y en cadena de transporte coenzima Q) formado a partir de una molécula de oxígeno, en presencia de una cantidad suficiente de energía para adquirir el electrón complementario y también como producto de reacciones de xantinas, catecolaminas, etc. Su eliminación es a través de la enzima superóxidodismutasa (SOD) y es la ERO más común producida por las células.
$O_2^1$	Oxígeno singulete	Uno de los electrones del $O_2$ , cambia de giro al captar energía (energía electromagnética). La dismutación espontánea del $O_2^-$ , genera oxígeno singulete. Esta molécula tiene la capacidad de sustraer un hidrógeno ( $H^+$ ) de un ácido graso insaturado, iniciando de este modo la reacción de la lipoperoxidación.
$H_2O_2$	Peróxido de hidrógeno	Se forma cuando cada uno de los electrones libres del $O_2$ se ha apareado con un electrón de giro contrario. La reacción de la SOD produce la mayor parte del peróxido en las células. Se puede difundir a través de los compartimientos celulares. Tiene la capacidad de formar $\bullet OH$ y $O_2^1$ , su toxicidad se debe a que puede reaccionar con algunos metales de transición como el Fe, centros Fe-S, con los que produce el radical $\bullet OH$ . Participa en la capacitación espermática y en el reinicio de la meiosis del ovocito, por lo que se considera que actúa como segundo mensajero.
$OH$	Radical hidroxilo	Puede reaccionar con cualquier aminoácido en el sitio donde se origina, que por lo regular son sitios donde se hallan metales de transición, por lo que casi todos los compuestos pueden reaccionar con el $\bullet OH$ que se produce principalmente por la reacción de Fenton, en la cual un electrón del metal es captado por el $H_2O_2$ . Es la especie más reactiva y se le ha relacionado con el daño producido directamente en el ADN, proteínas y lípidos.

---

---

### 7.3.- Funciones y mecanismos de acción de las ERO

Las ERO, tienen una multifuncionalidad en diversos procesos celulares, tales como la proliferación, diferenciación e intervención en procesos apoptóticos. Una de las funciones más conocidas es el papel que desempeña en el sistema inmune contra agentes patógenos externos. Por otro lado, se ha reportado la acción antiinflamatoria, mediante la reducción de la expresión de mediadores inflamatorios (prostaglandinas, leucotrienos, citocinas etcétera). Otra de sus funciones, es la inactivación de las “fosfatasa de tirosina” por medio del proceso de oxidación, en el cual ataca a los grupos sulfhidrilos de los residuos de proteínas, éste es un proceso reversible. Esto da como resultado cambios en el destino de proteínas, particularmente, inactivando la fosfatasa correspondiente y así inducir la difusión de la señal, mediante receptores tirosin-cinasa asociados a vías de transducción que incluyen a la vía AMPK. Lo anterior, remarca el papel de las ERO como reguladores de cascadas de señalización intracelulares (Carvajal., 2019).

El mecanismo de acción de las ERO, se conoce como “mecanismo en cadena,” que se define como el conjunto de pasos en la cual se obtiene más de una molécula como producto por cada evento de inicio. Generalmente se divide en tres etapas:

Inicio. Es donde se generan los primeros radicales libres, a partir de moléculas estables.

Propagación. Consiste en la obtención de nuevos radicales a partir de otros, caracterizada por mantener el carácter de radical, y así sucesivamente se va formando la cadena sin la necesidad de iniciar nuevamente el mecanismo; la manera en la que esta etapa puede concluir es el agotamiento del sustrato o que se realice la etapa de terminación.

Terminación. Esta última está dada, porque ya no se forman nuevos radicales libres por la falta de sustrato, perdiéndose así, dicho carácter por la formación de moléculas estables (Königsberg, 2008).

La lipoperoxidación es un mecanismo en cadena que ocurre en las membranas biológicas, generando productos tóxicos que alteran la estructura y función de la célula en cuestión; más específicamente la actividad de canales, receptores y enzimas presentes. Las moléculas que son susceptibles a la acción de las ERO son los **ácidos grasos poliinsaturados** (AGP) distinguidos por la presencia de enlaces dobles conjugados, haciendo de estas moléculas, compuestos de alta reactividad y, por lo tanto, de propagación.

---

---

La etapa de iniciación se establece por la formación de los radical libres a partir de los AGP, por la acción de las ERO capaces de abstraer un átomo de  $H^+$  del grupo metileno; esto se estabiliza mediante la formación del dieno que reacciona con el  $O^2$  formando así, el radical peroxilo ( $ROO\bullet$ ) que, debido a su gran poder oxidante, tiene la facultad de abstraer otro átomo de  $H^+$  del grupo metileno de un AGP adyacente a otro AGP, donde inició la reacción en cadena. En consecuencia, se genera un lipoperóxido ( $ROOH$ ), que puede ser de reciente formación o por una acumulación de éste, como resultado del proceso de lipoperoxidación anterior. La etapa de propagación está dada por la reacción en cadena a través de la membrana biológica. Al existir metales de transición como el Cu y Fe, el  $ROOH$  puede reaccionar con ellos formando de nueva cuenta, un radical  $ROO\bullet$ . En caso de la interrupción de esta etapa, puede formarse un alcoxilo ( $RO\bullet$ ) que también puede reaccionar con grupos metileno de un AGP de otra cadena adyacente y propagar el proceso. La tercera etapa de terminación es donde el radical lipídico reacciona con otra molécula para formar un dímero dentro de la membrana celular y con ello, alterar la permeabilidad. Otro mecanismo que puede terminar la lipoperoxidación es la ciclización, proceso poco estable. En él, la molécula oxidante reacciona con la vitamina E y la Coenzima-Q10, que forman parte de los compuestos antioxidantes. El primer antioxidante mencionado tiene la capacidad de convertirse en un radical tocoferilo estable al donar un hidrógeno, haciendo del  $ROO\bullet$  un  $ROOH$ . Al interrumpirse la lipoperoxidación, el tocoferilo puede regenerarse a partir de interacciones con la coenzima-Q10 (Königsberg., 2008).

#### **7.4.- Factores que inducen la producción de las ERO**

Las principales fuentes intracelulares, abarcan procesos que forman parte del metabolismo aeróbico, específicamente en los complejos mitocondriales I y III que forman parte de la cadena de transporte de electrones, peroxisomas, mono y dioxigenasa, sistemas enzimáticos P450 y xantina oxidasa. Los factores externos también pueden producir altas tasas de ERO, como la exposición a xenobióticos, radiaciones ultravioletas, drogas, toxinas, carcinogénicos, humo de cigarro, pesticidas etcétera (Huerta *et al.*, 2005).

En la cadena de transporte de electrones, la formación de ERO se da en los complejos I y III. Para poder producir ATP a partir de ADP y  $P_i$ , es necesaria la generación de un gradiente  $H^+$  y la participación de ATP-sintasa. La ausencia de ADP, modifica el flujo de  $H^+$  haciendo que se haga más lento y, por lo tanto, la cadena de transporte se encontraría más reducida y surge un aumento del anión superóxido. Específicamente, en la respiración celular es la actividad de mayor producción de ATP y los componentes que forman parte en dicho proceso son las mitocondrias (Königsberg., 2008).

---

---

Estos organelos, al ser acumuladores de calcio y contener algunas de las enzimas de la cadena de transporte que al mismo tiempo forman parte del ciclo de Krebs, motivan a que exista una relación en que las elevadas concentraciones de calcio puedan modificar simultáneamente la actividad metabólica, aumentando el funcionamiento de la cadena de transporte y, por ende, una producción de ERO más allá de lo basal. El exceso de estas propicia la pérdida de la funcionalidad a enzimas del ciclo de Krebs. También las ERO pueden actuar sobre otros organelos como el retículo endoplásmico, influyendo en la liberación de calcio. En el complejo III, no se tiene muy clara la formación de superóxido, pero se propone que puede ser por la formación de un intermediario por autooxidación de la ubisemiquinona, para la translocación de  $H^+$ . La ubisemiquinona es reducida en la parte que está en el lado interior de la mitocondria, después “viaja” hacia el exterior sacando dos  $H^+$ . Estos dos electrones pasan a transferirse al centro Fe-S y de ahí al citocromo  $C_1$ , quedando la ubisemiquinona como  $\bullet UQ$ . El electrón que contiene lo transfiere a grupos hemo para formar el ciclo y al final la molécula queda nuevamente oxidada como al inicio, aunque puede surgir fuga de electrones que pueden unirse con el oxígeno singulete para formar, a su vez, anión superóxido (Königsberg., 2008).

Otros procesos de formación de ERO no menos importantes son: la autooxidación de catecolaminas que son degradadas por amino-oxidasas que da lugar a la formación excesiva de electrones.; la síntesis de prostaglandinas, donde la ciclooxigenasa produce radicales  $\bullet OH$ ; la oxidación de hipoxantina y xantina para la producción de ácido úrico, reacción mediada por xantina-oxidasa, donde se da la reducción de oxígeno molecular a anión superóxido (Königsberg., 2008).

## **8.- Fisiología de las ERO en los gametos**

Durante la MIV, la función de las ERO es indispensable en el reinicio de la meiosis de los ovocitos que se encuentran en estado de diploteno. En los espermatozoides, participan en los procesos de capacitación espermática, hiperactivación y la fusión espermatozoide-ovocito. Los factores *in vitro* que contribuyen a una sobreproducción de ERO son: la criopreservación, la concentración de oxígeno, la fuente de energía, la luz y el tipo de medio de cultivo; este último en función de su composición, contribuye a la producción de ERO (Figura 8). La acumulación de ERO puede ser producto del metabolismo, debido a los compuestos que están presentes en los medios de cultivo indispensables para las células. Varias rutas metabólicas producen energía, algunas son: la fosforilación oxidativa, la NADPH-oxidasa y la xantina-oxidasa. Los medios también pueden contener iones metálicos ( $Fe^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ ) que pueden participar en la generación de ERO (como el

radical  $\bullet\text{OH}$ ), a través de las reacciones de Fenton y Habber-Weiss, y por peroxidación lipídica iniciada por  $\bullet\text{OH}$  (Torres- Osorio., 2019).

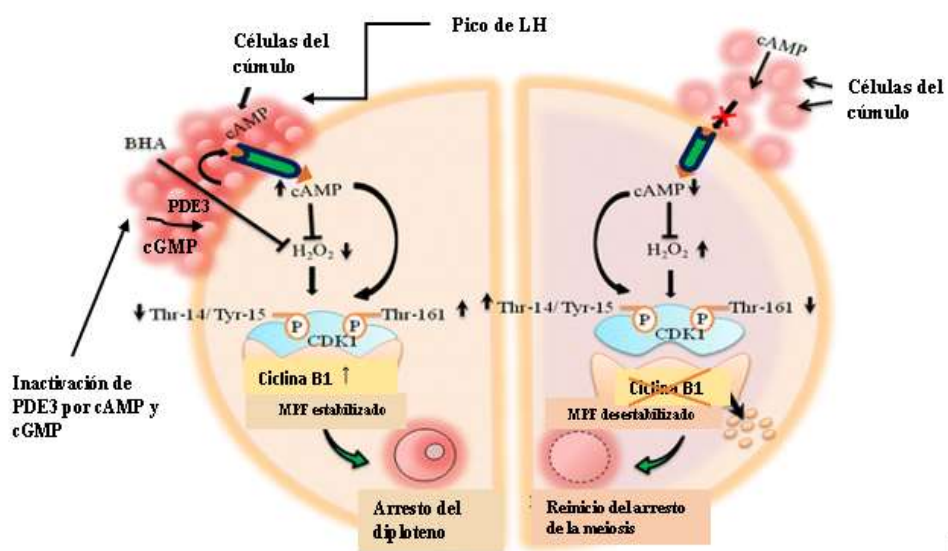


**Figura 8. Efectos del estrés oxidativo y las fuentes de ERO durante la PEIV(modificado de Torres-Osorio., 2019).**

### 8.1.- Fisiología de las ERO en el ovocito

Las ERO en el tracto reproductivo femenino, funcionan como segundos mensajeros participando en la fisiología del folículo (promoviendo su desarrollo), la ruptura del folículo, el reinicio de la meiosis, la apoptosis de los folículos no dominantes, la disolución del cuerpo lúteo, la unión del espermatozoide al ovocito, la síntesis de progesterona y la angiogénesis del embrión. Se han detectado importantes cantidades de ERO en el líquido folicular dada la presencia de macrófagos, citocinas y leucocitos. Esto quiere decir que el contenido del líquido folicular va a apoyar los procesos involucrados en el desarrollo del ovocito (Lu *et al.*, 2018) (a).

El proceso importante que ocurre en la MIV es el reinicio de la meiosis en mamíferos. Se requiere cierta cantidad de ERO para dicho evento. El incremento de estas induce la fosforilación de Thr14 / Tyr15 de la cinasa 1 dependiente de ciclina (Cdk1) y reduce los niveles de Cdk1 fosforilada con Thr161 y ciclina B1 (Tiwari *et al.*, 2016) y esto activa al factor promotor de la maduración, este factor está involucrado junto con el EGF en la activación de MAPK disminuyendo los niveles de AMPc por la fosforilación de la conexina-43 lo que finalmente da como resultado la reanudación espontánea de la meiosis en los ovocitos (Figura 9) (Casillas, 2014; Pandey y Chaube., 2014).



**Figura 9. Diagrama esquemático que muestra la hipotética y posible participación de cAMP y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante reanudación meiótica espontánea en el ovocito (modificado de Pandey y Chaube., 2014).**

Después de la fertilización, durante el desarrollo embrionario se requiere de una serie de divisiones y procesos de diferenciación de los blastómeros para alcanzar el estado de blastocisto. Esta etapa de desarrollo se ve influenciada por el transporte de iones y los cambios en el pH. Además de que se requiere una mayor demanda de ATP a través de la fosforilación oxidativa y, por lo tanto, un aumento en el metabolismo y de la generación de ERO, como, por ejemplo: el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el •OH. Estos últimos son productos de la secreción de enzimas peroxisomales, de la actividad de la cadena de transporte de electrones y del plegamiento de las proteínas del retículo endoplásmico. Las fluctuaciones de ERO van a depender en gran medida del estado de desarrollo y su regulación apropiada. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> participa y regula de manera positiva la proliferación celular, por medio de la regulación de factores de transcripción como el NF-κB e HIF-1; el primero ha sido implicado en la división y proliferación



---

---

celular, del mismo modo en la activación del genoma embrionario, mientras que el HIF-1 se expresa en las células de la granulosa y en el endometrio durante la implantación, al mismo tiempo que en la regulación de vías que permiten expresar los genes involucrados en la supervivencia celular y la angiogénesis (Jamil *et al.*, 2020).

En el caso del tracto reproductor femenino, la presencia de ERO es de gran importancia tanto en humanos como en especies animales de interés económico. Ya que se han reportado diversos estudios en el ovocito, específicamente en las células del cúmulo en los que, al establecer una comunicación bidireccional con el ovocito, le confieren una protección antioxidante contra las ERO por la expresión de enzimas. La actividad antioxidante de las células del cúmulo al ovocito está correlacionada con la calidad embrionaria (Gorshinova *et al.*, 2017).

Los efectos negativos de la ERO se ven reflejados en la calidad y viabilidad del ovocito. Al mismo tiempo, se ha visto que la comunicación entre las células de la granulosa con el ovocito se ve reducida por un exceso de ERO, afectando el suministro de nutrientes que permiten el desarrollo del ovocito. La detención del ciclo meiótico, al ser inducida por las ERO por encima de los niveles fisiológicos, afecta la supervivencia celular mediada por las mitocondrias (Prasad *et al.*, 2016). En el desarrollo embrionario, los efectos perjudiciales van a estar relacionados con la baja calidad del embrión y la muerte en estadios embrionarios tempranos (Jamil *et al.*, 2020).

En los perfiles patológicos, el incremento de las ERO se asocia con diversas enfermedades. Una de ellas es el síndrome de ovario poliquístico (SOP), que se caracteriza por procesos inflamatorios relacionados con la obesidad, la hiperglucemia y la resistencia a la insulina. Durante la inflamación, se ha visto que factores de crecimiento y células del sistema inmune como los macrófagos, son los responsables de la producción excesiva de ERO en el fluido folicular. Las consecuencias de este incremento se ven reflejadas en alteraciones en el ADN y el metabolismo mitocondrial, al igual que en las tasas de maduración de ovocitos, fertilización, desarrollo embrionario e implantación, que se ven drásticamente reducidas. Otro padecimiento común es la endometriosis, definida como una patología asociada con una inflamación crónica del endometrio, incrementando la actividad angiogénica y la proliferación de las células del endometrio. Esta enfermedad ha sido asociada con fallas en la actividad del sistema inmunológico. El estrés oxidativo generado, provoca lesiones en el ADN, esterilidad, fallas en la fertilización, en el desarrollo embrionario y en la preimplantacional (Jamil *et al.*, 2020).

---

---

## 8.2.- Fisiología de las ERO en el espermatozoide

El estrés oxidante en espermatozoides se refiere al daño que provocan las ERO en sus componentes, como consecuencia, puede disminuir la viabilidad, provocar alteraciones en el metabolismo, incrementar la lipoperoxidación, la fragmentación del ADN, además de afectar su calidad y capacidad de unión al ovocito para formar el cigoto (Córdova *et al.*, 2018).

El exceso de ERO juega un papel predominante en la calidad seminal, lo que trae consigo efectos nocivos en la fertilidad masculina. Por ello, se le ha prestado atención en el ámbito de la criopreservación de semen, debido a que se ha reportado que las bajas temperaturas dan como resultado una mayor concentración de ERO que en el semen fresco. La vulnerabilidad ante las ERO se debe a que la membrana espermática es rica en fosfolípidos unidos a AGP, haciendo esta estructura altamente susceptible al daño oxidativo por la presencia de dobles enlaces, facilitando la sustracción de H<sup>+</sup>, que es el paso inicial de la lipoperoxidación (Hernández., 2013). El espermatozoide presenta una organización especial de su material genético. Durante el proceso de espermatogénesis, estas células tienen que atravesar por una serie de cambios donde las histonas son reemplazadas por proteínas de transcripción y posteriormente por protaminas, las cuales al interactuar con el ADN le confieren una compactación altamente efectiva y resistente, protegiendo así la integridad del material genético durante su paso por el tracto reproductor tanto masculino como femenino. De lo contrario, por un mal empaquetamiento de la cromatina, el daño se puede producir en el ADN espermático, mismo que está asociado a un exceso de ERO. Siendo éste una de las causas de los problemas de fertilidad (Arenas *et al.*, 2014).

Las fuentes principales de producción de ERO en espermatozoides son la NADPH-oxidasa y la mitocondria. Aunque se ha encontrado que la actividad máxima de NADPH-oxidasa está presente en espermatozoides testiculares, es decir, que no han pasado por el proceso de maduración epididimaria. Después de este último proceso, la cantidad de ERO va disminuyendo, concluyendo que la disminución de la actividad de la oxidasa está asociada y la participación de ERO es inversamente proporcional al grado de maduración (Arenas *et al.*, 2014). Otras fuentes de ERO en espermatozoides, son los neutrófilos. La función que desempeñan es la destrucción de patógenos que afectan la calidad del semen, mediante la producción de ERO como respuesta a infecciones (Córdova *et al.*, 2018).

Los niveles basales y fisiológicos de ERO, juegan un papel importante en la capacitación espermática, ya que intervienen en la fosforilación de residuos de tirosina-quinasa. Existen estudios que avalan

---

---

que este proceso proporciona estabilización al espermatozoide, ésto se debe a que en las fosfatasa existe un sitio activo en donde radica la existencia de la cisteína, misma que es sensible a reacciones “redox”. Tras la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las cisteína se oxida a ácido sulfénico; esto es fundamental para la inactivación de ciertas vías o procesos que facilitan que el espermatozoide adquiera la capacitación espermática. Es por ello, la importancia de mantener un adecuado nivel de ERO (Arenas., 2009).

### **8.3.- ERO en el embrión**

Las ERO tienen un papel importante durante la diferenciación del embrión; sin embargo, se considera que el estrés oxidativo causado por estas moléculas es una de las principales causas de detención de desarrollo embrionario de los mamíferos durante la primera semana del cultivo *in vitro*. Los excesos de las ERO como productos del metabolismo celular, tienen efectos nocivos en el embrión como daño a biomoléculas y apoptosis, siendo el radical •OH y el anión O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>, las principales moléculas que provocan dicho daño (Favetta *et al.*, 2007).

Las ERO al ser un subproducto de la fosforilación oxidativa de la mitocondria, es de gran importancia el buen funcionamiento de este organelo para el mantenimiento del equilibrio redox celular, ya que el embrión es susceptible a los cambios de este, provocando la detención de la división y diferenciación en el momento de la activación del genoma. Aunque los embriones han desarrollado un sistema de defensa antioxidante intracelular (NADH, NADPH y GSH) complementada con la presente en el fluido oviductal (vitamina C, E, A, etcétera), estos son sensibles, posiblemente a que en condiciones *in vivo* hay un ambiente hipóxico en el oviducto (Dumollard *et al.*, 2009).

El desarrollo embrionario se lleva a cabo cuando el espermatozoide fertiliza al ovocito y provoca el aumento de las concentraciones de calcio y de consumo de oxígeno. Esto último se desarrolla con el aumento en los niveles de las ERO, sugiriendo que éstas moléculas tienen un papel fundamental en el control del ciclo celular, aunque actualmente se desconocen los mecanismos por los que participan (Han *et al.*, 2018).

---

---

## **9.- Antioxidantes**

### **9.1.-Breve historia de los antioxidantes**

El término “antioxidante” se refiere a un producto químico que no utiliza el oxígeno para su obtención. A finales del siglo XIX, muchos de los estudios sobre antioxidantes fueron aplicados a la industria, entre los cuales están: la prevención de la corrosión del metal y en los procesos de polimerización de combustibles. El primer estudio sobre la función que desempeñan los antioxidantes se enfocó en la prevención de la oxidación de grasas insaturadas, a la vez que se midió la tasa de consumo de oxígeno. Los primeros antioxidantes que se identificaron fueron las vitaminas A y E, fue a partir de ese momento cuando se enfocó una mayor atención en los antioxidantes, luego de conocer el papel de la vitamina E en el mecanismo de lipoperoxidación e identificación de agentes reductores que cumplen la función de eliminar el exceso de ERO de la célula (Córdova *et al.*, 2018).

### **9.2.- Definición y tipos de antioxidantes**

Los antioxidantes se definen como los compuestos o sustancias que disminuyen la oxidación del sustrato y son el principal mecanismo de defensa contra el daño oxidativo inducido por los radicales libres. Abarcan un grupo muy diverso conformado por compuestos, vitaminas, minerales y enzimas que son necesarias para que el organismo realice sus funciones vitales de manera adecuada. En el aspecto reproductivo, participan en la prevención de la oxidación de moléculas biológicas y proveen las condiciones óptimas para el desarrollo de los gametos masculino y femenino (Barroso-Villa *et al.*, 2015). Su eliminación va a depender, del sistema antioxidante que posea y de la expresión génica de estos antioxidantes (Torres-Osorio *et al.*, 2019).

Se debe tomar en consideración que un antioxidante no siempre será aquel compuesto que “atrape” algún radical libre, ya que las ERO al ser consideradas como moléculas que tienen un período de vida corto (nanosegundos) y una fácil propagación, se considera sumamente difícil que un antioxidante esté presente justo en el momento para evitar los daños producidos por estos compuestos. Esto quiere decir que un antioxidante va a prevenir la formación de los radicales libres y no a “atraparlos” cuando ya estén formados, esto es realizado por las enzimas antioxidantes que catabolizan reacciones específicas.

Al haber bajas concentraciones de antioxidantes en comparación con los sustratos oxidables, la oxidación se previene por medio de cuatro mecanismos:

- 
- 
- a) Agentes que remueven los radicales libres por medio de la reacción catalítica entre ellos
  - b) La acción de proteínas que minimizan la actividad prooxidante al contener un metal de transición
  - c) La protección de biomoléculas en contra el daño oxidativo por medio de proteínas
  - d) Antioxidantes que son metabolitos de bajo peso molecular que actúan como estabilizadores o secuestradores de radicales libres

A través de la evolución, los gametos han ido mejorando su sistema de defensa antioxidante para disminuir los efectos tóxicos de las ERO. Los mecanismos de acción se realizan tanto en medios hidrofóbicos como hidrofílicos donde el antioxidante debe actuar como un donador de electrones, evitando una reacción en cadena de oxido-reducción comprometiendo su estructura al interactuar con una molécula oxidante; todo lo anterior es para evitar daños a blancos celulares (Córdova *et al.*, 2010).

### **9.3.- Clasificación de los antioxidantes**

La primera clasificación es la división entre antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Se ha visto que se requiere una integración funcional de ambos grupos para potencializar la protección de la célula frente el estrés oxidativo. La defensa que proporcionan los antioxidantes es la prevención de la formación de ERO, la reparación de biomoléculas dañadas por la acción de estos agentes oxidantes además de “secuestrar” y limitar la exposición a iones metálicos, evitando así la formación de radicales más tóxicos como el  $\bullet\text{OH}$  (Córdova *et al.*, 2010).

El grupo de antioxidantes enzimáticos comprende: la superóxido dismutasa (SOD), el glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa (CAT), el glutatión reductasa (GR) y la coenzima-Q (Co-Q). Éstas catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los radicales libres. Posteriormente los sustratos se regeneran a expensas de la NADPH, y se reciclan para asumir nuevamente su papel como antioxidantes. Los no-enzimáticos abarcan aquellos compuestos tanto hidrofílicos e hidrofóbicos que arrestan radicales libres, dando origen a moléculas menos nocivas y reactivas para proteger la integridad celular. Lo anterior se logra donando un electrón al radical libre para que se pueda estabilizar. Los principales antioxidantes no enzimáticos son las vitaminas A, C y E, también están incluidos algunos elementos como el glutatión reducido (GSH), el ácido alapolico, los carotenoides; los oligoelementos como la Co-Q y, los cofactores como: el ácido fólico, ácido úrico, fenoles, albúmina y el complejo B (Córdova *et al.*, 2018).

---

---

## Antioxidantes enzimáticos

- SOD

Esta enzima está distribuida en todo el organismo y cataliza de manera eficaz la dismutación del anión  $O_2^{\bullet-}$  que es generado en la mitocondria. Existen tres tipos, SOD1 o Cu/ZnSOD ubicada en el citoplasma, el núcleo y en la membrana externa de la mitocondria; la segunda es MnSOD o SOD2 ubicada en la membrana interna de la mitocondria; por último, esta SOD3 o EC-SOD localizada en la matriz extracelular. Las tres tienen la misma función catalítica sólo que la compartimentación de las diferentes SOD es debida a que  $O_2^{\bullet-}$  no cruza con facilidad las membranas, pero puede reaccionar con otras moléculas generando otras de mayor difusión (Königsberg, 2008). Hay que considerar que la síntesis de esta metaloproteína está regulada por la cantidad de sustrato sobre el que actúa (Blokhina *et al.*, 2003).

- Glutación peroxidasa (GPx)

Se le considera una selenoproteína, requiere de GSH (donador de equivalentes) para reducir el  $H_2O_2$  a agua. La capacidad reductora se basa en altas concentraciones de GSH, ya que esta molécula al contener un grupo sulfhidrilo tiene capacidad antioxidante, detoxificando para mantener el equilibrio oxidorreductorio (Königsberg., 2008). GPx es de localización mitocondrial, citosólica y lisosomal. También realiza la reducción dependiente de GSH de los hidroperóxidos de ácidos grasos. Se han determinado tres formas de GPx. La forma clásica o celular que tiene mayor afinidad por el  $H_2O_2$  que por lipoperóxidos, se encuentra casi en todas las células; la plasmática que presenta afinidad por ambos sustratos y la llamada fosfolípido hidroperóxido, que tiene afinidad exclusiva para los lipoperóxidos, protegiendo a la célula de la lipoperoxidación. GPx actúa de manera conjunta con SOD y CAT para la degradación de hidroperóxidos. Adicionalmente, GPx tiene una actividad sinérgica con la vitamina E, potenciando la capacidad antioxidante principalmente contra la lipoperoxidación de los AGP de la membrana plasmática (Cordova *et al.*, 2010).

- Catalasa (CAT)

Está catalogada como enzima tetrámera, su localización intracelular es en la mitocondria, peroxisoma y citosol. Tiene dos funciones: catalítica y peroxidativa. Junto a la SOD, es vital para mantener la homeostasis redox intracelular, eliminando el anión superóxido mediante su transformación y catalización en  $H_2O_2$  (de origen extracelular y el que se genera durante el metabolismo). La CAT,

---

---

además de disminuir los niveles de  $H_2O_2$ , interviene en los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular. Los diferentes tipos de CAT están basados en los diferentes cofactores metálicos: Zn, Cu, Fe, Mn, y Ni (Könisberg., 2008). Se tienen reportados tres tipos de CAT:

a) CAT-monofuncionales. Estas exhiben la mayor actividad de CAT con poca actividad peroxidasa, poseen 3 dominios estructurales (barril- $\beta$ , dominio de conexión y dominio  $\alpha$ -helicoidal).

b) CAT-peroxidasas. Se caracterizan estructuralmente por la presencia de 10-hélices- $\alpha$  conservadas y están ampliamente distribuidas en las bacterias y en algunos hongos.

c) Manganeso-catalasas. Estas enzimas pueden ser homohexámeros u homotetrámeros, cuyo arreglo presenta inmersos centros catalíticos de dimanganeso.

- Coenzima-Q (Co-Q)

Mejor conocida como ubiquinona, se sintetiza en todos los organismos eucariotas, además de que participa en la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa; su contenido es del 50% en la mitocondria y su estructura es parecida a la que tiene el  $\alpha$ -tocopherol. Su forma reducida, el ubiquinol tiene función antioxidante evitando lipoperoxidación y al mismo tiempo regenera la actividad de otros antioxidantes como la vitamina E (Könisberg., 2008; Córdova *et al.*, 2018).

Antioxidantes no enzimáticos

- GSH.

Es considerado un tripéptido, es uno de los tioles no proteicos más estudiados debido a su función en la bioquímica celular, y por estar presente a altas concentraciones en todas las células, se considera una molécula multifuncional. Su estabilidad y resistencia a la hidrólisis, es debida al enlace entre el glutamato y la cisteína; sin embargo, su efecto antioxidante es debido a la presencia del grupo sulfhidrilo (SH) reducido en la cisteína. El glutatión se sintetiza a partir de tres aminoácidos: glicina, glutamato y cisteína, no obstante, esta molécula no sólo se sintetiza en el citosol, sino en varios organelos celulares como el retículo endoplásmico (aunque en este predomina el GSSG) y la mitocondria (Königsberg., 2008).

---

---

El GSH mitocondrial juega un papel crítico en la modulación de vías apoptóticas y funciona como coenzima para la funcionalidad de otros antioxidantes como las glutarredoxinas y tioredoxinas. Los cambios perjudiciales en la expresión de este antioxidante comprometen la homeostasis de esta molécula, viéndose reflejado en la progresión de enfermedades como el Alzheimer (Königsberg., 2008).

La función antioxidante de la GSH es la reducción del  $H_2O_2$  a  $H_2O$  en presencia de la GPx (dependiente de Se), la GSH se transforma en GSSG. Para que la GSH recupere su capacidad antioxidante, tiene que participar la GSSG reductasa a expensas de NADPH, a esto se le conoce como ciclo redox. Aunque también el  $H_2O_2$  puede ser reducido por actividad de la catalasa, en la mitocondria eso no es posible, debido a la ausencia de la enzima propiamente dicha. Otra función importante que desempeña la GSH, es el almacenamiento de cisteína, siendo la GSH una fuente de este aminoácido, lo que se conoce como ciclo de  $\gamma$ -glutamil, donde al salir la GSH de la célula por transportadores, se transfiere un grupo de  $\gamma$ -glutamil a la cistina para formar un de  $\gamma$ -glutamil-aminoácido y una cisteinil-glicina. El  $\gamma$ -glutamil-aminoácido se transporta al interior de la célula para liberar al aminoácido y una estructura denominada 5-oxoprolina, que tiene la facultad de convertirse en glutamato utilizado para formar más cantidades de GSH (Blay., 1989).

- Vitamina E

Es uno de los compuestos conocidos con mayor actividad antioxidante. Es un lípido del grupo de los isoprenoides, de la familia de los tocoferoles. La forma activa de la vitamina E es el  $\alpha$ -tocoferol, el anillo cromado contiene un hidroxilo fenólico que es el responsable de su reducción antioxidante. Los tocoferoles, realizan la transferencia del hidrógeno fenólico a un radical peroxilo libre (que finalmente resulta en la forma de radical fenoxi), llevando a cabo reacciones intermediarias. Este tipo de reacciones lo realizan en los AGP; estos son ácidos grasos caracterizados por presencia de dobles enlaces entre sus carbonos. El contenido de AGP de la membrana mitocondrial, del retículo endoplásmico, además de la plasmática, es afin a este compuesto. Por lo que la vitamina E, además de estar a altas concentraciones en estos sitios, participa en la reducción de la formación de radicales lipídicos dando lugar a radicales tocoferilo (compuestos menos reactivos) que, mediante reacciones químicas, fácilmente pueden convertirse en su forma reducida gracias a la participación de la Vitamina C. Hay estudios que han concluido que la Vitamina E también neutraliza el oxígeno singulete, captura el  $\bullet OH$ ,  $O-\bullet$ , y neutraliza peróxidos (Córdova *et al.*, 2018).



---

- Vitamina C

Mejor conocida como ácido ascórbico, la vitamina C es uno de los antioxidantes más poderosos conocidos actualmente. Está caracterizada por tener un bajo peso molecular, participa como coenzima en varios procesos enzimáticos en un medio acuoso (Budani y Tiboni., 2020). Disminuye los niveles de  $O^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  y el ión hipoclorito. Así mismo, protege contra el daño oxidativo a moléculas de importancia biológica (ADN, aminoácidos). Se encuentra bajo la forma de ascorbato, su distribución es tanto intracelular como extracelular y la manera en la que abate el efecto de las ERO, ( $O^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$  y varios hidroperóxidos lipídicos) es por la interacción directa, donando electrones al radical libre y convirtiéndose en un radical ascórbico, considerado químicamente estable, pero al mismo tiempo regenerando la vitamina E. La forma en la que se puede regenerar la vitamina C es mediante la participación del NADH y NADPH. Aunque es considerado un antioxidante también puede participar como un prooxidante siempre y cuando existan metales de transición como el  $Fe^{+3}$  y  $Cu^{+2}$  (reacción de Fenton). El resultado de esta reacción es  $\bullet OH$  que se propaga y afecta la estructura y función de las membranas biológicas (Córdova *et al.*, 2010).

En la literatura se reporta la existencia de efectos sinérgicos de la vitamina C y E; la actividad antioxidante en conjunto se ha visto potencializada al doble, disminuyendo la lipoperoxidación y regulando la actividad de la enzima NADPH-oxidasa en las células (Könisberg., 2008).

- Vitamina A

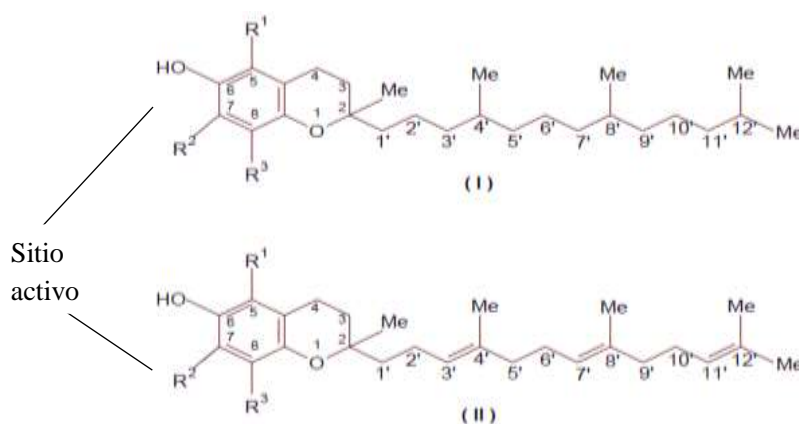
Pertenece al grupo de antioxidantes lipofílicos. Para llevar a cabo sus funciones, requiere oligoelementos como Cu, Fe, Zn, Se y Mn. Neutraliza el oxígeno singulete, captura radicales  $\bullet OH$  además de que uno de los papeles fundamentales en la actividad antioxidante es que participa eficazmente en la regeneración de la vitamina E. El mecanismo antioxidante es evitando la interacción entre los enlaces dobles conjugados de la cadena de los lípidos y los radicales (Córdova *et al.*, 2010).

---

#### 9.4.- Mecanismos de acción de los antioxidantes

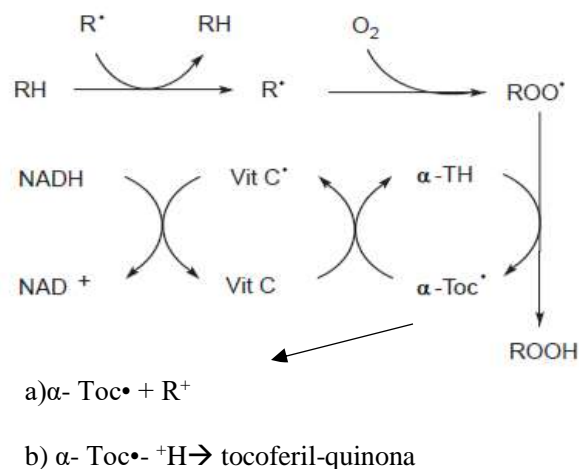
##### Vitamina E

Su mecanismo de acción está considerado como una de las barreras de la lipoperoxidación en ácidos grasos. Los tocoferoles (que es otro nombre con el que se le conoce a vitamina E) actúan interrumpiendo lo que se conoce como “reacción en cadena” (Benítez., 2006). En comparación con otras vitaminas, no reacciona acoplado a otra enzima, su mecanismo de acción está dado a través de su sitio activo “-OH” (Könisberg., 2008), que está señalado en la Figura 4.



**Figura 4. Estructuras de (I) d- $\alpha$ -tocoferol y (II) d-  $\alpha$ -tocotrienol; ubicación del sitio activo (tomado de Konisberg., 2008).**

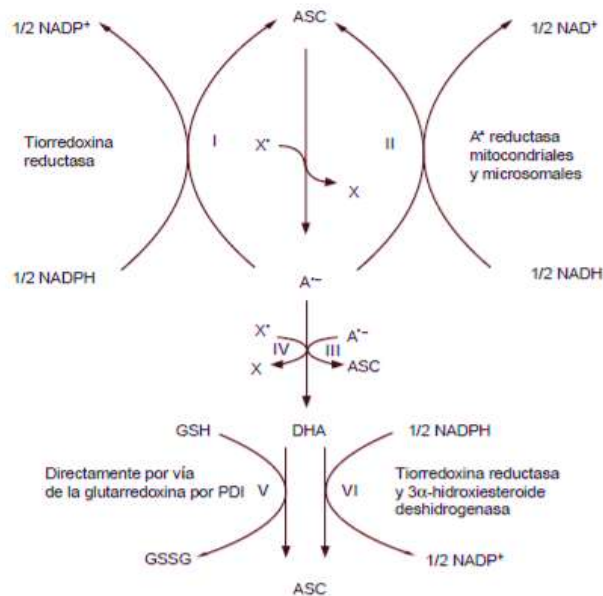
La forma en la que vitamina E inhibe la lipoperoxidación, es a través de una reacción con el radical peróxido (ROO•), resultado de la unión de un lípido radical (R•) que reacciona rápidamente con el oxígeno, formando el radical  $\alpha$ - tocoferilo•. Es aquí donde surge la deslocalización de un electrón sobre el anillo aromático donde se encuentra el sitio activo, por tanto, el electrón se vuelve insuficientemente reactivo para abstraer al hidrógeno del grupo metileno de los ácidos grasos poliinsaturados que forman parte de la membrana plasmática. Al ser el  $\alpha$ - tocoferilo• un producto de terminación, lo que lo hace menos reactivo es la deslocalización del electrón desapareado del oxígeno en su anillo aromático. En este anillo se da su regeneración, gracias a la vitamina C que dona dos electrones; esta última a su vez se regenera por la acción de la NADH, resaltando el efecto cooperativo del  $\alpha$ - tocoferol y el ácido ascórbico. El otro mecanismo que puede ocurrir es que, el  $\alpha$ - tocoferilo• puede unirse a otro radical libre o actuar nuevamente como antioxidante al ceder un segundo átomo de hidrógeno, convirtiéndose en una forma estable denominada tocoferil-quinona (Könisberg., 2008). Esto se representa en la Figura 5.



**Figura 5. Mecanismo de acción de la vitamina E y su efecto cooperativo con el ácido ascórbico (modificado de: Könisberg., 2008).**

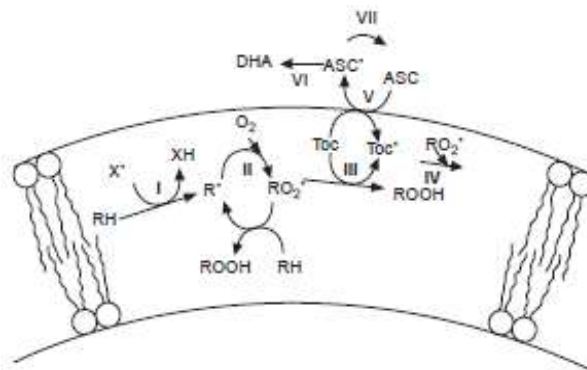
#### Vitamina C

La denominación “ascorbato” alude a la presencia de dos grupos -OH, los cuales le otorgan el carácter ácido que influye en las funciones biológicas dependientes del potencial de oxidorreducción. Al reaccionar con las ERO, el ascorbato da lugar al radical ascorbilo ( $\text{A}\cdot$ ). Un mecanismo bastante estudiado es su capacidad de poder regenerar a otros antioxidantes como el  $\beta$ -caroteno, el glutatión (GSH) y el  $\alpha$ -tocoferol, distinguidos por su bajo peso molecular. El ascorbato posee un potencial redox bajo, lo que hace que pueda ceder electrones a otras moléculas radicales de mayor potencial. Al igual que el ascorbato, el radical ascorbilo es poco reactivo debido a la resonancia de su electrón desestabilizado. Otro evento importante es la dismutación donde dicho radical se convierte en ascorbato o ácido dehidroascórbico (DHA). La regeneración del ascorbato puede ocurrir por procesos tanto enzimáticos como no enzimáticos, dependiendo del sustrato. A partir del radical ascorbilo, la reducción es por la acción de las enzimas tiorredoxina reductasa o semidehidroascorbato reductasa dependientes de NADPH; mientras que a partir del DHA, la reducción puede ocurrir de forma enzimática por la participación de las enzimas tiorredoxina reductasa o glutarredoxina, ambas dependientes de GSH. La forma no enzimática es gracias al GSH y una molécula de ácido lipóico (Figura 6). Lo anterior significa que el ascorbato se caracteriza por una menor reactividad en comparación con otras ERO, ayudando a mantener el potencial reductor celular en la célula y el equilibrio entre prooxidantes y antioxidantes (Könisberg., 2008).



**Figura 6. Esquema representativo del reciclaje intracelular del ascorbato (tomado de Konisberg., 2008).**

El ascorbato tiene otro mecanismo sinérgico con el  $\alpha$ -tocoferol que se lleva a cabo en la membrana celular, donde se genera un lípido radical ( $R\bullet$ ) como producto del ataque de un radical ( $X\bullet$ ) a una molécula lipídica, misma que reacciona con el oxígeno formando peroxilo ( $RO_2\bullet$ ), iniciando la “reacción en cadena”. Esta última es interrumpida porque el  $\alpha$ -tocoferol reacciona con el peroxilo, formando el  $\alpha$ -t• que puede reaccionar con otro radical peroxilo para dar lugar a un aducto terminal (TocOOR). Seguido de ello se regenera por la acción del ascorbato, para formar un radical ascorbilo ( $A\bullet$ ) el cual se convierte en DHA y, por último, en ascorbato (Konisberg., 2008). Este mecanismo está señalado en la Figura 7.



**Figura 7. Regeneración del  $\alpha$ -tocoferol a partir del radical  $\alpha$ -Tocoferil• (tomado de Konisberg., 2008).**

---

---

## Vitamina A

Para proteger la integridad celular del estrés oxidativo, los carotenoides tienen un mecanismo para suprimir el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) mediante la absorción de energía, transformando esta molécula en su estado fundamental ( $^3\text{O}_2$ ), caracterizado porque en su configuración electrónica hay dos electrones desapareados. Cuando el carotenoide absorbe energía, ésta se disipa en forma de calor, lo que hace que la célula retorne a su estado basal. La capacidad de suprimir a las ERO (como el  $^1\text{O}_2$ ) está relacionada con el número de anillos presentes en los carotenoides, denominados sistema de anillos dobles conjugados, que es el que le confiere la actividad antioxidante; además de que influye en el modo en que son incorporados a las membranas biológicas y se puede realizar de tres formas (Könsberg., 2008):

- a) La transferencia de un electrón. Aquí se forman como producto los carotenoides radicales ( $\text{CAR}\cdot$ ) en forma de catión, anión o radical alquilo. La reacción es:  $\text{ROO}\cdot + \text{CAR} \rightarrow \text{ROO}^- + \text{CAR}^+$
- b) La remoción de iones de hidrógeno. La reacción es:  $\text{ROO}\cdot + \text{CAR} \rightarrow \text{ROOH} + \text{CAR}\cdot$
- c) La adición de especies radicales: se da la interacción especialmente entre los peroxilos y cualquier punto del carotenoide, formando un aducto terminal estabilizado por resonancia ( $\text{ROO-CAR}\cdot$ ) y, por lo tanto, sea menos reactivo. La reacción es:  $\text{ROO}\cdot + \text{CAR} \rightarrow \text{ROO-CAR}\cdot$

La vitamina A tiene una actividad sinérgica junto con otras vitaminas (C y E) para ayudar en su regeneración que ocurre mediante la conversión del caroteno en un radical  $\text{CAR}\cdot$  al transformar un radical  $\text{TOH}\cdot$ ,  $\text{CAR}\cdot$  es eliminado por la acción de  $\text{ASCH}_2$  donde este último se transforma en radical  $\text{ASC}\cdot$ . La transformación de  $\text{ASC}\cdot$  es mediante los procesos tanto enzimáticos como no enzimáticos ya descritos. La sinergia de los antioxidantes es considerada como un “sistema”, ya que el exceso o falta de las concentraciones adecuadas promueve la acción prooxidante aumentando los niveles específicamente de carotenos que reaccionan con radicales  $\text{CAR}\cdot$  (Könisberg., 2008).

- Polifenoles

Los polifenoles, proporcionan protección al ADN dado su mecanismo quelante de metales pesados como el Cu y el Fe. Las estructuras de los muchos tipos de polifenoles son determinantes importantes en la potencia antioxidante, formando complejos con los iones metálicos caracterizados por ser menos reactivos debido a la resonancia (Nimse *et al.*, 2015).

---

---

## 10.-ANTECEDENTES

Los antioxidantes no solamente se han utilizado en especies animales de interés económico sino también en ratón, búfalo, perro entre otros. Como los resultados entre especies son variables, la investigación de la funcionalidad de los gametos es una tarea complicada. Algunos de los resultados obtenidos son los siguientes:

Dentro de los antioxidantes que se han empleados en los medios de cultivo, está la vitamina A (5  $\mu\text{M}$ ) utilizada en bovino (Livingston *et al.*, 2004), y en porcino (100  $\mu\text{M}$ ) (Jeong *et al.*, 2006) y la vitamina E en el ratón (Farzollahi *et al.*, 2016). Estas vitaminas adicionadas a los medios de maduración *in vitro* favorecen el desarrollo embrionario. Otros compuestos utilizados como el ácido ascórbico en bovino, mostrando resultados discordantes provocando citotoxicidad, ningún aumento en la MIV ni en el desarrollo embrionario (Córdova *et al.*, 2010), mientras que en el ratón mejoró los porcentajes en la maduración citoplásmica y nuclear de ovocitos (Tao *et al.*, 2004).

La suplementación con cisteína al medio de maduración y fertilización *in vitro* y los factores de crecimiento al cultivo *in vitro* en bovino beneficiaron el desarrollo embrionario, al igual que la combinación de insulina-transferrina-selenio añadida durante en la MIV en ovocitos porcinos que optimizó la calidad de desarrollo embrionario (Jeong *et al.*, 2006). Los microelementos que se han añadido al medio de MIV de bovinos como el  $\text{Zn}^{2+}$ , aumentaron el porcentaje de blastocistos y disminuyeron la producción de ERO (Anchordoquy *et al.*, 2010); lo mismo se observó en el porcino (Jeong *et al.*, 2006). La utilización de diferentes concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  en el medio de MIV en bovinos, no afectaron la tasa de maduración, pero aumentaron los porcentajes de embriones de 8 células, mórulas y blastocistos (Herradón *et al.*, 2007). La suplementación con sustancias antioxidantes en los medios de cultivo utilizados en la PEIV, han aumentado el porcentaje de desarrollo embrionario, aunque no de una manera considerable. En el Cuadro 2, se resumen los efectos antioxidantes de algunos compuestos utilizados.

**Cuadro 2. Antioxidantes en la PEIV de especies animales productivas**

Compuesto	Concentración	Especie	Resultados	Autor (es)
<b><math>\alpha</math>-tocoferol y L-ácido ascórbico</b>	100 $\mu$ M	Porcino	-Aumentan la calidad y porcentaje de desarrollo embrionario: <b>32.4%</b> con respecto al grupo control, <b>17.6 %</b> . -Aumenta el porcentaje de embriones respecto al control utilizando L-ácido ascórbico: <b>25.9% &gt; 15 %</b> . Aunque se recomienda utilizar como primera opción el $\alpha$ -tocoferol. -Disminuyen la apoptosis	Jeong <i>et al.</i> , 2007
<b>L-carnitina</b>	5 mg/mL	Porcino	-Reduce los niveles de las ERO en blastocistos y mejora del desarrollo potencial de ovocitos. -Aumenta el contenido del GSH. -Después de la activación partenogenética se obtuvieron <b>44.5 %</b> de blastocistos que es menor con respecto al grupo control, <b>37.4%</b> . -Disminuye el número de células apoptóticas durante el desarrollo embrionario respecto al control: <b>9.2 % &gt; 5.6 %</b> .	Wu <i>et al.</i> , 2011
<b>Quercetina</b>	1 $\mu$ g / ml	Porcino	-Incrementa las tasas de blastocistos después de la activación partenogenética respecto al control: <b>24.3 % &gt; 16.8 %</b> . -Reduce los niveles de ERO. -Concentraciones elevadas son tóxicas.	Kang <i>et al.</i> , 2013
<b>Ácido fólico</b>	100 $\mu$ M	Porcino	-Reduce las ERO y mejora la calidad de desarrollo embrionario. -Aumenta el porcentaje de desarrollo embrionario después de la activación partenogenética con respecto al control: <b>5.6 % &gt; 12.7 %</b> .	Sato <i>et al.</i> , 2013
<b>Ácido Lisofosfatídico</b>	10 $\mu$ M	Porcino	-Aumento de la tasa de blastocistos respecto al control: <b>37.5 % &gt; 26.9%</b> . -Disminución de la polispermia: <b>23% &gt; 14 %</b> . -Aumenta la cantidad de ovocitos maduros.	Zhang <i>et al.</i> , 2015
<b>Melatonina</b>	25 ng / mL	Porcino	-En el medio de MIV no incrementa el desarrollo embrionario. -En el medio de cultivo embrionario produce mayor tasa de blastocistos respecto al control: <b>10.7 % &gt; 4.02%</b> .	Do <i>et al.</i> , 2015
<b>Jalea real</b>	10 mg/mL	Caprino	-Incrementa la tasa de maduración de ovocitos y de blastocistos <i>in vitro</i> respecto al control: <b>15.5 % &gt; 33.8%</b> . -Favorece la expresión de genes apoptóticos como BAX, STAR, PTGS2 y HAS2.	Valiollahpor <i>et al.</i> , 2015.
<b>Extracto de té verde</b>	0.3 mg ml <sup>-1</sup>	Caprino	-Aumenta la tasa de ovocitos en metafase II y de blastocistos respecto al control, <b>30.90 % &gt; 15.78%</b> .	Barakat <i>et al.</i> , 2014.
<b>Ácido lipóico</b>	25 $\mu$ M	Caprino	-Incrementa la concentración de GSH en ovocitos maduros. -Disminuye la tasa de apoptosis en los blastocistos. -Favorece la expresión de genes antioxidantes en ovocitos. -Aumenta el porcentaje de blastocistos con respecto al control: <b>24 % &gt; 18.4%</b> .	Zhang <i>et al.</i> , 2013.

<b>Cobalamina</b>	200 pM	Ovino	-Mejora la calidad y la maduración de los ovocitos. -No se observan diferencias en la producción de blastocistos: <b>44.32% vs 36.7%</b> .	Zacchini <i>et al.</i> , 2017
<b>Piridoxina</b>	250 µM	Bovino	-Mejora la calidad embrionaria e incrementa el número total de células. -Aumenta el porcentaje del desarrollo embrionario: <b>32.4 % &gt; 17.6 %</b> -Inhibe la actividad de la catepsina .	Aboelenain <i>et al.</i> , 2017.
<b>Resveratrol</b>	1.0 µM	Bovino	-Incrementa los niveles de GSH. -Mejora la expansión de las células del cúmulo y la formación del primer cuerpo polar. -Aumenta la tasa de blastocistos: <b>30 % &gt; 21%</b> .	Wang <i>et al.</i> , 2014



---

---

## **11.- OBJETIVOS GENERALES**

-Analizar el efecto de los antioxidantes en el medio de MIV, así como su impacto en la fertilización y desarrollo embrionario de diferentes especies domésticas de interés económico.

-Realizar una revisión bibliográfica del estado actual de los estudios sobre el uso de los antioxidantes en la PEIV.

## **12.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La suplementación con antioxidantes en el medio de MIV mejorará la calidad, viabilidad y potencial de los embriones e incrementará el porcentaje del desarrollo embrionario?

## **13.- JUSTIFICACIÓN**

Actualmente, la demanda de especies productivas ha aumentado de manera importante, con fines de consumo de alimentos de origen animal y de investigación. En gran medida, el aumento de la producción depende de los avances científicos y tecnológicos que se alcanzan en el campo de la reproducción, cuyos logros se consideran significativos, prestando mayor atención a los programas de manejo reproductivo. Por lo tanto, se busca mejorar los protocolos de PEIV, proponiendo alternativas que cumplan con la petición tanto económica como de investigación, además de ampliar el conocimiento acerca de los eventos que suceden en la reproducción.

Las tasas reportadas de desarrollo embrionario de diferentes especies domésticas no son suficientemente altas ya que no alcanzan el 50%, atribuyendo esto a diversas causas, una de las principales: el estrés oxidativo. Para disminuir las consecuencias de esta última, se han realizado estudios con diferentes antioxidantes añadidos al medio de MIV en las especies de interés económico. Los resultados apuntan a una mejora en la calidad embrionaria y un aumento en la tasa de blastocistos, pero no ha sido lo suficientemente alto como para estandarizar algún antioxidante en los protocolos de la PEIV, haciendo necesario más estudios para la comprensión de los mecanismos celulares y bioquímicos de los gametos masculino y femenino, así como de la acción y toxicidad de los antioxidantes en los medios de cultivo.

El enfoque de esta tesis pretende resaltar la importancia de la suplementación de los antioxidantes, para potencializar los resultados de la PEIV; además de resaltar la importancia y su aplicación en investigaciones donde se destacan resultados prometedores.

---

---

## 14.- METODOLOGÍA

Este trabajo se basó en la revisión bibliográfica de la función e importancia de los antioxidantes en los medios de cultivo para la producción de embriones *in vitro* en especies domésticas. El orden de la recopilación y el análisis de la información fue el siguiente:

1. Búsqueda de los medios de cultivo para la producción de embriones, misma que se llevó a cabo mediante el uso de palabras clave en los buscadores : **Production of mammalian embryos, culture medium, preimplantation embryos, oocyte development, fertilization, embryo development.**
2. Búsqueda de información acerca de antioxidantes y estrés oxidativo en buscadores utilizando las siguientes palabras clave: **antioxidants, ROS in reproduction, oxidative stress.**
3. Búsqueda de artículos de investigación, tesis y libros mediante Google Scholar en PubMded, también se utilizaron otros buscadores como: Scielo, Redalyc, Dianelt y RefSeek. El número de artículos seleccionados fue de 50 publicados del 2016 al 2020.
4. Recopilación y análisis de la información.
5. Descripción de la revisión bibliográfica

---

---

## **15.- Estado actual de los estudios sobre el efecto de las ERO en la maduración, fertilización *in vitro* en diversas especies animales de interés económico (porcino, bovino, ovino, caprino) y en humano**

Los resultados exitosos para cada una de las especies animales de interés económico dependen de muchos factores ya mencionados en la introducción, aunque los estudios reflejan que uno de los principales factores es el estrés oxidativo, producido por un exceso de ERO. Además, la propia manipulación de los gametos y embriones en condiciones de laboratorio altera su funcionalidad, manifestándose en un mecanismo de defensa antioxidante ineficiente (Torres-Osorio *et al.*, 2018).

### **15.1.- Antioxidantes añadidos a los medios de cultivo para la PEIV**

Los antioxidantes en la reproducción animal regulan las funciones y la sobreproducción de ERO. Un sinnúmero de compuestos siguen probándose actualmente entre las diversas especies para determinar las diferencias en cuanto a concentraciones, farmacocinética, toxicidad; pero, sobre todo, efectividad. Además de que cumplen una función importante en el mantenimiento del equilibrio redox del metabolismo reproductivo. Los sistemas antioxidantes, están presentes también en el ambiente reproductivo y células germinales, su efectividad ha sido probada en modelos como el ratón, en donde los ovocitos mejoran su calidad (Lian *et al.*, 2013).

#### **15.1.1.- Antioxidantes utilizados en el ganado porcino**

El valor biomédico de la especie porcina como modelo de estudio para enfermedades y la aplicación sobre la edición de genoma, es indiscutible. Con el constante crecimiento de la población ha ido en aumento la demanda de la carne, debido a que es sumamente accesible para la población. La RA (definida como conjunto de técnicas que sustituyen los procesos naturales de fecundación) para la obtención de embriones a gran escala, en esta especie específicamente, aún no es una realidad. Los protocolos no están del todo estandarizados ya que existe una baja tasa de embriones monospermicos que no rebasa por mucho el 45% (Romar *et al.*, 2019).

En su ambiente *in vivo*, los ovocitos se encuentran protegidos contra el daño oxidativo, mientras que en *in vitro* tienden a experimentar un mayor estrés oxidativo por la carencia de sistemas antioxidantes, ya descritos. La adición de agentes antioxidantes contrarresta los efectos perjudiciales de las ERO; numerosos compuestos han sido añadidos a los medios de cultivo en el porcino, entre los cuales hay proteínas, ácidos grasos, vitaminas y oligoelementos. Tomando en cuenta que los ovocitos requieren

---

---

compuestos para inhibir los efectos de las ERO, la información que se presenta es el avance de la suplementación en los medios de cultivo con diversos antioxidantes; muchos han sido los compuestos a los que se les ha atribuido un potencial antioxidante, con base en los estudios químicos realizados. Sin embargo, aún existen diversos compuestos con características antioxidantes que se pueden agregar a los medios de desarrollo embrionario. Éstos van desde compuestos presentes en algunas algas hasta extractos de plantas, y que incluso, algunos pueden interactuar con otros antioxidantes y potencializar la protección del ovocito frente a las ERO (Torres-Osorio *et al.*, 2019) .

Un compuesto utilizado del que existen pocos reportes es la ficocianina, considerada como un antioxidante que es obtenido de las microalgas o algas verde-azules como la espirulina. Se evaluó la maduración y la competencia de desarrollo embrionario después de la activación partenogenética, aunque se observó que la concentración de 5 µg / mL no incrementó la maduración de los ovocitos, es decir, no se obtuvo mayor desarrollo de blastocistos activados partenogenéticamente. Además, aumentó la expansión de las células del cúmulo y en blastocistos clonados la proliferación celular y, por ende, la expresión de genes implicados en la pluripotencia celular (SOX2 y NANOG). Por último, se observó mayor actividad mitocondrial y disminución en la actividad de la catepsina B (implicada en la apoptosis) (Liang *et al.*,2018).

La protección de la actividad mitocondrial por parte de la ficocianina ya se había comprobado en un estudio previo, donde se concluyó que la dosis de 5 µg/mL aumentó significativamente la formación de blastocistos y la tasa de eclosión. Además, la adición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que indujo la disfunción mitocondrial fue reducida por la presencia de la ficocianina; también evito la apoptosis, el daño al ADN, la autofagia y consiguientemente mejoró la calidad del ovocito. Así se concluyó que la ficocianina tiene efectos benéficos y potencial antioxidante (Niu *et al.*,2017).

Otro compuesto presente en algas es la laminarina, polisacárido de reserva específicamente en algas pardas y algunas plantas. Se le han atribuido propiedades anticancerígenas, reduce el grado de estrés oxidativo inducido por lipoperoxidación. Si bien los antioxidantes son agregados durante la MIV, cuando la laminarina fue agregada en el medio de desarrollo de embriones a una concentración de 20 µg/mL se obtuvieron resultados positivos. Se adquirió un mayor potencial mitocondrial, un aumento en la síntesis de GSH y la inducción de la expresión del gen de activación del genoma (YAP-1) (Jiang *et al.*, 2018).

---

---

Se ha detectado un compuesto presente también en frutos cítricos, denominada  $\beta$ -criptoxantina, esta es una vitamina del grupo de los carotenoides. Su potencial antioxidante se ha atribuido en estudios de anticancerígenos y estudios donde se observó que suprime la lipoperoxidación. Adicionada en el medio de MIV, en concentración de 1  $\mu$ M disminuye el estrés oxidativo, incrementa el contenido GSH, mejora la extrusión del cuerpo polar y aumenta la tasa de blastocistos (Park *et al.*, 2018).

Otro antioxidante que se encuentra en los frutos cítricos es la hesperetina. Este es un flavonoide glicosado que al suplementarlo en el medio de MIV de ovocitos a 100  $\mu$ M, disminuyó los niveles de estrés oxidante y se incrementan los niveles de GSH y la expresión de enzimas antioxidantes. En el caso del desarrollo embrionario, se mejoran los porcentajes de blastocistos en comparación con el grupo control (Kim *et al.*, 2019).

Un estudio similar al de la ficocianina, fue llevado a cabo con ácido clorogénico que es un éster derivado del ácido cafeico. Este también presenta efectos antioxidantes similares a los de la ficocianina. Este al igual que los compuestos ya mencionados, está presente en muchos frutos. En la evaluación realizada, usando medio de MIV suplementado con este fitoquímico, se halló que una concentración de 50  $\mu$ M, incrementa las tasas de MIV, FIV y blastocistos. Al agregarlo en la etapa de MIV, se observó que previene el daño al ADN inducido por tratamientos con 1  $\mu$ M de  $H_2O_2$  (Nguyen *et al.*, 2017). Otros trabajos experimentales, han permitido acumular evidencia del efecto antioxidante del ácido clorogénico; en una publicación, se demostró que al añadirlo al medio de MIV, repercute en las subsecuentes etapas de la PEIV, principalmente en el desarrollo embrionario donde, después de la FIV, los ovocitos sometidos a electroporación y previamente suplementados en la maduración con 50  $\mu$ mol/L, presentan mejoría significativa en la tasa de ovocitos que se desarrollaron en blastocistos al mismo tiempo que mejora su calidad (Nguyen *et al.*, 2018). Un estudio más reciente en el que se evaluó la MIV en presencia de ácido clorogénico, determinó que los ovocitos sometidos a estrés por calor alcanzaron una mayor etapa de desarrollo en comparación con el grupo control, además de una mayor cantidad de células por blastocisto. Lo anterior, comprueba de manera incuestionable el potencial antioxidante del ácido clorogénico.

Otro de los antioxidantes, adicionado durante la MIV, es el resveratrol. Catalogado como un polifenol con propiedades antiapoptóticas y antiinflamatorias, este compuesto ya ha sido utilizado también en otras especies para la PEIV. Específicamente en el porcino, se han hecho varios estudios del impacto de este fenol, encontrándose que incrementa la cantidad de GSH, a la par que disminuye los niveles de ERO, mismos que se ven reflejados en el incremento del porcentaje de ovocitos maduros; además

---

---

de que aumenta la expresión de genes implicados en la síntesis de factores de transcripción de la mitocondria (TFAM, POLG y PGC1 $\alpha$ ) (Ito *et al.*, 2020).

Otra sustancia que previene la oxidación es la melatonina, una hormona definida como multifuncional debido a la variedad de funciones biológicas en las que se desempeña. Por sus propiedades antiapoptóticas, está comprobado que reduce los niveles de formación de ERO, provee protección al ovocito porcino del estrés por calor y de la toxicidad de compuestos como la aflatoxina B1 (Cheng *et al.*, 2019), regula la maduración y preimplantación del embrión, mejora la síntesis del GSH (Poniedzialek-Kempny *et al.*, 2020), disminuye apoptosis mitocondrial depurando el anión SO $\bullet$ - (Park *et al.*, 2018) y el metabolismo de lípidos (Jin *et al.*, 2017).

La vitamina C, fue de los primeros antioxidantes en utilizarse en los medios de cultivo para la PEIV. A pesar de sus muy conocidas propiedades y potencial antioxidante, se ha buscado evaluar otras variables con la adición de esta vitamina. Entre sus efectos ya conocidos, la vitamina C incrementa los niveles de GSH, reduce los niveles de ERO y mejora la competencia de desarrollo del ovocito después de la activación partenogenética. La suplementación del medio de cultivo para el desarrollo embrionario con este compuesto incrementa significativamente el desarrollo embrionario (Poniedzialek-Kempny *et al.*, 2020). Se ha visto que interviene en la regulación del estado epigenético de la cromatina, debido a su función catalítica, actuando sobre los iones ferrosos que intervienen en los procesos de hidroxilación y desmetilación. Éstos realizan múltiples funciones celulares, entre las cuales están: el metabolismo de lípidos, la expresión de genes como la BMP15 (proteína morfogénica del hueso, que en el ovocito participa en la proliferación de las células del cúmulo), entre otros (Yu *et al.*, 2018). Los efectos anteriores se observaron cuando se dieron tratamientos de 250  $\mu$ M (Yu *et al.*, 2018).

De los elementos más recientemente estudiados, están los que figuran en el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Antioxidantes utilizados en la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos.**

Compuesto	Concentración	Características	Resultados	Autor (es)
<b>Mogrosida V</b>	20 $\mu$ M	-Extracto de una planta de origen chino, glucósido derivado del curcubitano.	-Reduce de los niveles de las ERO. -Mejora el potencial de membrana mitocondrial. -Aumenta el porcentaje de blastocistos ( <b>29 % &gt; 42%</b> ).	Nie <i>et al.</i> , 2020
<b>Baicalina</b>	0.1 $\mu$ g/ mL <sup>-1</sup>	-Flavonoide y antioxidante que es extraído de una planta de origen oriental.	-Aumenta la tasa de maduración y de expresión de genes relacionados con la expansión de las células del cúmulo, contenido de ATP y del potencial de membrana mitocondrial. -Incrementa el porcentaje de desarrollo embrionario ( <b>49.5 % &gt; 27.2 %</b> ).	Guo <i>et al.</i> , 2019.
<b>Timosina</b>	1 mg/1 mL	Péptido formado por 28 aminoácidos, se desconocen muchas de sus funciones reproductivas, pero se le atribuye su papel en la esteroidogénesis en las células de la granulosa.	-Mejora el desarrollo embrionario ( <b>12.2 % &gt; 6.25%</b> ). La transferencia de los embriones en etapa de blastocisto fue exitosa; los lechones nacieron vivos (16 lechones).	Poniedzialek-Kempny <i>et al.</i> , 2020
<b>Ácidos grasos poliinsaturados</b>	50.0 $\mu$ M	Forman parte de la familia de omega-3 y de los fosfolípidos de la membrana, participan en las vías de señalización celular, el metabolismo de prostaglandinas y hormonas esteroideas y la transcripción de genes implicados en el metabolismo de lípidos.	-Aumenta las tasas de división y número de células. -Disminuyen los lípidos en ovocitos y embriones. -Disminuye el porcentaje de blastocistos: ácido eicosapentanoico ( <b>25.4 % &lt; 37.8 %</b> ), mientras que el ácido docosahexanoico ( <b>36.4 % &gt; 27.3%</b> ).	Hoyos-Marulanda <i>et al.</i> , 2019.
<b>Ácido asiático</b>	10 $\mu$ M	Triterpeno en extracto de la hierba <i>Centella asiática</i> .	-Mejora el potencial del desarrollo embrionario -Disminuye la cantidad de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> inducido -Aumenta el contenido de GSH y atenua la disfunción mitocondrial -En el cultivo de desarrollo embrionario aumenta el porcentaje de blastocistos ( <b>31 % &gt; 20 %</b> ).	Qi <i>et al.</i> , 2020.
<b>Leonurina</b>	40 $\mu$ M	Pseudoalcaloide con propiedades antiinflamatorias que protege la función antiapoptótica mitocondrial. Extraído de la agripalma china.	-Disminuye las ERO. -Incrementa los niveles de GSH. -Promueve la expresión de genes relacionados con la pluripotencia (NANG) y regulación de la autofagia en blastocistos.	Luo <i>et al.</i> , 2020.

			-Aumenta el porcentaje de blastocistos partenogénéticos (70 % > 43%).	
<b>Ácido hialurónico</b>	1 mg / mL	Glucosaminoglucano, presente en fluidos y tejidos de mamíferos, producido por las membranas plasmáticas de las células. Participa en el proceso de capacitación espermática y en la expansión de las células del cúmulo.	-Promueve la viabilidad de los ovocitos. -Adicionado en el medio para el desarrollo embrionario, mejora del potencial embrionario. -Disminuye el nivel de ERO. -Aumenta el porcentaje de embriones partenogénéticos (53.1 % > 77.3 %).	Sato <i>et al.</i> , 1990  Romek <i>et al.</i> , 2017.
<b>Cianidina</b>	100 µM	Antioxidante de la planta de Sauco. Participa en la prevención de la oxidación de lípidos y proteínas. Por deficiencia de electrones puede reaccionar fácilmente con ERO.	-La adición en el medio de MIV, mejora el desarrollo embrionario (44 % > 21 %). -Disminuye las ERO y la incidencia de la polispermia. -Aumenta la actividad de la CAT y contenido de GSH .	Hicks <i>et al.</i> , 2020.
<b>Icariina</b>	5 µM.	Flavonoide, extraído de una planta medicinal de origen oriental del género <i>Epimedium</i> , Posee propiedades antioxidantes e inflamatorias. Actúa como un fitoestrógeno que activa los receptores estrogénicos.	-Promueve la expresión de genes antiapoptóticos. -Aumenta el porcentaje de blastocistos (22.9 % > 37.8 %). -Disminuye los niveles de ERO.	Yoon <i>et al.</i> , 2020.
<b>Imperatorina</b>	40 µM	Derivado de furanocumarina y extraído de plantas orientales como <i>Angelica dahurica</i> , posee actividad antiinflamatoria y antimicrobiana.	-Durante el cultivo de embriones <i>in vitro</i> , reduce la apoptosis y autofagia. -Aumenta el porcentaje de desarrollo embrionario (49.40 % > 38.5 %). -Mejora la actividad mitocondrial en embriones de 4 células.	Luo <i>et al.</i> , 2020.



---

---

En la Cuadro 3, muchos de los compuestos fueron añadidos en el medio de MIV. Esto debido a que se ha relacionado la competencia del ovocito con el desarrollo embrionario. Durante la maduración del ovocito se dan dos eventos importantes: la maduración citoplásmica y la maduración nuclear, eventos están relacionados con la calidad del embrión subsecuente. El término “competencia del ovocito” abarca varios aspectos, la mayoría están enfocados en alcanzar dicha etapa embrionaria, es decir, la capacidad para reanudar la meiosis, la división celular después de la fertilización hasta desarrollarse a la etapa de blastocisto, inducir un embarazo óptimo y que llegue a término. Tanto en la maduración citoplásmica como en la nuclear, ocurren eventos importantes que apoyan el desarrollo embrionario posterior, por ejemplo: la modificación de la maquinaria de transcripción de moléculas importantes para promover las cascadas de señalización para la activación del genoma embrionario (Sirad *et al.*, 2006).

#### **15.1.2.- Antioxidantes utilizados en el ganado bovino**

La MIV de ovocitos de bovino, también es considerada una etapa crucial que apoya el desarrollo embrionario, a diferencia de los ovocitos madurados *in vivo*, los ovocitos madurados *in vitro*, tienen menor competencia de desarrollo. Al ser una especie poliéstrica continua, se busca obtener embriones de calidad para distintos fines: clonación, investigación médica, alimento (leche y carne) y producción de lana, entre otros. Particularmente las vacas lecheras han perdido fertilidad, esto debido a cambios metabólicos para satisfacer la demanda de la producción lechera. Las pérdidas embrionarias son altas lo que se le atribuye a la disminución de la competencia del ovocito (Lonergan *et al.*, 2016).

En los bovinos se han utilizado antioxidantes que van desde vitaminas y oligoelementos como la L-carnitina, el ácido lipóico y la L-cisteína, que confieren beneficios como la disminución de ERO. Por las múltiples propiedades de los antioxidantes, se han combinado para observar si se potencializa su efecto. Tal es el caso de la combinación de  $\alpha$ -ácido lipóico, acetyl-L-carnitina, N-acetyl-L-cisteína, en donde las concentraciones respectivas de 10  $\mu$ M, 5M  $\mu$  y 10  $\mu$ M, reducen el estrés oxidante y por lo tanto incrementan los niveles de GSH. También se han añadido otros compuestos conocidos como las vitaminas C, E y A, y el resveratrol (tanto en la MIV con desarrollo embrionario) (Hassan *et al.*, 2020). En los últimos 4 años, los estudios sobre el efecto de los antioxidantes en la MIV de ovocitos están enfocados principalmente al uso de extractos herbales, a los cuales se les concede la propiedad antioxidante, que como ya se ha visto en otras especies, estos compuestos tienen efecto, principalmente en la disminución de ERO que afecta a los gametos y, por ende, al desarrollo embrionario. En la Cuadro 4 se muestran los antioxidantes utilizados recientemente.

**Cuadro 4. Compuestos antioxidantes utilizados en la PEIV de embriones bovinos.**

Compuesto	Concentración	Características	Resultados	Autor (es)
<b>Ácido eicosapentaenoico</b>	100 nM	Ácido graso poliinsaturado no esencial de la serie omega 3 ( $\omega$ -3). Precursor de algunos eicosanoides: la prostaglandina-3 (un agregador plaquetario), el tromboxano-3 y el leucotrieno-5.	-Reduce la acumulación de lípidos -A concentraciones altas altera la producción de SOD y GSH. -En combinación con cisteína mejora el desarrollo embrionario de 8 a 16 células. -Aumenta el porcentaje de blastocistos ( <b>15 % &gt; 6.3 %</b> ).	Nikoloff <i>et al.</i> , 2020
<b>Quercetina</b> <b>Cisteamina</b> <b>Carnitina</b> <b>Vitamina C</b> <b>Resveratrol</b>	2 $\mu$ M 100 $\mu$ M 0.5 mg / mL 50 $\mu$ g / mL 2 $\mu$ M	Quercetina: flavonol, potente antioxidante y buen quelante de metales. Cisteamina: derivada de la mercaptamina, que actúa sobre el metabolismo de la cistina impidiendo su acumulación. Vitamina C: antioxidante que previene la formación de radicales libres. Resveratrol: estilbenoide, un tipo de fenol natural y una fitoalexina que se produce en varias plantas.	-Todos los grupos con antioxidantes tuvieron mayor tasa de blastocistos en comparación con el grupo control, la más alta fue con carnitina y resveratrol ( <b>54.2 % &gt; 47.2 %</b> ). -La cantidad de células en los blastocistos con el tratamiento fue mayor que el grupo control y el de la quercetina. -Disminuye la cantidad de ERO e incrementa la cantidad de GSH.	Sovernigo <i>et al.</i> , 2017.
<b>Aceite de Syzygium aromaticum</b>	20 $\mu$ g/mL	Posee propiedades antibacteriales, anestésicas, afrodisíacas, analgésicas, antiespasmódicas y estimulantes. Su compuesto clave es el eugenol, que previene la coagulación de la sangre.	-Promueve el desarrollo embrionario partenogenético ( <b>37.2 % &gt; 22.7 %</b> ) y disminuye el potencial de membrana mitocondrial. -Aumenta la viabilidad de las células del cúmulo.	De Oliveira Santos <i>et al.</i> , 2019.
<b>Plasma rico en plaquetas</b>	5 y 10 %	Fracción de plasma obtenido de sangre autóloga que tiene una concentración de plaquetas superior a la del plasma en condiciones basales. El PRP contiene factores de crecimiento que son secretados activamente por las plaquetas.	-No se recomienda agregar plasma rico en plaquetas, ya que tiene un efecto inhibitor, debido a que el plasma contiene una elevada concentración de factores de crecimiento que pueden afectar los porcentajes de la tasa de blastocistos ( <b>50 % &lt; 86 %</b> ). -Baja expansión de las células del cúmulo.	Ramos <i>et al.</i> , 2020.

<b>Lupeol</b>	2.0 $\mu$ M	Triterpenoide con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Se encuentra en una variedad de plantas, como el mango, <i>Acacia visco</i> o <i>Abronia villosa</i> .	-Protege contra el estrés oxidante y aumenta los porcentajes de la tasa de blastocistos ( <b>41 % &gt; 27.4 %</b> ). -Participa en la señalización del NF- $\kappa$ B (este factor interviene en la proliferación celular).	Khan <i>et al.</i> , 2018.
<b>Anetol</b>	300 $\mu$ g/ml	Es un compuesto aromático al que se debe el sabor distintivo del anís, el hinojo y el anís estrellado. También se le conoce como parapropenilnilosa.	-La suplementación en el medio de desarrollo embrionario aumenta los porcentajes de blastocistos ( <b>35.7 % &gt; 25.4 %</b> ), reduce las ERO por el incremento de la síntesis de GSH.	Anjos <i>et al.</i> , 2019.
<b>Licopeno</b>	0.2 $\mu$ M	Pigmento carotenoide responsable del color rojo de los tomates, la sandía, el durazno o el pomelo rosado. Posee efectos antioxidantes, antiinflamatorios y quimioterapéuticos sobre las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y algunos tipos de cáncer.	-Aumenta el porcentaje de blastocistos ( <b>34.7 % &gt; 25.4 %</b> ). -Aumenta la expresión del gen antiapoptótico BCL2 y regula la expresión de genes NF $\kappa$ B, COX2, iNOS, caspasa-3 / BAX. -Disminuye los niveles de ERO.	Chowdhry <i>et al.</i> , 2017.
<b>Melatonina</b>	10 <sup>-9</sup> M	Participa en la sincronización de los ritmos circadianos, se sintetiza en muchos tejidos diferentes donde se ha descubierto que tiene una función antioxidante neutralizando los radicales libres que se producen en la mitocondria celular.	-Disminuye la apoptosis temprana y los niveles de ERO en la MIV. -Mayor expresión de genes contra el estrés oxidativo (GTPS1, POLG y ATP5F1E). -Aumenta la cantidad de ATP gracias a una mejor expresión de la ATP sintasa mitocondrial. -Aumenta los porcentajes de blastocistos ( <b>45 % &gt; 31%</b> ).	An <i>et al.</i> , 2019.

---

---

Los compuestos mencionados en el Cuadro 4, son en su mayoría de origen vegetal y se han añadido en la PEIV, enfatizando que hace falta adentrarse en el estudio de elementos que faciliten obtener embriones de calidad superior, incluso a los que se dan de forma natural. Las investigaciones en bovinos deben ser más focalizadas y minuciosas, ya que los bovinos son una especie monotoca (en general tienen nacimientos de una sola cría por gestación). Tomando en cuenta que los embriones de esta especie tienen importancia económica y biomédica, los medios de cultivo para la PEIV deben ser objeto de exploración para añadir concentraciones de compuestos con actividad antioxidante que eleven los porcentajes de embriones en etapas transferibles y lograr nacimientos de crías sanas, con gran potencial genético en cuanto a la producción de leche y carne, libres de anomalías o enfermedades (García-Díaz *et al.*,2013).

### **15.1.3.- Antioxidantes utilizados en el ganado caprino**

En la industria de la PEIV de caprinos, los medios de cultivo para MIV son de gran importancia al igual que en el porcino y bovino. Algunas especies de cabras tienen la capacidad de producir leche y sus derivados para consumo humano; la PEIV se realiza con mayor enfoque en especies europeas por la calidad de éstas para los programas de mejoramiento genético. Tomando en cuenta que el tiempo de productividad es de 6 a 8 años, no se aprovecha el recurso para un mayor nacimiento de crías. Siendo una limitación para la propagación del material genético y su aprovechamiento, las técnicas para la PEIV en caprinos buscan aprovechar las células reproductivas para elevar el número de crías por hembra reproductora. Así mismo, esto permitiría aprovechar las razas que presentan las mejores características heredables e incrementar rápidamente la descendencia, en comparación con la duración del tiempo los procesos naturales de reproducción (Menchaca *et al.*,2018).

La propuesta del uso de antioxidantes en la PEIV en caprinos no es privativa de esta especie. Los estudios en este tema se presentan en la tabla 5. Destacando una vez más, que son una prometedora herramienta para incrementar la eficiencia reproductiva al sembrar los eventos *in vitro* asociados con el exceso de producción de ERO.

**Cuadro 5. Compuestos con actividad antioxidante utilizados en el ganado caprino.**

Compuesto	Concentración	Características	Resultados	Autor (es)
<b>Jalea Real</b>	5 mg/mL	Producido por las abejas obreras. Compuesto por agua, azúcares, proteínas, lípidos, vitaminas B1, B2, B6, ácido fólico, antibióticos, gammaglobulina albúmina y aminoácidos (arginina, valina, lisina, metionina, prolina, serina y glicina). También contiene minerales como Fe, Ca, Na, Mn, Cu, K y Zn.	-Aumenta la concentración del GSH y la tasa de ovocitos en MII -Disminuye la expresión de genes proapoptóticos.  -Aumenta el porcentaje de blastocistos ( <b>33.1% &gt; 22.3 %</b> ).	Veshkini <i>et al.</i> , 2018.
<b>Nanopartículas de hoja de moringa</b>	100 µg / m	La moringa es un árbol con valiosos recursos nutricionales y energéticos. Destaca por sus propiedades medicinales, desde combatir la fatiga, el colesterol o procesos inflamatorios para evitar las infecciones.	Al añadir las nanopartículas en el cultivo embrionario: -Aumenta los ovocitos en MII y se relaciona con una mayor expresión de genes implicados en la división celular, síntesis de proteínas y factores de crecimiento. -Aumenta el porcentaje de blastocistos ( <b>21 % &gt; 8%</b> ).	Saadah <i>et al.</i> , 2020.
<b>Resveratrol</b>	1 µM	Entre las propiedades de esta sustancia se destaca su actividad como protector cardiovascular, anticancerígeno, antiagregante plaquetario, antiinflamatorio y antialérgico.	Al adicionarlo en el MIV: -Aumenta el porcentaje de blastocistos ( <b>20.1 % &gt; 6.8%</b> ). -Aumenta el contenido de ATP. -La activación de SIRT mejora la actividad mitocondrial. -Aumenta el nivel de GSH.	Piras <i>et al.</i> , 2019.
<b>*Melatonina *L-ácido ascórbico *Taurina</b>	-10 µg/mL -50 µg/mL  -1mM	La melatonina se produce a partir del triptófano, mediante la transformación de serotonina a melatonina. El ácido ascórbico o vitamina C es un ácido orgánico, con propiedades antioxidantes. La taurina es un aminoácido importante en varios procesos metabólicos, tiene propiedades antioxidantes.	-La melatonina y ácido ascórbico producen mayor expansión de las células del cúmulo. -Los porcentajes de ovocitos que alcanzaron MII se dan con melatonina ( <b>61.76 % &gt; 37.60 %</b> ).	Gocher., 2020.
<b>Crocetina</b>	1 µM	Es un producto natural de carotenoide, ácido dicarboxílico que se encuentra en la flor del azafrán y en <i>Gardenia jasminoides</i> (frutas). La estructura química de la crocetina forma el núcleo central de la crocina, que es el compuesto responsable del color del azafrán.	-La adición al medio de maduración de los ovocitos disminuye los niveles de ERO. -Aumenta la división embrionaria. -Incrementa ligeramente el porcentaje de obtención de blastocistos por medio de ICSI ( <b>19.5 % &gt; 12.2 %</b> ).	Menéndez-Blanco <i>et al.</i> , 2020.

---

---

Hay pocos estudios reportados en la literatura acerca del uso de antioxidantes medios de MIV en cabras, en comparación con otras especies de interés económico. Principalmente en países europeos se les da mayor importancia para obtener embriones de calidad, ya que son la base primaria de alimentación, principalmente en regiones rurales. Muchos de los compuestos antioxidantes no están probados en las cabras, por lo que se debe dar la importancia por igual a esta especie.

#### **15.1.4.- Antioxidantes utilizados en el ganado ovino**

Los ovinos son una especie de ganado importante a nivel mundial, ya que al igual que los porcinos, caprinos y bovinos, tienen un grado relevante en el consumo de su carne, leche y lana para la industria textil. Es por ello por lo que se requiere implementar mejores protocolos de PEIV, considerando que ésta es una especie estacional; aunque hay algunas razas poco estacionales que pueden reproducirse en cualquier época del año y generalmente tiene partos simples o dobles, son importantes los esfuerzos para aumentar la oferta de ganado ovino (siendo también un modelo de estudio para otras técnicas de reproducción como la clonación) y para generar nacimientos de un mayor número de crías por hembra al año. Sin embargo, el avance en el conocimiento y progreso en la PEIV en ovinos es considerada lenta a diferencia de otras especies (Zhu *et al.*, 2018).

Aunque existen varias soluciones para el mejoramiento de la PEIV en ovinos, como es el uso de compuestos que sincronizan los eventos de maduración citoplásmica y nuclear del ovocito, se han obtenido resultados muy variables (Zhu *et al.*, 2018). Por tal motivo, el uso de antioxidantes en la PEIV de ovinos, podría ser una alternativa para aumentar el porcentaje de embriones transferibles. Muchos han sido los compuestos con dicha actividad que, al añadirlos a un medio de cultivo para la PEIV, se ha visto que la mejoran considerablemente. Entre los compuestos utilizados de efecto antioxidante, se encuentra el  $\alpha$ -tocoferol. Este antioxidante al añadirlo al medio de cultivo para embriones se observó que aumenta la tasa de división, la formación de mórulas y de blastocistos, al añadirlo al medio de MIV. Otro compuesto de efectos en la PEIV es el extracto de *Papaver rhoeas* (Flor silvestre), que a una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  en el medio de MIV, incrementó la tasa de ovocitos que alcanzaron MII, por la presencia de polifenoles, antocianinas y flavonoides en dicha planta (Rajabi-Toustani *et al.*, 2013).

La L-carnitina, al añadirla a 10 mM en el medio de cultivo, aumenta la GSH, disminuye las ERO y mejora el potencial del desarrollo embrionario (Mishra *et al.*, 2016). Entre los compuestos novedosos con excelentes resultados, está la jalea real, con propiedades y acciones farmacéuticas, antioxidantes,

---

---

apoptóticas y nutritivas. Al estar compuesta por vitaminas, proteínas, ácidos grasos y carbohidratos, propició que a 10 mg/mL en el medio de MIV, aumentara la tasa de ovocitos madurados, disminuyera la expresión de genes involucrados en la apoptosis e incrementara el desarrollo embrionario (Valiollahpoor *et al.*, 2016). Los compuestos antioxidantes que se encuentran en la naturaleza, específicamente de extractos botánicos como los extractos de la semilla de fenogreco, tienen propiedades antioxidantes y anticancerígenas. Al ser añadido al medio de MIV (10 µg mL) incrementa la tasa de maduración nuclear y aumenta el porcentaje de blastocistos (Barakat *et al.*, 2014).

Los antioxidantes poseen múltiples propiedades que, al utilizarlos en la investigación de la biomedicina, favorecen los procesos celulares. La PEIV de ovinos se ha visto beneficiada por la capacidad de los antioxidantes que podrían en un futuro, ser estandarizados en los medios de cultivo. Por ello es relevante enfocar los estudios a favor de la búsqueda de las concentraciones óptimas de acuerdo con la especie, fisiología metabólica, requerimientos energéticos, disminución de ERO y la mayor expresión de enzimas antioxidantes intracelulares. En los últimos años, en los ovinos, la utilización de diversos compuestos ha ido en aumento y aunque se le ha dado una importancia menor en comparación con otras especies; la búsqueda de cuáles antioxidantes podría mejorar el potencial del desarrollo embrionario sigue vigente. En el Cuadro 6, se muestran, las sustancias más recientemente utilizadas.

**Cuadro 6. Compuestos con acción antioxidante en el ganado ovino.**

Compuesto	Concentración	Características	Resultados	Autor (es)
<b>Polen de abeja</b>	1 µg	Contiene alto valor nutricional en contenido de proteínas, vitaminas, minerales y carbohidratos. Contiene vitamina C. Propiedades: antioxidante, antiinflamatorio y anticancerígeno.	-Aumenta las concentraciones de GSH, expresión de genes implicados en el crecimiento y diferenciación celular (GDF-9 y CMOS). -Aumenta los ovocitos en MII ( <b>45.5 % &gt; 3 %</b> ). -Disminuye la expresión del gen proapoptótico BAX.	Barakat <i>et al.</i> , 2020.
<b>Extracto de miel de abeja de la <i>Nigella sativa</i></b>	5%	Posee más de 100 componentes, entre los cuales contiene vitaminas, minerales, ácidos grasos, hierro y fosfato.	-Aumenta los niveles de GSH. -Mayor número de ovocitos en MII ( <b>40 % &gt; 3 %</b> ) y la expresión de genes GDF-9, MPF, C-MOS y IGF-1.	Kaabi <i>et al.</i> , 2020.
<b>*Melatonina</b> <b>*Sericina</b> <b>*Combinación de M y S</b> <b>*FLI</b> <b>*ITS</b> <b>*ITS + FLI</b> <b>* FGF2</b> <b>* IGF1</b>	*10 <sup>-7</sup> M *0,5% *10 <sup>-7</sup> M y 0,5%  *20 ng / mL LIF *1.0 mg / mL de insulina, 0.55 mg / mL de transferrina y 0.5 µg / mL de selenio *40 ng / mL FGF2 * 20 ng / mL IGF1	(Se) Proteína que participa en la producción de seda. (FIL) Citocina que participa en diferenciación, crecimiento y proliferación celular. (IGF1) Péptidos que participan en la proliferación celular y estimulan el crecimiento. (FGF2) Factor proteico que aumenta la actividad mitótica y la síntesis de ADN.	-La suplementación con sericina y / o FLI podría mejorar la competencia de desarrollo de los ovocitos, aumentando el rendimiento de blastocisto en comparación con el del medio IVM convencional. -El porcentaje de desarrollo embrionario es mayor con melatonina ( <b>46.5 % &gt; 19.4 %</b> ).	Tian <i>et al.</i> , 2021.
<b>Resveratrol</b>	*0.5 µM durante el cultivo de MIV y cultivo del desarrollo embrionario		-Aumenta el número total de células de los blastocistos ( <b>54.53 % &gt; 29.91 %</b> ).	Zabihi <i>et al.</i> , 2019.
<b>Interleucina-7</b>	* 1 ng / ml durante la MIV	Citocina producida por las células del estroma de la médula ósea y de los fibroblastos. Suprime la apoptosis de las células de la granulosa.	-Aumenta las tasas de maduración ( <b>78 % &gt; 60.2 %</b> ).	Javvaji <i>et al.</i> , 2019.
<b>Coenzima Q10</b>	*30 µM	Forma parte de la cadena respiratoria y transporta los electrones entre el NADH y Succinato Des. También se le ha atribuido la capacidad antioxidante debido a la presencia de ubiquinona.	-Aumenta la tasa de blastocistos ( <b>39 % &gt; 28 %</b> ). -Mejora la distribución mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial. -Disminución de la expresión de genes proapoptóticos.	Heydarneja <i>d et al.</i> , 2019.



### 15.1.5.- Antioxidantes utilizados en el ganado equino

Muchas han sido las modificaciones efectuadas a los medios a la PEIV para obtener altas tasas de MIV de ovocitos equinos. Las propuestas para poder llevarlo a cabo están en dirección hacia el uso de inhibidores de la maduración, específicamente de las fosfodiesterasas que participan en el reinicio de la meiosis. En este último suceso, las ERO participan en las vías de señalización y para nivelar los posibles daños causados por su producción excesiva, la acción de las enzimas antioxidantes presentes en el fluido folicular como el ácido ascórbico, elimina los radicales libres. La eficiencia de la MIV, FIV y DE está muy atrás en cuanto a avances de optimización de medios de cultivo, a diferencia de otras especies. El uso de algunos compuestos antioxidantes ha sido lento, debido a factores como: bajo número de ovocitos obtenidos, medios de capacitación parcialmente eficientes y tasas de maduración variables (Metcalf *et al.*, 2020).

En el Cuadro 7 se muestran los antioxidantes utilizados en la PEIV del ganado equino.

**Cuadro 7. Antioxidantes utilizados en la PEIV del ganado equino**

Compuesto	Concentración	Características	Resultados	Autor(es)
Sal de ascorbato de sodio	50 mg mL <sup>-1</sup>	Compuesto antioxidante protección contra radicales libres derivado del ascorbato.	-Mayor tasa de división de embriones ( <b>44 % &gt; 36 %</b> ).	Metcalf <i>et al.</i> , 2020.
B-mercaptoetanol	0.1 mM y 0.7 mM	Compuesto creado a partir del etilenglicol que reduce los puentes disulfuro.	-No se obtuvieron mayores tasas de maduración respecto al grupo control ( <b>55.1 % ≈ 51.9 %</b> ).	Merlo <i>et al.</i> , 2016.
Cisteamina	100 μ M	Compuesto orgánico que disminuye la acumulación de cistina	- Aumenta los ovocitos en MII ( <b>55 % &gt; 47 %</b> ) -El número de embriones recolectados fue de 10 ( <b>17%</b> ) en el grupo de control y cinco en el grupo de cisteaminas ( <b>9%</b> ).	Deleuze <i>et al.</i> , 2010
Zinc	1.5 μg/ mL	Metal que participa en la síntesis de ADN y mantenimiento de la membrana celular.	-Las tasas de maduración no son significativamente diferentes entre los tratamientos ( <b>63 % ≈ 70%</b> ). -No hay diferencias en las tasas de escisión ( <b>81 % &lt; 92%</b> ) o tasas de blastocistos ( <b>20 % &lt; 31%</b> ).	Choi <i>et al.</i> , 2016.

---

---

### 15.1.6.- Antioxidantes utilizados en humanos

Los antioxidantes utilizados en la FIV para humanos han sido especialmente estudiados para ayudar a solucionar los problemas de la baja calidad de los gametos y evitar la fragmentación de los embriones. Está confirmado que los factores exógenos como la alimentación, el estrés diario, el consumo excesivo de alcohol, fumar, el sobrepeso y diversas enfermedades afectan los procesos reproductivos, alterándolos, dando lugar a la generación excesiva de ERO y, por ende, la esterilidad (Budani y Tiboni., 2020).

Los estudios encaminados a resolver los problemas de fertilidad en el humano apuntan al uso de compuestos con acción antioxidante, como en otras especies, ya que en el tracto reproductor está confirmada la presencia de sistemas antioxidantes que proporcionan protección para que las etapas de la fertilización *in vivo* se lleven a término. Sin embargo, por los factores ya mencionados, el sistema antioxidante resulta ineficiente e incluso las enzimas que participan en los procesos de eliminación de ERO pueden expresarse inadecuadamente. También la edad está asociada como un factor sobre el buen funcionamiento del sistema antioxidante (Prasad *et al.*, 2016).

Anteriormente se han utilizado antioxidantes para mejorar la calidad de los ovocitos durante el cultivo *in vitro*. Aunque aún faltan estudios para mejorar la calidad de los gametos. Se han obtenido resultados favorables en los últimos años. En el Cuadro 8 se resumen los resultados obtenidos utilizando antioxidantes propios de la célula como los añadidos a los cultivos para la PEIV para especies de interés económico. En realidad, no hay muchos estudios sobre la utilización de antioxidantes en los medios de cultivo, sino que están más enfocados en suplementación oral y el daño a los gametos por enfermedades como el Síndrome de ovario poliquístico o diabetes, esto se evidencia en la Figura 10.

**Cuadro 8. Antioxidantes / compuestos de suplementación oral en mujeres.**

Componente	Dosis	Especificaciones	Resultados	Autor (es)
<b>Resveratrol</b>	Oral (200 mg /día)	-La dosis se aplicó durante los ciclos de transferencia de embriones por FIV.	-Aumenta el porcentaje de embriones ( <b>52.0 % &gt; 28.6 %</b> ). -Aborto espontáneo	Ochiai <i>et al.</i> ,2019.
<b>Coenzima- Q10</b>	Oral (200mg/día)	-La administración oral fue dos veces por día	-La calidad del líquido folicular es mayor en mujeres con suplementación ( <b>0.22 % &gt; 0.08 %</b> ).	Giannubilo <i>et al.</i> , 2018.
<b>Vitamina C</b>	Oral (1000 mg/día)	-La ingestión de vitamina C fue dos meses antes del tratamiento de FIV y hasta 2 semanas después de la transferencia embrionaria.	-No hay diferencias en las tasas de fertilización ( <b>78.0 % &gt; 77.7 %</b> ). -La tasa de embriones es más alta ( <b>66.8 % &gt; 58.3 %</b> ).	Lu <i>et al.</i> , 2018. (b)
<b>*Vitamina E</b> <b>*Vitamina D3</b>	(400mg /día) (50,000 IU) Oral	-La suplementación oral fue combinada con contraceptivos orales, se suministró hCG.	-Las tasas de implantación son más altas que en el grupo control ( <b>33 % &gt; 8 %</b> ). -Aumenta la tasa de embarazo ( <b>69 % &gt; 25.8 %</b> ).	Fatemi <i>et al.</i> ,2017
<b>*Mioinositol</b> <b>*Ácido Lipóico</b> <b>*Ácido Fólico</b>	*2 g de MI + 800 mg de ALA + 400 mg de FA *400 mg FA	-Las mujeres evaluadas presentaban sobrepeso sin SOP. -Se tomó 3 meses antes de la estimulación ovárica.	-Tasa de implantación más alta en MI+ALA+FA que FA solo ( <b>33.3 % &gt; 10.7 %</b> ). -Aumenta el porcentaje de nacimientos vivos ( <b>30 % &gt; 0 %</b> ).	Canosa <i>et al.</i> , 2020



**Figura 10. Factores exógenos que influyen sobre la calidad del ovocito.**

(tomado de Prasad *et al.*, 2016).

---

---

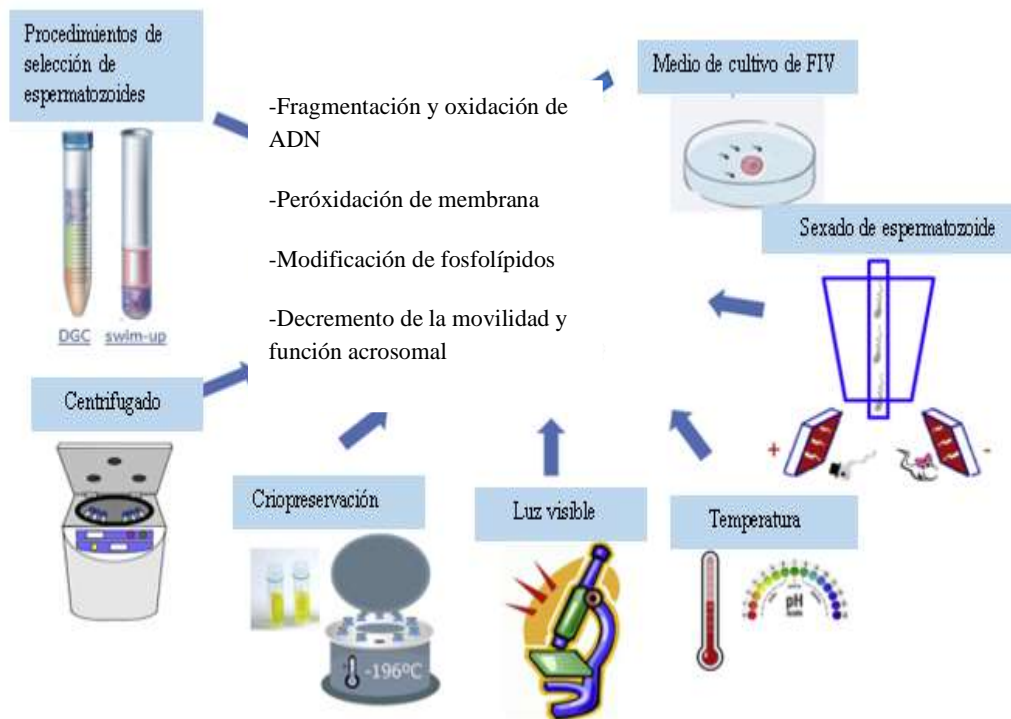
### 15.2.1.- Antioxidantes utilizados en espermatozoides

Las tecnologías reproductivas en el espermatozoide de las especies productivas ofrecen la posibilidad de mantener la calidad del gameto y aumentar la productividad ganadera. Una de estas tecnologías para la reproducción de especies domésticas aplicadas al manejo del semen es la inseminación artificial (IA), que en la actualidad sigue en mejora de sus protocolos para adaptarlos a cada especie. En los protocolos de IA, se utilizan diluyentes de semen que cumplen la función de mantener la fisiología de los espermatozoides, regular del pH, controlar la presión osmótica, inhibir el crecimiento bacteriano, mantener un nivel de fertilidad adecuado, estabilizar la membrana y el aporte de nutrientes; además de que aumenta el volumen del semen (Oliva-Trejo., 2004). El contenido y la temperatura del diluyente reducen la actividad metabólica de los espermatozoides, aumentando por más tiempo su viabilidad; esto quiere decir que, cualquier modificación realizada en cuanto a la composición del diluyente va a afectar el metabolismo de los espermatozoides, lo que implica una generación excesiva de ERO. Para atenuar su efecto, en los diluyentes se han añadido antioxidantes y se han obtenido diferentes resultados entre especies. Los antioxidantes no solamente tienen la capacidad de proveer beneficios a los ovocitos cuando son añadidos al medio de MIV, sino también en los espermatozoides. Su uso exitoso en el semen podría estar relacionado con las concentraciones adecuadas, partiendo del conocimiento de las características biofísicas de la membrana plasmática del gameto y la composición seminal. Esto proporcionaría información para propuestas de compuestos que disminuyan el daño celular y fragmentación del ADN, que es una de las principales moléculas afectadas (Membrillo *et al.*, 2003).

Otra de las tecnologías en la que se aplica la suplementación con antioxidantes en el semen de especies animales de interés económico, es la criopreservación. El fundamento de esta técnica es preservar la capacidad fertilizante del semen después de la descongelación, ya que, durante el proceso, los espermatozoides sufren cambios bioquímicos y funcionales que derivan en una disminución de la funcionalidad y exceso de ERO, característica que comparte con el uso de diluyentes en la IA. Estas afectaciones en los gametos masculinos los hace susceptibles a eventos como la lipoperoxidación que daña la membrana plasmática, cabeza y cola del espermatozoide (Córdova *et al.*, 2018).

Los espermatozoides de mamíferos son sensibles al daño por ERO, siendo la membrana plasmática uno de los componentes con mayor daño, debido a su composición de ácidos grasos poliinsaturados que, en el caso de estas células, es mayor el contenido a diferencia de otras (Tvrdá *et al.*, 2019), lo que los hace más susceptibles a peroxidación. Lo anterior tiene efectos perniciosos sobre la viabilidad, capacidad fecundante y en el desarrollo embrionario. Sin embargo, al igual que los ovocitos, poseen

un sistema de defensa antioxidante que les permite evitar el ataque y los efectos nocivos de las ERO. Sin embargo, este sistema de defensa antioxidante es bajo debido a la presencia de escaso citoplasma, haciendo al espermatozoide vulnerable al daño por radicales libres (Córdova *et al.*, 2018). Las causas por las que se pueden generar ERO, no solamente están relacionadas con la IA y la criopreservación, sino también con la manipulación *in vitro* que se realiza en otras técnicas de RA, como ICSI y FIV, donde los espermatozoides son expuestos a factores que acentúan la producción de ERO y, por tanto, de estrés oxidante (Santos *et al.*, 2019), las cuales se describen en la Figura 11.



**Figura 11.** Esquema de las causas del exceso de ERO (tomado de Baldi *et al.*, 2020).

---

---

### 15.2.2.- Antioxidantes utilizados en espermatozoides de porcino

La IA se ha convertido en una técnica importante para la PEIV de porcinos de manera intensiva, ésto depende en gran medida de la calidad del semen; por esta razón se utilizan extensores que permitan mantener la viabilidad y calidad de éste por más tiempo. Por tal motivo, la utilización de compuestos antioxidantes que mantengan la funcionalidad del semen sigue en etapa de investigación para ser adicionados en los diluyentes y/o en los procesos de criopreservación (Tvrdá *et al.*, 2020).

El papel de los compuestos antioxidantes en semen de porcinos ha sido investigado y uno de estos elementos con más investigación es el  $\alpha$ -tocoferol, ya que el daño en el espermatozoide que se da principalmente en el ADN por las ERO producidas durante la criopreservación, puede disminuirse con la adición de compuestos antioxidantes durante la refrigeración y congelación. De los elementos que se tiene reportado con resultados exitosos están las vitaminas C y E (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2018).

Para mejorar la producción porcina, se ha utilizado la suplementación exógena del semen con antioxidantes, ya que se ha visto que mejoran la movilidad, el potencial de membrana mitocondrial, la integridad del acrosoma, la viabilidad y la supervivencia del espermatozoide. Aunque hay reportes contradictorios como el que indica Marín-Guzmán *et al.*, (2000), resultando en un mínimo o nulo aporte de los antioxidantes a los espermatozoides del cerdo. De esta manera, se puede resaltar que la eficacia de los antioxidantes en el espermatozoide va a depender de la concentración, tipo de antioxidante e incluso características específicas del gameto (Peña *et al.*, 2019).

A pesar de los pocos reportes sobre antioxidantes, existen estudios que no solamente se enfocan a los procesos de criopreservación, sino también a la protección que proporcionan durante el estrés por calor tropical. Durante el verano, el porcino se expone a altas temperaturas y humedad, lo que en el espermatozoide provoca la ruptura de las cadenas de ADN por las ERO. Una disminución de los sistemas antioxidantes para proteger los espermatozoides afecta el rendimiento reproductivo por el exceso de ERO (Peña *et al.*, 2019), debido a los cambios en la temperatura y a la manipulación de los espermatozoides *in vitro*. No hay suficientes informes que afirmen los efectos beneficiosos de los antioxidantes en el semen porcino, pero sí en otras especies como el bovino y humano (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2018).

Los elementos utilizados más recientemente en los protocolos de IA y criopreservación, incluyen compuestos de origen botánico evidenciados en el Cuadro 9, en donde en cada estudio se evaluaron

diversas variables relacionadas con la calidad de los espermatozoides, así como la disminución de las ERO y la liperoxidación. Se requieren más estudios en torno al uso de antioxidantes en el espermatozoide, ya que los resultados obtenidos como una opción para abatir los efectos de las ERO, son contradictorios. Aunque está siendo una novedad el uso de antioxidantes al poseer múltiples beneficios, podrían estar actuando en las vías metabólicas, en la activación de la acción de factores de crecimiento, la síntesis de metabolitos importantes etc., promoviendo eficientemente la energía que se necesita para cumplir su papel biológico y, en el caso de los espermatozoides, apoyaría el rendimiento de su capacidad de fertilización.

**Cuadro 9. Antioxidantes añadidos a los protocolos de preservación del semen porcino.**

Compuesto	Concentración	Características	Resultados	Autor (es)
<b>Quercetina</b>	10 µM Q y de 5 a 25 µM Nar	(Q) Flavonoide tricíclico que tiene efectos inhibidores sobre algunas enzimas como la xantina-ox y ciclooxigenasa. Inhibe la oxidación de lipoproteínas de baja densidad a través de la vitamina E impidiendo que esta sea oxidada o regenerándola.	-La quercetina mantiene una alta actividad mitocondrial relacionada con la motilidad. -La naringenina reduce de lipoperoxidación. -El porcentaje de motilidad es mayor a las 72 h de almacenamiento ( <b>59 % &gt; 46 %</b> ). -Aumenta la integridad de la membrana ( <b>78 % &gt; 50.67 %</b> ).	Tvrđá <i>et al.</i> , 2020.
<b>Naringenina</b>		(Nar) Flavonoide que promueve el metabolismo de los carbohidratos. Tiene efectos antioxidantes y antiinflamatorios.		
<b>Astaxantina</b>	0.5 µM	-Carotenoide con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.  -Elimina radicales hidroxilos y protege los ácidos grasos de la peroxidación.	-No hay diferencias en las variables de calidad seminal: motilidad ( <b>40 % ≈ 42 %</b> ), viabilidad ( <b>50 % ≈ 48 %</b> ) y espermatozoides con peroxidación.	Basioura <i>et al.</i> , 2020 .
<b>Honeybush (Cyclopia ssp)</b>	12.5 µg / mL	Planta de propiedades medicinales, que posee propiedades antimutagénicas, antioxidantes y microbianas. Sus compuestos activos son flavonas e isoflavonas.	-En ninguna concentración hay efectos tóxicos. -Aumenta la motilidad espermática ( <b>88.05 % &gt; 66 %</b> ) , integridad de la membrana ( <b>68 % &lt; 73%</b> ) y el potencial mitocondrial. -Disminuye la lipoperóxidación.	Ros-Santaella <i>et al.</i> , 2020.
<b>Aceite de árbol de té</b>	-0.2 mg/L de aceite de árbol -0.08 y 0.17 mg/L de Terpinen-4-ol	Metabolito vegetal que contiene sesquiterpenos y compuestos aromáticos como terpinen-4-enol. Posee más de 100 compuestos y actúa como antioxidante, antiinflamatorio y antibacteriano.	-Concentraciones de 2 mg/L de aceite de té de árbol causan lisis de la membrana espermática; las concentraciones más altas (0.4-2 mg/L) afectan la viabilidad ( <b>9 % &lt; 90 %</b> ) y motilidad ( <b>5 % &lt; 77 %</b> ). -El terpinen a la mas alta concentración disminuye la motilidad ( <b>60 % &lt; 80 %</b> ) mientras que en la viabilidad con la concentración alta se afecta ( <b>76 % &lt; 90 %</b> ).	Elmi <i>et al.</i> ,2019.
<b>Terpinen-4-ol</b>				

<b>Orujo de uva</b>	2 y 4 % (suplementación oral)	Residuo de vinificación que contiene alto contenido de polifenoles con efectos antioxidantes, antimicrobianos y antienvjecimiento.	-Disminuye la lipoperoxidación (concentración de malondialdehído) -Aumenta la motilidad ( <b>83 % &gt; 44 %</b> ).	Gloria <i>et al.</i> , 2019.
<b>Aminoguanidina</b>	1 mM	Inhibidor selectivo del oxido nítrico síntasa, proporciona protección antioxidante por eliminación del peróxido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , HOCl, <sup>•</sup> OH y ONOO <sup>•</sup>	-Ambas concentraciones (1 y 10 mM) protegen a los espermatozoides del estrés oxidativo. -Aumenta la integridad de la membrana ( <b>78.3 % &gt; 68.3 %</b> ), motilidad ( <b>78 % &gt; 65 %</b> ) -Disminuye la lipoperoxidación.	Pintus <i>et al.</i> , 2018
<b>Taurina</b>	1.5, 7 y 12.5 mM	Aminoácido que forma parte del sistema antioxidantes de las células, neurotransmisor, formador de sales, estabilizador de las membranas biológicas	-No se registra algún efecto con la adición de diversas concentraciones de taurina en la motilidad ( <b>63 % ≈ 58 %</b> ) y en la viabilidad ( <b>81 % ≈ 79.2 %</b> ). Aunque hay antecedentes que reportan que promueve la acción de enzimas antioxidantes como la tioredoxina reductasa.	Paál <i>et al.</i> , 2018.

### 15.2.3.- Antioxidantes utilizados en espermatozoides de bovino

La membrana espermática de los espermatozoides de bovinos está caracterizada por una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados. Esto conlleva a que la membrana sea un blanco fácil para la lipoperoxidación iniciada principalmente por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Córdova *et al.*, 2018). Sin embargo, éstos poseen un sofisticado sistema de protección antioxidante que se encuentra en el plasma seminal con la finalidad de mantener un microambiente ideal. En los bovinos, se han utilizado compuestos antioxidantes tanto solos como en mezclas. Actualmente no se ha definido alguno que se pueda utilizar específicamente para esta especie, ya sea en los métodos de criopreservación, IA, entre otros. Aunque se han estudiado los efectos de los antioxidantes más conocidos y los resultados que se han reportado son positivos. Durante los últimos años, el enfoque del tipo de antioxidantes que podría poseer mayores propiedades de “scavenger” o que pueden tener un papel fundamental en la fisiología espermática, ha sido hacia compuestos orgánicos como los aceites esenciales o extractos botánicos ricos en polifenoles, lo cual está bien documentado que atenúan el impacto nocivo de las ERO (Santos *et al.*, 2019). Además de que los efectos de estas sustancias han sido evaluados en problemas de salud como parte de la herbolaria medicinal tradicional (Tvrdá *et al.*, 2019). Algunos de los antioxidantes están representados en el Cuadro 10.



**Cuadro 10. Antioxidantes en los protocolos de inseminación y criopreservación en el semen de bovino**

Compuesto	Concentración	Características	Resultados	Autor (es)
<b>Extracto de Omija</b>	5 y 50 µg / mL.	Es una planta enredadera caducifolia originaria de China que posee un sesquiterpeno $\alpha$ -Cadinol además de carotenos, flavonoides y polifenoles. Actúa como antibiótico y antioxidante	-A las 2 h aumenta la motilidad ( <b>55.54 % &gt; 20.44 %</b> ). -Concentraciones superiores inhiben la viabilidad. -Disminuye los niveles de superóxido.	Tvrda <i>et al.</i> , 2020
<b>Sygozium aromaticum</b>	15 µg/ mL	Mejor conocido como “clavo de olor”. Posee propiedades antibacterianas y antiinflamatorias. Se compone de: eugenol, acetil eugenol y $\beta$ -caryofenol.	-La incubación de espermatozoides durante 1 h con la esencia de clavo disminuye los niveles de ERO. -Aumenta la integridad de membrana ( <b>59 % &gt; 48 %</b> ), actividad mitocondrial. -No aumenta significativamente la motilidad ( <b>40.4 % &gt; 36.2 %</b> ).	Santos <i>et al.</i> , 2019.
<b>Epicatequina</b>	100 µmol/L	Flavonoide natural con propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y antioxidantes, por lo que elimina las ERO y actúa como quelante de metales.	-Aumenta la motilidad de los espermatozoides ( <b>44 % &gt; 25 %</b> ) y actividad mitocondrial. -Disminuye los niveles de ERO (aunque no de forma completamente reversible, pero se observó una disminución a las 2 h), peroxidación de lípidos y daño al ADN.	Tvrda <i>et al.</i> , 2019.
<b>Catalasa</b>	20 UI/ MI	Enzima antioxidante oxidoreductasa que cataliza la dismutación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en oxígeno y agua. Utiliza como cofactor al grupo hemo y al manganeso.	-Aumenta la motilidad de los espermatozoides ( <b>25 % &gt; 2%</b> ) y mantiene la integridad de la membrana plasmática. -Aumenta el potencial de membrana mitocondrial.	Arslan <i>et al.</i> , 2019.
<b>Extracto de Chlamydomona reinhardtii</b>	5 y 10 µg/mL	Alga que contiene un conjunto de antioxidantes como carotenoides, fenol flavonoides y astaxantina. En su composición hay proteínas, carbohidratos y minerales. Es considerado como un antiinflamatorio, antioxidante y antibiótico.	-Puede preservar el semen hasta 24 h, aumenta la viabilidad ( <b>52.03 % &gt; 41.15 %</b> ). -Disminuye la producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . -Aumenta la motilidad ( <b>66.99 % &gt; 41.15 %</b> ).	Tvrda <i>et al.</i> , 2016.

---

---

Los efectos del uso de las técnicas de RA tienen consecuencias en la viabilidad y calidad de los espermatozoides. Dada la importancia de la diseminación de dosis de eyaculado de toros que poseen una alta calidad genética para inseminar hembras y generar descendencia con características deseadas, es necesario el continuo estudio de aquellos elementos que apoyen el mejoramiento de las metodologías para la preservación del semen (Tvrdá *et al.*,2019).

#### **15.2.4.-Antioxidantes utilizados en espermatozoides de caprino**

El semen caprino, al igual que el de otras especies, tiene importancia en cuanto a la utilización de sementales con carga genética importante. La preservación de las características del semen para realizar IA y criopreservación, ha adquirido mucho interés para su traslado a granjas lejanas o centros de mejoramiento genético. El problema que persiste en el semen de los mamíferos es que la calidad disminuye conforme transcurre el tiempo; en caprinos la viabilidad de los espermatozoides permanece hasta 48 h en el diluyente. Por lo que, en esta especie, se tiende a utilizar la criopreservación como una técnica para la reproducción de esta especie, dando buenos resultados a nivel de tasas de concepción (Moradi *et al.*,2020).

El uso de antioxidantes también se ha implementado en semen de caprino y muchos de los compuestos también ha sido probados en la MIV. Con base en lo anterior, hay indicios de que pueden cumplir un papel importante en la protección de los espermatozoides contra las ERO que se producen durante estos dos métodos. Por tal motivo, se ha propuesto a los antioxidantes como una alternativa para mejorar las variables que determinan la calidad seminal. Hay que enfatizar que se deben realizar estudios profundos en cuanto a la bioquímica redox, farmacología y toxicológica, sin olvidar que los caprinos son una especie estacional y que esto repercute en la calidad seminal (Moradi *et al.*,2020). El Cuadro 11, muestra los resultados de los antioxidantes que se han utilizado en esta especie.

**Cuadro 11. Antioxidantes añadidos a protocolos de IA y criopreservación de semen caprino.**

Compuesto	Concentración	Características	Resultados	Autor (es)
<b>Zinc</b>	40 mg	Oligoelemento que participa en el metabolismo de los ácidos nucleicos, mantenimiento de las células germinales, progresión de la espermatogénesis y regulación de la motilidad.	-Aumenta el volumen del semen, así como de los niveles de GSH peroxidasa, CuZn-SOD y CAT. -Mantiene el porcentaje de motilidad ( <b>59.3 % ≈ 60.7 %</b> ). -Disminuye la concentración de malondialdehído.	Liu <i>et al.</i> , 2020. (b)
<b>Crocín</b>	1 mM	Carotenoide soluble en agua, protege a las membranas celulares contra la oxidación.	-Aumenta el porcentaje de motilidad ( <b>74 % &gt; 60 %</b> ). -Disminuye los niveles de las ERO	Longobardi <i>et al.</i> , 2020.
<b>Nano partículas de oro sintetizado verde</b>	10 ppm/mL	Metal resistente a la corrosión y oxidación. Con un diámetro de >10 nm y actividad antioxidante. Se caracterizan por : permeabilidad a la membrana, baja toxicidad, alta biodisponibilidad y actúan como catalizadores.	-Aumenta la actividad de la catalasa, la integridad de la membrana, la viabilidad ( <b>62 % &gt; 55 %</b> ) y motilidad ( <b>42 % &gt; 26.4 %</b> ). -Disminuye la apoptosis, células espermáticas necróticas y niveles de malonaldehído.	Ismail <i>et al.</i> , 2020.
<b>Resveratrol</b>	10 y 50 µM	Polifenol flavonoide que se encuentra principalmente en las uvas, provee protección antioxidante y tiene propiedades antiapoptóticas y antiinflamatorias.	-Aumenta la actividad mitocondrial, la integridad de la membrana ( <b>55 % &gt; 45 %</b> ) y la motilidad ( <b>88 % &gt; 78 %</b> ). -Aumenta la cantidad de espermatozoides viables con estrés oxidativo	Lv <i>et al.</i> , 2019
<b>L-arginina</b>	4mM	Aminoácido que se sintetiza en el ciclo de la urea; forma parte de las proteínas y esta involucrada en la síntesis de poliaminass y del ADN.	-Disminuye de la concentración de malondialdehído y el nivel de apoptosis y necrosis. -Aumenta la viabilidad ( <b>47.83 % &gt; 39.33 %</b> ) y motilidad ( <b>46.53 % &gt; 38.3 %</b> ). -Induce metabolismo de la glucosa.	Susilowati <i>et al.</i> , 2019
<b>Quercetina</b>	10 µM	-Es parte de los flavonoides. Posee varias actividades biológicas como antioxidante, antiinflamatorio y antimicrobiano	-Disminuye la concentración de malondialdehído y anomalías morfológicas. -Aumenta motilidad ( <b>61.33 % &gt; 53.41 %</b> ) además de viabilidad ( <b>63.52 % &gt; 57.36 %</b> ) e integridad de la membrana.	Seifi-Jamadi <i>et al.</i> , 2017.

### 15.2.5.- Antioxidantes utilizados en espermatozoides de ovino

El uso de las tecnologías de preservación de semen se ha enfrentado a muchos desafíos, y la especie ovina no es la excepción. Las agresiones tanto físicas como químicas a las que son sujetos los espermatozoides, provocan la disminución de su funcionalidad, dando como consecuencia problemas de infertilidad. El uso de antioxidantes, el conocimiento de su multifuncionalidad y su presencia en el plasma seminal, son puntos que considerar en su favor y que éstos sustituyan aquellos compuestos tóxicos en los protocolos de congelación e IA en los machos de esta especie. Se debe resaltar una vez más que, en los procesos de preservación de semen de mamíferos en general, se demanda el refinamiento de medios /soluciones que promueven el mantenimiento de la calidad seminal, tomando en cuenta que también existen factores externos que alteran la estructura de la membrana, movilidad, metabolismo y capacitación espermática; promoviendo un exceso de formación de ERO (Zamiri., 2020). En el Cuadro 12, se muestra algunos antioxidantes utilizados recientemente en protocolos de preservación del semen de ovino.

**Cuadro 12. Antioxidantes utilizados en el semen de ovino.**

Compuesto	Concentración	Características	Resultados	Autor (es)
Oregonina	100 µM	Compuesto fenólico que se caracteriza por la presencia de 2 anillos aromáticos unidos por una cadena de heptano. Posee propiedades antiinflamatorias y antioxidantes e inhibe la adipogénesis reduciendo la acumulación de lípidos.	-Aumenta la motilidad ( <b>27 % &gt; 23.2 %</b> ) y viabilidad ( <b>64.6 % &gt; 60.13 %</b> ). -Los defectos de la cola y gota citoplásmica, aumentan a las 24 h de almacenamiento, pero a las 48 h disminuye. -Aumenta el porcentaje de espermatozoides con mitocondrias activas.	Abadjieva <i>et al.</i> , 2020.
Extracto de semilla <i>Moringa olifeira</i> .	0.5 mg / mL	Árbol caducifolio con semillas ricas en flavonoides, carbohidratos, proteínas y vitaminas, yodo, selenio, zinc; ácido palmítico y esteárico. Se le atribuye actividad antioxidante.	-Disminuye el daño a la membrana. -Aumenta la viabilidad ( <b>51.33 % &gt; 41.44 %</b> ), además de la actividad mitocondrial. -Aumenta la <b>motilidad (45.61 &gt; 35.84 %)</b> .	Carrera <i>et al.</i> , 2020.
Nano-Selenio	1 µg / mL	Cofactor que activa la enzima Glutatión-Px. Las nanopartículas de este elemento se caracterizan por ser compuestos de baja toxicidad y por generar efectos antioxidantes.	-Aumenta los porcentajes de viabilidad ( <b>77.92 % &gt; 59.47 %</b> ) y motilidad ( <b>74.81 % &gt; 56.22 %</b> ). -Disminuye el número de los espermatozoides dañados y la concentración de malonaldehído. -Durante el tiempo de almacenamiento, aumenta la	Nateq <i>et al.</i> , 2020.

			cantidad de espermatozoides con poca estabilidad del acrosoma.	
<b>Glutación</b>	100 y 200 mM	Compuesto de tiol no proteico con la capacidad de reaccionar directamente con los radicales libres. El GSH-Px usa GSH como cofactor para reducir el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a H <sub>2</sub> O y los lipoperóxidos a alcoholes de alquilo.	-Protege a los transportadores de glucosa (GLUT). -Mejora la viabilidad de los espermatozoides ( <b>45.5 % &gt; 38.2 %</b> ), la motilidad ( <b>83.0 % &gt; 77.3 %</b> ) y actividad mitocondrial (a las 72 h).	Shi <i>et al.</i> , 2020.
<b>Melatonina</b>	0.05, 1 y 0.2 mM	Molécula multifuncional y antioxidante con propiedades lipofílicas e hidrofílicas, que participa en la regulación del ciclo sueño-vigila..	-Aumenta la motilidad de los espermatozoides ( <b>49.36 % &gt; 38.46 %</b> ), la actividad mitocondrial y la capacidad antioxidante total a los 5 días. -No se observan alteraciones en la integridad del acrosoma. -Disminuye el contenido de malonaldehído a los 5 días.	Dai <i>et al.</i> , 2019.
<b>Hinojo</b>	10 mg / mL	Planta con propiedades minerales tiene como componentes: azúcares, anetol, limoneno, y pineno.	-Mejora la motilidad ( <b>60.4 % &gt; 51.3 %</b> ), integridad de la membrana y la viabilidad de espermatozoides ( <b>56.6 % &gt; 47.0 %</b> ). -Aumenta la actividad mitocondrial.	Najafi <i>et al.</i> , 2019.

---

---

### 15.2.6.- Antioxidantes utilizados en espermatozoides de equino

La cría de equinos ha ido mejorando gracias a los avances en las técnicas que permiten y preservar la fertilidad de los espermatozoides. Entre las técnicas mas utilizadas para mantenerla está la criopreservación, pero el estrés oxidativo que se genera en los espermatozoides produce daño que tiene efecto en la motilidad, viabilidad e integridad de la membrana, lo que produce las ERO. Los espermatozoides de equino son susceptibles al daño oxidativo, por lo tanto, el uso de antioxidantes durante la manipulación *in vitro* es una alternativa (Ghallab *et al.*, 2017). Ante la ineficiencia de los protocolos de criopreservación de semen de equino, se opta por realizar la inseminación artificial. Este presenta desventajas como la disminución de la viabilidad del semen imposibilitando el traslado del material genético a grandes distancias (De Albuquerque *et al.*, 2020).

Los espermatozoides del equino no contienen suficientes enzimas antioxidantes para mantener el equilibrio de ERO. Durante el procesamiento del semen se elimina la mayoría de la protección antioxidante que está en el plasma seminal, aumentando en un 200% los niveles de las ERO después de la descongelación del semen. Con lo anterior, se destaca que el estudio e identificación de antioxidantes que sean utilizados en las técnicas *in vitro* de manipulación de espermatozoides (Contreras *et al.*, 2020).

En el Cuadro 13 se muestran los resultados de los antioxidantes utilizados, además de que se resalta la importancia de la continua investigación de estos compuestos para la PEIV de ganado equino.

**Cuadro 13. Antioxidantes utilizados en la preservación del semen de equino.**

Compuesto	Concentración	Características	Resultados	Autor (es)
<b>Coenzima Q-10</b>	25 µM	CoQ10 o ubiquinona es un antioxidante y portador de electrones en la caena respiratoria que participa en la síntesis de ATP produciendo energía. Se encuentra en las mitocondrias y es un compuesto de origen natural ampliamente distribuido en organismos animales y humanos.	-Disminuye las concentraciones de NO y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . -Aumenta los porcentajes de la motilidad ( <b>30.5 % &gt; 21.7 %</b> ) y la integridad de la membrana espermática.	De Albuquerque <i>et al.</i> , 2020.
<b>L-carnitina</b>	1 y 2 mM	Aminoácido cuaternario que cumple la función de transportar ácidos grasos para su oxidación.	-Preserva la motilidad ( <b>76.3 % &gt; 68.2 %</b> ), la integridad de la membrana acrosomal y plasmática. -Los parámetros espermáticos no se	Nery <i>et al.</i> , 2020.

			afectan, pero hubo una disminución de los niveles de las ERO	
<b>Ácido nicotínico</b>	20 mM	Es la parte funcional del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) y el fosfato de NAD, que son coenzimas en las reacciones de oxidación y reducción del metabolismo celular. Posee una potente capacidad antioxidante y de protección contra el daño oxidativo.	-Disminuye los niveles de malonaldehído. -Mejora de la calidad espermática y morfología, aumenta la viabilidad ( <b>83 % &gt; 75 %</b> ). -Mantiene durante 6 h el almacenamiento de forma exitosa.	Bahrami <i>et al.</i> , 2020.
<b>*SOD *CAT *GSH-Px</b>	15 UI/mL de cada antioxidante.	-SOD es uno de los antioxidantes más poderosos, cataliza la dismutación de superóxido en agua y r H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; CAT es una enzima que cataliza la descomposición del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en agua, oxígeno y agua. En esa reacción utiliza como cofactor al Manganeseo y al grupo hemo. GSH-px es una enzima selenio-dependiente, que cataliza la reacción de oxidación del GSH al GSSG, utilizando el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	-Inhibe parte de la vía intrínseca apoptótica (activación de la caspasa-3). -Aumenta la motilidad ( <b>51 % &gt; 35 %</b> ) y la viabilidad ( <b>75 % &gt; 63 %</b> ) a las 72 h. -Disminuye la rotura de la cadena de ADN. -La proporción de espermatozoides móviles aumenta a las 48 h.	Del prete <i>et al.</i> , 2019.

### 15.2.7.- Antioxidantes utilizados en espermatozoides de humano

De los problemas de infertilidad en humanos, el 50% se atribuye factor masculino. Desde hace años se tiene la evidencia de que la infertilidad masculina está asociada con un nivel alto de ERO y el daño considerable al ADN, lipoperoxidación y daño a las proteínas; considerados como blancos de radicales libres. Para la infertilidad en el hombre no existe una cura como tal, ni agregando algún compuesto en procesos *in vitro* para mejorar la calidad y función de los espermatozoides (Da silva., 2019).

Aunque las tecnologías de RA de punta como la ICSI han sido una buena alternativa, aún están en constante investigación. El motivo es que las tasas de nacimientos no rebasan el 30%, además de que los costos son altos. La utilización de antioxidantes ofrece, entre otras cosas, una posible solución no invasiva, económica y natural para una disminución del excedente de productos del metabolismo espermático. Otra de las ventajas que tiene el utilizar antioxidantes, es que se ha detectado su presencia en el semen, como las vitaminas C, D, carotenoides, coenzima-Q, carnitinas, ácido fólico e incluidos oligoelementos con poder antioxidante, como el zinc y el selenio. Los metaanálisis con estos compuestos administrados por vía oral en humanos determinaron la relación existente entre el aumento den la tasa de embarazo y la terapia con antioxidantes (Da silva., 2019).

En la Cuadro 14, se describe los resultados obtenidos del uso de distintos antioxidantes o formulas comerciales y su efecto en la fertilidad masculina y calidad del semen.

**Cuadro 14. Evaluación de uso de antioxidantes en la calidad del semen del hombre.**

Compuesto	Concentración	Características	Resultados	Autor (es)
Ácido $\alpha$ -lipóico	0.02 y 0.5 mM	-Regula el equilibrio celular. Es un ácido graso que se produce de forma natural en el cuerpo se ha visto determinado que tiene propiedades antioxidantes y anticancerígenas.	-Mejora la expresión de genes BCL2 , HSP70 e iNOS. -Aumenta la viabilidad ( <b>33 % &gt; 22%</b> ), motilidad ( <b>25 % &gt; 16 %</b> ) y morfología espermática. -Disminuye la fragmentación de ADN, expresión del gen NAX y ERO.	Asa <i>et al.</i> , 2020.
Péptido Bioactivo	60 $\mu$ g/ mL	Aislado de hierbas naturales con efectos antibacterianos, antitrombóticos y antivirales. Caracterizado por su bajo peso molecular, actúa como mediador del metabolismo celular mediante AMPK	-Aumenta la viabilidad ( <b>57.53 % &gt; 42.41 %</b> ) y motilidad ( <b>65.33 % &gt; 65.33 %</b> ) de los espermatozoides. -Aumenta el porcentaje de los espermatozoides con acrosoma intacto y expresión de proteínas GTPasas.	Liu <i>et al.</i> , 2020. (a)
*Coenzima-Q *L-carnitina *Vitamina C *Vitamina E *Vitamina B12 *Vitamina B9 *Zinc *Selenio  “Androferti” (2 veces al día x3 meses)	* 20 mg *1500 mg *60 mg *10 mg * 1 $\mu$ g  *200 mg *10 mg *50 $\mu$ g	(Se describirán algunos compuestos como las vitaminas del complejo B debido a que ya se abordó su descripción en cuadros ant) -Vitamina B9- ácido fólico indispensable para la maduración de proteínas mientras que la vitamina B12 participa en la descomposición de proteínas.	-Mejora la calidad del semen, concentración y morfología de los espermatozoides -Aumenta la motilidad después de la suplementación ( <b>35 % &gt; 28 %</b> ).	Nazari <i>et al.</i> ,2020
N-acetilcisteína	600 mg/ día	Es considerado un antioxidante derivado del aminoácido L-cisteína que contribuye a la síntesis de GSH y apoya la restauración de este; en caso de agotamiento a menudo causado por el estrés oxidativo e inflamación. Se ha encontrado que mejora la concentración de espermatozoides.	-Aumenta la concentración de espermatozoides, su motilidad ( <b>42 % &gt; 35%</b> ), los niveles de testosterona (asociada con niveles bajos de FSH y LH). -Disminuye la fragmentación de ADN y morfología anormal.	Jannatifar <i>et al.</i> , 2019.



---

---

## 16.-Futuras tendencias de suplementos antioxidantes en la PEIV

Existen sustancias en los medios de cultivo que pueden proporcionar otras posibilidades de obtener una alta tasa de embriones (García-Díaz *et al.*, 2013). Entre estos compuestos está la piridoxina (vitamina B6), una vitamina hidrosoluble que forma parte del complejo B, a la cual, se le atribuye gran relevancia por su intervención en el metabolismo de los aminoácidos y carbohidratos, absorción de la vitamina B12, síntesis de ácidos nucleicos, equilibrio de la entrada de Na y K, participación en la catalización y liberación de la glucosa; además de que atraviesa las membranas celulares fácilmente por difusión facilitada. Estudios demuestran que esta vitamina actúa como un cofactor requerido por numerosas enzimas en todos los organismos. El metabolito activo es el piridoxal 5' fosfato, implicado en la ruta del metabolismo para la formación de cisteína, que es el precursor limitante de la velocidad en la síntesis del GSH que es un antioxidante importante dentro y fuera de la célula, al mismo tiempo de ser responsable del equilibrio del estado redox de la célula (Matxain *et al.*, 2006).

Aunque no está clasificado como un compuesto antioxidante, se ha demostrado que tiene una gran efectividad. Se ha observado que la piridoxina en células endoteliales aumenta la viabilidad hasta en un 60% (Endo *et al.*, 2007) y en ensayos realizados con sangre, se observó que la vitamina B6 tiene tres veces más actividad antioxidante que la vitamina C y se demostró que inhibe la producción de superóxidos (Pierre *et al.*, 2003) En otro estudio se determinó que previene la oxidación de proteínas en células de lentes de conejo (una causa de formación de cataratas) (Jain *et al.*, 2002) y revirtió la respuesta inflamatoria elevada y la peroxidación de lípidos, característica de las ratas deficientes en este compuesto (Lakshmi *et al.*, 1991). Estudios realizados en criopreservación de espermatozoides de caprino utilizando piridoxina, se observó una mejoría en la viabilidad y simultáneamente se redujeron los parámetros de estrés oxidativo (Daramola *et al.*, 2017). Otro estudio similar realizado en la cabra africana mostró que la vitrificación de espermatozoides suplementados con piridoxina mejoró la reacción acrosomal y la viabilidad (Daramola *et al.*, 2016). En el embrión de pollo, se tiene reportado que mejora el desarrollo embrionario y que es esencial para el crecimiento del embrión (Cravens., 1949).

Otro estudio sobre el efecto de la piridoxina en la MIV registró un aumento de blastocistos de 17% an 32% (Aboelenain *et al.*, 2017). Esto sugiere que la suplementación con este compuesto y sus derivados se obtienen tienen tasas similares o mayores en la eliminación de ERO, comparados con los de las vitaminas C y E, que son dos de los antioxidantes biológicos más eficientes conocidos. Un estudio teórico realizado por Matxain *et al* (2006), menciona la posible vía para abatir el efecto nocivo

---

---

de ERO, mediante la abstracción de H<sup>+</sup> con carga en diferentes carbonos del anillo de piridoxina. Actualmente no está bien dilucidado el mecanismo por el que actúa, pero se ha determinado que la acción de esta vitamina acompañada de otras vitaminas del Complejo B al medio de MIV no produce un cambio en la maduración nuclear y citoplásmica ni desarrollo embrionario en bajas concentraciones (Kinyuru., 2010).

Otro de los compuestos con actividad antioxidante eficaz, es el resveratrol. El cual durante los últimos años ha apuntado a ser considerado como terapia contra diversas enfermedades por sus múltiples funciones además de antioxidantes, inmunomoduladores, antiplaquetarios y antiinflamatorias. Aunque está reportado que tiene efectos adversos cuando las dosis/ concentraciones son elevadas. En el caso de las mujeres, su consumo ha sido útil en el tratamiento de trastornos ginecológicos como SOP y endometriosis (Rodríguez-Varela y Labarta., 2020). Como ya se ha detallado, el resveratrol es un polifenol estilbeno presente en muchos frutos como uvas, bayas y cacahuete. Su uso se ha vuelto muy popular, debido a su potencial anticancerígeno al mediar la tumorigénesis, además de que se ha revelado su papel cardioprotector (Colica *et al.*, 2018). Se ha informado que los mecanismos de acción están centrados en varios mecanismos relacionados con factores de crecimiento y cinasas.

La adición de resveratrol en los medios de MIV de varias especies animales, está relacionado con el mejoramiento del potencial embrionario y a la vez con el aumento de las tasas de ATP, proponiéndose que este polifenol pudiera actuar mejorando la homeostasis mitocondrial, a la vez que tiene efecto anti apoptótico sobre las células de la granulosa (Sugiyama *et al.*, 2015) al contrario de las células de la teca donde sus efectos son proapoptóticos (Wong *et al.*, 2010).

La coenzima Q es considerado un antioxidante prometedor a futuro, ya que está reportado que actúa como protector de lipoproteínas, además dentro de las mitocondrias juega un papel importante en la producción de energía y como antioxidante fuera de las mitocondrias al erradicar los radicales libres por lo anterior se le ha atribuido un papel en la salud ya que ha llamado la atención por minimizar los efectos de algunas enfermedades degenerativas como la diabetes, cancer, alzheimer y enfermedades vasculares. Lo anterior, está reportado en pacientes que ha ingerido este antioxidante (Rodick *et al.*, 2018).

---

---

## 17.- DISCUSIÓN

De acuerdo con la revisión y búsqueda de información en la literatura, los estudios de las tecnologías de RA en donde se han utilizado antioxidantes han ido en aumento en los últimos 5 años. En las especies de interés doméstico y en el humano los resultados son variables, debido a que, en los gametos, la fisiología y la estructura celular son diferentes. Por tal motivo, cada protocolo para la PEIV es específico en cada especie; incluso en compuestos que se utilizan en los medios de cultivo, cumpliendo así las necesidades metabólicas para la obtención de energía.

La modificación de los medios de cultivo y la influencia de las moléculas tiene un efecto importante en la modulación de los eventos que ocurren en la interacción ovocito-espermatozoide. La preparación específica de los medios, sigue en investigación. La clave para continuar con la investigación es el conocimiento y caracterización de las secreciones en el tracto reproductor femenino que tienen contacto con los gametos y que influyen en el metabolismo celular (Romar *et al.*, 2019).

El metabolismo es uno de los focos de atención para la investigación con la finalidad de añadir compuestos en cantidades precisas a los medios de cultivo, con el objetivo de que al término de la PEIV el embrión sea de calidad, viable y transferido en las mejores condiciones a una hembra receptora. El mal funcionamiento de cualquier vía, podría verse implicado la PEIV; de este modo no se proveería la energía suficiente para los eventos de gametogénesis, foliculogénesis, detención y reinicio meiótico, ovulación, fertilización, capacitación espermática, reacción acrosomal, fertilización y el progreso del desarrollo embrionario, así como su implantación y diferenciación celular, en los cuales el aporte de ATP proporcionado por la mitocondria y el nivel de ERO tiene un impacto imprescindible en los resultados de PEIV.

La mitocondria al ser el organelo donde se produce la mayor cantidad de ATP está vinculada con la producción de ERO. Es un organelo multifuncional involucrado en varios aspectos de la biología celular como la homeostasis de calcio, metabolismo de ácidos grasos y en una gran variedad de señales; su número y estructura son variables en función del tamaño de la célula y su requerimiento energético. No obstante, la composición limitada de los medios y condiciones de cultivo afectan el metabolismo celular provocando lo que se conoce como estrés oxidante (Almansa-Ordoñez *et al.*, 2020). La producción de ERO es común y necesaria, por la participación que tiene en las vías de señalización, por lo tanto, la reproducción tiene un costo, es decir que los organismos al reproducirse

---

---

“pagan el precio” por la inversión de energía y producción de ERO que se lleva a cabo, afectando en gran medida la calidad de vida (Alonso-Álvarez *et al.*, 2017), cualquier especie que se reproduzca tiene una tasa metabólica más alta por lo que el equilibrio redox debe mantenerse ya que a nivel *in vitro* es limitado.

Los antioxidantes al ser compuestos multifuncionales que previenen la oxidación han sido objeto de estudio a través de los años, con la posibilidad de que, al estudiar minuciosamente sus características químicas y mecanismos de acción, puedan ser utilizados en los procedimientos para la PEIV. Estos representan muchas ventajas entre las cuales están el bajo costo y el uso de una gama de compuestos de origen natural.

El equilibrio entre antioxidantes y ERO es considerado un requisito indispensable para la maduración y desarrollo del ovocito. Recientemente se ha determinado que la mitocondria puede “tomar” lípidos del citoplasma y realizar con ellos la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, ya que existe evidencia de que los ovocitos de mamíferos requieren ácidos grasos para el potencial de su desarrollo, pero esto puede suponer una desventaja debido a que la presencia de ERO puede desencadenar lipoperoxidación (Bradley y Swann., 2019), misma que puede contrarrestarse con el uso de antioxidantes. El metabolismo los lípidos se ve reflejado en la coloración del citoplasma, y este difiere entre especies al verse reflejado en la coloración del citoplasma, además de la expresión de factores secretados por el ovocito (Dalbies-Tran *et al.*, 2020).

Aunque los resultados no son lo suficientemente altos, los antioxidantes al estar presentes en los fluidos y el tracto reproductor, estarían garantizando, que el añadirlos a los medios de cultivo, estos se estarían optimizando viéndose reflejados en los resultados de la PEIV, aunque hay que reconocer que faltan numerosos compuestos por evaluar, pero al desconocer parte de la bioquímica, farmacocinética, toxicología y demás mecanismos celulares, no se puede precisar qué antioxidante es el más efectivo e incluso cuales podrían actuar sinérgicamente, considerando que faltan muchos estudios de factores que podrían estar involucrados en la sobreproducción de ERO. Los actuales tratamientos con antioxidantes para disminuir las ERO se han vuelto populares y novedosos y se han realizado tanto *in vivo* aplicándolos por vía oral como *in vitro*, suplementando los medios de cultivo para gametos y embriones, aunque la mayoría de las investigaciones son realizadas *in vitro* garantizando el control de las variables.

Los reportes de la literatura apuntan a que los antioxidantes preferentemente se añaden en los medios de cultivo para la PEIV, específicamente en la MIV del ovocito. Durante su desarrollo sintetiza factores de crecimiento, ATP, GSH y moléculas que son imprescindibles para el desarrollo

---

---

embrionario posterior; la falla de la MIV (tanto la fase citoplásmica como nuclear) se ve reflejada en el potencial de desarrollo lo cual está bien documentado (Sirad *et al.*,2006). La competencia de los ovocitos está íntimamente relacionada con el éxito y la calidad del desarrollo embrionario, en el sistema *in vitro* no es la excepción. El emular el ambiente uterino y del oviducto utilizando elementos energéticos en los medios de cultivo, repercute especialmente en la mitocondria en cuanto a su forma, función y distribución, afectando el metabolismo de manera global y el respectivo aumento de ERO, considerando que las condiciones de cultivo no se han podido reproducir de forma exacta. Para mejorar los medios de cultivo, los antioxidantes son candidatos ideales, ya que se ha visto que aumentan la maduración citoplásmica y nuclear, por tal motivo los resultados exitosos de la FIV dependen de la competencia de la maduración dada por la suplementación de antioxidantes (Agarwal *et al.*, 2008).

En cada una de los cuadros donde se resumen los resultados con diferentes antioxidantes en diversas especies de mamíferos con importancia económica, se muestra el potencial de estos compuestos para regular los niveles de ERO, viéndose reflejado en variables como viabilidad, tasa de blastocistos, calidad embrionaria, potencial de membrana mitocondrial, concentración de GSH, expresión de genes antiapoptóticos entre otros; demostrando la multifuncionalidad de los antioxidantes y la ventaja que representa ante otro tipo de moléculas. Aunque hay algunos estudios que revelan que altas concentraciones son tóxicas o no tienen efecto positivo, por lo que se deben establecer las concentraciones fisiológicas requeridas (Torres-Osorio *et al.*,2019).

En el caso del Cuadro 3, la mayoría de los compuestos de acción antioxidante de aplicación reciente para la PEIV porcinos son de origen botánico, y en las características que se mencionan podría decirse que éstas son multifuncionales. En general, los resultados muestran principalmente una relación entre el aumento de la tasa de blastocistos y el mejoramiento del potencial de membrana mitocondrial. No obstante, también se aprecia que se disminuyen las ERO en los estudios en los que se mide el nivel de estas moléculas oxidativas. El porcino, es una de las especies con más estudiadas respecto a antioxidantes seguida del bovino, donde también muchos de los antioxidantes han tenido resultados similares a los del porcino. El antioxidante que presentó mayor porcentaje de la tasa del desarrollo embrionario es el ácido hialurónico con 77.3 % respecto al grupo control que es de 53. 1% ; esto podría ser una alternativa para poder suplementar los medios de MIV, y aunque no hay estudios posteriores referente a su estandarización, los resultados de la obtención de embriones señalan que una mejora de los medios de cultivo en su adición de otros compuestos podría mejorar las tasas de fertilización. En el caso del Cuadro 4, la combinación de varias vitaminas provee a la célula una actividad antioxidante sinérgica, pero solamente la carnitina y resveratrol presentaron altos

---

---

porcentajes respecto a su grupo control del estudio (54.2 % > 47.2 %), en el cual se aprecia la relación que hay entre el potencial del desarrollo embrionario y la eficaz acción antioxidante al evaluar expresión de genes antioxidantes y antiapoptóticos, contenido de GSH y viabilidad celular. Aunque los efectos de algunos compuestos como el plasma rico en plaquetas no fueron exitosos, no quiere decir que su aplicación en gametos de otras especies no pueda serlo. En el Cuadro 5, los componentes utilizados son diferentes respecto a los dos cuadros anteriores, con esto se comprueba una vez más la gran variedad de estos elementos, que podrían sustituir las funciones de aquellos factores de crecimiento, elementos, proteínas o sustancias que faltan por dilucidar en los fluidos oviductal y uterino de cada una de las especies. Los porcentajes más altos los representa la suplementación con la combinación de melatonina, ácido ascórbico y taurina, aunque específicamente la melatonina aumentó los porcentajes de maduración (61.76 % > 37.60 %). Respecto al Cuadro 6, los antioxidantes utilizados en ovinos son pocos, pero algunos de ellos como el resveratrol y la coenzima Q-10 ya habían sido evaluados en otras especies, con resultados positivos. Los últimos reportes, apuntan a un uso más sofisticado de extractos de plantas medicinales; a pesar de que se han realizado pocos estudios, los resultados han sido favorables al contener una mezcla de diversos antioxidantes, minerales e incluso vitaminas, que actúan sinérgicamente; la desventaja es la existencia de muchas plantas medicinales en las que no se pudo caracterizar su composición química total. El mayor porcentaje de blastocistos es de 46.5 % (mientras que la tasa más baja en ese estudio es de 19.4 %). Este porcentaje es comparativamente bajo a los que se presentan en otras especies con otros antioxidantes. En el Cuadro 7 en equinos los resultados son los más pobres, pocos han sido los estudios relacionados a la suplementación con antioxidantes en el medio de cultivo. Los resultados de maduración son bajos en comparación con otras especies, al igual que el desarrollo embrionario del cual la tasa de división fue de 44 %. Por último, en el Cuadro 8, para el caso de los humanos los problemas de fertilidad por diversas causas plantean una suplementación vía oral, miden diferentes variables, pero se considera que la más importante es el porcentaje de nacimientos vivos que está representado por una combinación de mioinositol, ácido lipóico y ácido fólico que en comparación con su grupo control del mismo estudio aumentó de manera considerable (30 % > 0 %).

En cuanto a técnicas de reproducción en el espermatozoide como la inseminación artificial y la criopreservación el uso de antioxidantes ha sido una alternativa para la disminución de las ERO y contribuir al desarrollo de éstas técnicas. Los esfuerzos destinados a esto último han sido prometedores e incluso están reportados en las tablas; combinaciones de antioxidantes podrían resultar en un aumento a diferencia de la acción de un antioxidante. Numerosos son los profesionales enfocados a la preservación del semen de cada especie; sin embargo, los resultados son variables por

---

---

la fisiología del gameto masculino. Además de que la modificación de cada protocolo con el fin de evitar los altos niveles de ERO sigue en pie de estandarizarse (Vichas *et al.*,2018).

Las ERO dañan los parámetros espermáticos y está reportado que las afectaciones a la estructura de la mitocondria se ven reflejado en la motilidad espermática, lo cual está documentado. Hay pocos estudios sobre la terapia antioxidante sobre el potencial de membrana mitocondrial siendo este uno de los parámetros principales relacionados con el metabolismo espermático y a su vez con la producción de ERO (Barbagallo *et al.*,2020); aunque el mecanismo de acción de los antioxidantes aún no está claro, se propone también su uso en espermatozoides, pero al no haber suficientes estudios comparativos no se puede establecer algún compuesto específico.

Las ERO producidas por los espermatozoides son generadas principalmente por la actividad de la NADPH. Esta enzima al formar parte de los procesos de fertilización y desarrollo embrionario se destaca que hay que nivelar las concentraciones estas mediante la utilización de antioxidantes, ya que además de que ofrecen la ventaja de ser natural, económica disponibilidad a diferencia de terapias hormonales de las que aún no están bien establecidas (Vessey *et al.*,2020).

En el Cuadro 9, el uso de antioxidantes para la conservación de semen de porcino es variable. Los resultados son prometedores; para fines prácticos se tomaron en cuenta los porcentajes de viabilidad y motilidad. El porcentaje que más destaca de dicha tabla es de 83 % , el cual casi duplica respecto al valor del grupo control; lo anterior se logró con la suplementación vía oral del orujo de uva. Mientras que la viabilidad lo representa la adición de taurina al diluyente con un 81 %, no hubo un aumento significativo respecto al grupo control (79.2 %). Para el Cuadro de semen de bovino (Cuadro 10) el porcentaje mas relevante de motilidad se representa con el extracto de Omija, el cual prácticamente se duplicó después de la congelación con suplementación previa; el resto de los antioxidantes reportados también evalúan parámetros espermáticos y relacionan el aumento de estos con la disminución de los niveles de ERO y lipoperoxidación. En el caso de del Cuadro 11, son dos los compuestos que aumentan la motilidad: el resveratrol (88 % > 78 %) y la quercetina (61.33 % > 53.41 %). Que, aunque son porcentajes diferentes, las diferencias entre sus grupos tratamiento y control con aproximadamente del 10 %. En esta tabla también se evalúa la expresión de enzimas antioxidantes, en las que la adición de ciertos compuestos en los protocolos de congelación/criopreservación podrían participar en la expresión adecuada de dichas enzimas. Para el Cuadro 12, el nanoselenio tuvo un efecto importante en los porcentajes de viabilidad y motilidad (77.92 % > 59.47 %) a comparación de los otros compuestos, posiblemente por su participación como cofactor. En el caso del Cuadro 13, se destaca el uso de combinaciones de antioxidantes; tal es el caso de la suplementación con SOD, CAT y GPX ya que su eficacia se demuestra en los porcentajes de la

---

---

motilidad (51 % > 35 %) y la viabilidad (75 % > 63 %), los porcentajes son cercanos a los de otras especies, pero aún así siguen siendo deficientes. Para el caso de los humanos, los porcentajes con cualquiera de los compuestos presentados en la tabla son los más bajos de todas las especies que se mencionan. Aunque el compuesto que aumenta de manera considerable los parámetros espermáticos es el péptido bioactivo (viabilidad -57.53 % > 42.41 % y motilidad - 65.33 % > 65.33 % ); concluyendo que muchos de los resultados favorecedores provienen a partir de extractor herbales.

Los extractos herbales podrían estar implicados en el metabolismo, promoviendo la activación de vías de señalización. Al tener conocimiento de que las condiciones de cultivo afectan a la mitocondria de manera directa y que conlleva a una alteración en la producción de ATP; la alteración de los mecanismos metabólicos en el interior del organelo afecta en general a todo el metabolismo perturbando drásticamente el ciclo celular, movilización del calcio, las vías de señalización y la expresión de factores. Del mismo modo al alterarse el pH, se crea un ambiente propicio para la generación de ERO y la inducción del metabolismo anormal (Camargo *et al.*, 1999).

Las preguntas que quedan en el aire son: 1) ¿Cuáles son los parámetros más importantes del ovocito, espermatozoide y embrión para tomarlos en cuenta al momento de evaluar el efecto positivo de los antioxidantes en la PEIV; 2) A partir de esta revisión realizada, ¿se puede establecer alguna propuesta de concentración de antioxidantes para mejorar la PEIV?

## **18.- CONCLUSIÓN**

Se ha realizado una extensa revisión bibliográfica con la finalidad de resaltar la importancia del estudio el efecto antioxidante para mejorar la PEIV de importancia económica. En general, a partir de esta revisión , se observa con el uso de antioxidantes una clara mejoría en la calidad embrionaria, además de una importante reducción de ERO tanto en ovocitos como en espermatozoides. Sin embargo, para poder establecer el uso de algún antioxidante en los métodos *in vitro* hacen falta más estudios bioquímicos acerca del ambiente redox en el interior de los gametos para facilitar el tratamiento antioxidante adecuado, debido a la fisiología diferente de los gametos entre especies.



---

---

## 19.- REFERENCIAS

- Abadjieva D, Yotov S, Mladenova V, Lauberte L, Kalvanov I, Krasilnikova J y Kistanova E. 2020. Positive effect of natural antioxidant oregonin from *Alnus incana* bark on ram semen quality stored at 5° C for 48 h. Research in veterinary science, 131, 153-158. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.021>
- Abeydeera L. 2002. *In vitro* production of embryos in swine. Theriogenology 57, 257-273. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00670-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00670-7)
- Alfonsín M y Bucetto M. 2019. Las especies en peligro de extinción y los mecanismos para la recuperación y conservación de la biodiversidad: un estudio sobre la viabilidad de los mecanismos y las trabas burocráticas. Revista de la facultad de derecho y ciencia política de la Universidad Alas Peruanas, 17, 297-324. <http://dx.doi.org/10.21503/lex.v17i23.1680>
- Álvarez López A. 2018. Infertilidad femenina: causas y tratamiento. Tesis de grado de enfermería. Universidad de Cantabria, España.
- Amira B, Aziza, Ahmed K, Osama A y Bakery S. 2016. Efficiency of hyaluronic acid binding ability to improve sperm selection in intracytoplasmic sperm injection (ICSI). The egyptian journal of hospital medicine 65, 536-545. DOI: 10.12816 / 0033762
- An Q, Peng W, Cheng Y, Lu Z, Zhou C, Zhang Y y Su J. 2019. Melatonin supplementation during *in vitro* maturation of oocyte enhances subsequent development of bovine cloned embryos. Journal of cellular physiology, 234, 17370-17381. <https://doi.org/10.1002/jcp.28357>
- Anchordoquy J, Mattioli G, Picco S, Rosa D y Peral P. 2010. Importancia del zinc durante la maduración *in vitro* de ovocitos: Consecuencias en el desarrollo embrionario temprano. Tercera Época, Revista de la Facultad de Ciencias Médicas, 2,1-2. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/15420>
- Anjos J, Aguiar F, Sá N, Souza J, Cibin F, Alves B y Figueiredo J. 2019. Anethole improves blastocysts rates together with antioxidant capacity when added during bovine embryo culture rather than in the *in vitro* maturation medium. Zygote, 27, 382 385. <https://doi.org/10.1017/S0967199419000443>

- 
- 
- Arenas E. 2009. Enzimas anti-especies reactivas de oxígeno como reguladores en los procesos de espermatogénesis, maduración y almacenamiento prolongado de espermatozoides en el murciélago. Tesis de Doctorado. UAM- Iztapalapa, México
- Arenas R, Ruiz C, Ambriz D, Zúñiga R, Rodríguez T, Rosado G. 2010. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. *Contactos* 78,5-11.
- Arenas E, Rodríguez-Tobón A, Trinidad B, Sandoval F, Tobón E, Jiménez-Salazar J y León-Galván M. 2014. Participación de las especies reactivas de oxígeno en la fisiología espermática. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1, 73.
- Arslan H, Herrera C, Malama E, Siud M, Leiding C y Bollwein H. 2019. Effect of the addition of different catalase concentrations to a TRIS-egg yolk extender on quality and *in vitro* fertilization rate of frozen-thawed bull sperm. *Cryobiology*, 91, 40-52. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.10.200>
- Asa E, Ahmadi R, Mahmoodi M y Mohammadniya A. 2020. Supplementation of freezing media with alpha lipoic acid preserves the structural and functional characteristics of sperm against cryodamage in infertile men with asthenoteratozoospermia. *Cryobiology*, 96, 166-174. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.07.001>
- Bahrami A, Divar R, Azari M y Kafi M. 2020. Nicotinic acid (niacin) supplementation in cooling and freezing extenders enhances stallion semen characteristics. *Journal of equine veterinary science*, 94, 103236. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103236>.
- Barakat I, Al-Himaidi A y Rady A. 2014. Antioxidant effect of green tea leaves extract on *in vitro* production of sheep embryos. *Pakistan journal of zoology*, 46, 167-175.
- Barakat I, Danfour M, Galewan F y Dkhil M. 2015. Effect of various concentrations of caffeine, pentoxifylline, and kallikrein on hyperactivation of frozen bovine semen. *BioMedical research international*, 1-5. <https://doi.org/10.1155/2015/948575>
- Barakat H, Kaabi M y Alajmi A. 2020. The role of honeybee pollen as a natural source of antioxidants in the *in vitro* maturation medium of sheep oocytes and its effect on gene expression. *Environmental science and pollution research international*, 27, 31350–31356. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09386-9>

- 
- 
- Barbagallo F, Vignera S, Cannarella R, Aversa A, Calogero A y Condorelli R. 2020. Evaluation of sperm mitochondrial function: A key organelle for sperm motility. Journal of clinical medicine, 363. <https://doi.org/10.3390/jcm9020363>
- Barnett D y Bavister B. 1996. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? Molecular reproduction and development: incorporating gamete research, 43, 105-133. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199601\)43:1<105::AID-MRD13>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199601)43:1<105::AID-MRD13>3.0.CO;2-4)
- Barroso-Villa G, Colín-Valenzuela A y Estrada-Gutiérrez G. 2015. Oxidantes y antioxidantes en la infertilidad masculina. Revista mexicana de medicina reproductiva, 7, 117-123.
- Basioura A, Tsakmakidis I, Martínez E, Roca J, Li J, Molina M y Parrilla I. 2020. Effect of astaxanthin in extenders on sperm quality and functional variables of frozen-thawed boar semen. Animal reproduction science, 218, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106478>
- Benítez D. 2006. Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. Revista cubana de investigaciones biomédicas, 25, 1-8.
- Blay P. 1989. Papel del ciclo del enlace gamma-glutamil en el metabolismo de los aminoácidos de distintos tejidos de mamífero. Tesis de Doctorado. Universidad de Valencia, España.
- Blokchina O, Virolainen E y Fagerstedt K. 2003. Antioxidants, oxidative damage, and oxygen deprivation stress: a review. Annals of botany, 91, 179-194. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf118>
- Brun R. 1974. Studies on fertilization in *Xenopus laevis*. Biology of reproduction, 11, 513-518. <https://doi.org/10.1095/biolreprod11.5.513>
- Budani M y Tiboni G. 2020. Effects of supplementation with natural antioxidants on oocytes and preimplantation embryos. Antioxidants, 9, 612. <https://doi.org/10.3390/antiox9070612>
- Camargo O, Ramírez J y Angel M. 1999. Radicales libres y desarrollo embrionario. Revista Colombiana de ciencias pecuarias, 12, 108-118. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/rccp/article/view/323709>
- Canosa S, Paschero C, Carosso A, Leoncini S, Mercaldo N, Gennarelli G y Revelli A. 2020. Effect of a combination of myo-inositol, alpha-lipoic acid, and folic acid on oocyte morphology and embryo

---

---

morphokinetics in non-PCOS overweight/obese patients undergoing IVF: A pilot, prospective, randomized study. *Journal of clinical medicine*, 9, 1-13. <https://doi.org/10.3390/jcm9092949>.

-Carrera J, Jiménez E, Acosta T, Núñez J, Quezada-Casasola A, Escárcega A y Orozco E. 2020. Effect of *Moringa oleifera* seed extract on antioxidant activity and sperm characteristics in cryopreserved ram semen. *Journal of applied animal research*, 48, 114-120. <https://doi.org/10.1080/09712119.2020.1741374>

-Casillas M. 2014. Efecto de las células del cúmulo en la viabilidad, maduración, fertilización y desarrollo embrionario después de la vitrificación de ovocitos inmaduros porcinos *in vitro*. Tesis de maestría. UAM Iztapalapa, México.

-Casillas M. 2018. Efecto de la vitrificación en la fertilización y desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos inmaduros porcinos. Tesis de doctorado. UAM Iztapalapa, México.

-Cheng L, Qin Y, Hu X, Ren L, Zhang C, Wang X y Wu Z. 2019 . Melatonin protects mature pig oocytes *in vitro* from Aflatoxin B1 toxicity *in vitro*. *Pineal research journal*, 66, 1-12. DOI: [10.1111/jpi.12543](https://doi.org/10.1111/jpi.12543)

-Choi Y, Gibbons, J, Canesin S y Hinrichs K. 2016. Effect of medium variations (zinc supplementation during oocyte maturation, perfertilization pH, and embryo culture protein source) on equine embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 86, 1782-1788. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.037>

-Chowdhury M, Choi H, Khan I, Lee KL, Mesalam A, Song SH y Kong I. 2017. Supplementation of lycopene in maturation media improves bovine embryo quality *in vitro*. *Theriogenology*, 103, 173-184. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.003>

-Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. 2003. Status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59,171-188. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01270-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01270-0)

-Colica C, Milanović M, Milić N, Aiello V, De Lorenzo A y Abenavoli L. 2018. A systematic review on natural antioxidant properties of resveratrol. *Natural product communications*, 9, 1195-1203. <https://doi.org/10.1177/1934578X1801300923>

-Contreras M, Treulen F, Arias M, Silva M, Fuentes F, Cabrera P y Felmer R. 2020. Cryopreservation of stallion semen: Effect of adding antioxidants to the freezing medium on sperm physiology. *Reproduction in domestic animals*, 55, 229-239. <https://doi.org/10.1111/rda.13611>

---

---

-Córdova B, Morató R, Izquierdo D, Paramio T y Mogas T. 2010. Effect of the addition of insulin-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the *in vitro* maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. *Theriogenology* 74,1341-1348. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.003>

-Córdova I, Guerra J, Iglesias R y Rodríguez D. 2018. Estrés oxidativo y antioxidantes en animales. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, 1ra. Edición, 77-79, ISBN:978-607-28-1458-5.

-Córdova I, Saltijeral O, Ruiz L, Xolalpa C, Cortes S, Peña B, Córdova J, Córdova J, Méndez M, Huerta C, Juárez M y Guerra L. 2010. Oxidative stress in gametes. *Revista electrónica de veterinaria*, 11,1695-7504. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/3402>

-Córdova-Veizaga L. 2011. Estrategias de cultivo para optimizar la maduración *in vitro* de ovocitos de terneras prepúberes. Tesis doctoral. UAM. Departamento de ciencia animal y de los alimentos, Facultad de Veterinaria, Barcelona, España.

-Cortés V. 2011. Desarrollo embrionario *in vitro* en medio secuencial o continuo. Tesis de Maestría. Posgrado en producción animal. Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.

-Dai G, Meng Y, Zhang L, Du Y, Wen F, Feng T y Hu J. 2019. Effect of addition of melatonin on liquid storage of ram semen at 4° C. *Andrology*, 5, e13236. <https://doi.org/10.1111/and.13236>

-Dalbies-Tran R, Cadoret V, Desmarchais A, Elis S, Maillard V, Monget P y Uzbekova S. 2020. A comparative analysis of oocyte development in mammals. *Cells*, 9 (4), 1002. <https://doi.org/10.3390/cells9041002>.

-Da Silva S. 2019. Male infertility and antioxidants: ¿one small step for man, no giant leap for andrology? *Reproductive bioMedicine online*, 39, 879-883. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.08.008>.

-De Albuquerque M, Da Silva G, Cortes S, Luz S, de Resende A, de Castro N y Stahlberg, R. 2020. Does coenzyme Q10 exert antioxidant effect on frozen equine sperm? *Journal of equine veterinary science*, 88, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.102964>

---

---

-Del Prete C, Stout T, Montagnaro S, Pagnini U, Uccello M, Florio P y Cocchia N. 2019. Combined addition of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase improves quality of cooled stored stallion semen. *Animal reproduction science*, 210, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106195>

-Deleuze S, Dubois S, Caillaud M, Bruneau B, Goudet, G y Duchamp G. 2010. Influence of cysteamine on *in vitro* maturation, *in vitro* and *in vivo* fertilization of equine oocytes. *Reproduction in domestic animals*, 45, 1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01122.x>

-De Oliveira Santos M, Nascimento L, Praxedes É, Borges A, Silva A, Bertini L y Pereira, A. 2019. *Syzygium aromaticum* essential oil supplementation during *in vitro* bovine oocyte maturation improves parthenogenetic embryonic development. *Theriogenology*, 128, 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.031>

-Devroey P y Van Steirteghem A. 2004. Una revisión de diez años de experiencia en ICSI. *Actualización sobre reproducción humana*, 10, 19-28.

-Do L, Taniguchi M, Nguyen N, Tanihara F y Takagi M. 2015. Melatonin supplementation during *in vitro* maturation and development supports the development of porcine embryos. *Reproduction domestic animal* 50,1054–1058. <https://doi.org/10.1111/rda.12607>

-Ducolomb Y, Casas E, Romo S, Bonilla E y Betancourt M. 2012. La fertilización *in vitro* y sus aplicaciones en producción animal y en investigación básica. En *avances en Biología de la reproducción*. (pp 83-104). UAMI.

-Dumollard R, Carroll J, Duchon M, Campbell K y Swann K. 2009. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. In *seminars in cell y developmental biology*, 20, 346-353. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.12.013>

-Echeverry M. 2008. Estudio de la beta-ciclodextrina como inductor de la capacitación espermática en conejos. Tesis de Maestría. Universidad de Valencia, España.

-Elmi A, Ventrella D, Barone F, Carnevali G, Filippini G, Pisi A y Bacci M. 2019. *In vitro* effects of tea tree oil (*Melaleuca Alternifolia* essential oil) and its principal component terpinen-4-ol on swine spermatozoa. *Molecules*, 24, 1-15. <https://doi.org/10.3390/molecules24061071>.

- 
- Eppig J, O'Brien M y Wigglesworth K. 1996. Mammalian oocyte growth and development *in vitro*. Molecular reproduction and development 44,260-27. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199606\)44:2<260::AID-MRD17>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199606)44:2<260::AID-MRD17>3.0.CO;2-6)
- Errecart V, Lucero M y Sosa M. 2015. Análisis del mercado mundial de carnes. Tesis de maestría Facultad de Economía y Negocios, Universidad Nacional de San Martín. Tarapoto, Perú.
- ESHRE 2012. El número mundial de bebés con FIV e ICSI ha alcanzado un total calculado de 5 millones. [https://www.abc.es/sociedad/abci-mas-ocho-millones-ninos-nacido-fecundacion-vitro-desde-primera-bebe-probeta-1978201807091021\\_noticia.html?ref=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F](https://www.abc.es/sociedad/abci-mas-ocho-millones-ninos-nacido-fecundacion-vitro-desde-primera-bebe-probeta-1978201807091021_noticia.html?ref=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F)
- FarzollahiM, Tayefi-Nasrabadi H, Mohammadnejad D y Abedelahi A. 2016. Supplementation of culture media with vitamin E improves mouse antral follicle maturation and embryo development from vitrified ovarian tissue. Journal of obstetrics and gynaecology research, 42, 526-535. <https://doi.org/10.1111/jog.12933>
- Fatemi F, Mohammadzadeh A, Sadeghi R, Akhondi M, Mohammadmoradi S, Kamali K y Giahi L. 2017. Role of vitamin E and D3 supplementation in intra-cytoplasmic sperm injection outcomes of women with polycystic ovarian syndrome: A double blinded randomized placebo-controlled trial. Clinical nutrition, 18, 23-30. [Doi: 10.1016/j.clnesp.2017.01.002](https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2017.01.002).
- Favetta A, John S, King A y Betts D. 2007. High levels of p66shc and intracellular ROS in permanently arrested early embryos. Free radical biology and medicine, 42, 1201-1210. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.018>
- Fernández A, Díaz T y Muñoz G. 2007. Producción *in vitro* de embriones bovinos. Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias, 48, 51-60.
- Castillo-Baso J y García-Villafaña G. 2012. Selección rutinaria de espermatozoides utilizando la técnica "ICSI fisiológico". Tesis de Subespecialidad. Universidad Autónoma de Baja California, Baja California, México.
- García-Díaz J, Romero-Aguirregomez J, Astiz Blanco S y Ruiz López S. 2013. Adición de sustancias antioxidantes en los medios de cultivo empleados en la producción *in vitro* de embriones en mamíferos. Revista Salud Animal. 35,10-19.

- 
- 
- Gardner D. 2008. Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reproduction, fertility, and development*, 20, 9-18. Doi: [10.1071/rd07160](https://doi.org/10.1071/rd07160)
- Gloria A, Contri A, Grotta L, Carluccio A, Robbe D, Ianni, A y Martino G. 2019. Effect of dietary grape marc on fresh and refrigerated boar semen. *Animal reproduction science*, 205, 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.03.016>
- Guerin P y Menezo Y. 1995. Hypotensaurine and taurine in gamete and embryo environments: de novo synthesis through the sulfine cysteine acid pathway in oviduct cells. *Zigote*, 3, 333-343.
- García-Vázquez F, Ruiz S, Matas C, Izquierdo-Rico M, Grullón L, De Ondiz A, Vieira L, Avilés-López K, Gutiérrez-Adán A y Gadea J. 2010. Production of transgenic piglets using ICSI-spermmediated gene transfer in combination with recombinase RecA. *Reproduction* 140, 259–272. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0129>
- Ghallab M, Shahat M, Fadl M, Ayoub M y Moawad A. 2017. Impact of supplementation of semen extender with antioxidants on the quality of chilled or cryopreserved Arabian stallion spermatozoa. *Cryobiology*, 79, 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.10.001>
- Giannubilo S, Orlando P, Silvestri S, Cirilli I, Marcheggiani F, Ciavattini A y Tiano L. 2018. CoQ10 supplementation in patients undergoing IVF-ET: The relationship with follicular fluid content and oocyte maturity. *Antioxidants*, 7, 141. Doi: [10.3390/antiox7100141](https://doi.org/10.3390/antiox7100141).
- GonzálezM, Betancourt M y Ortiz R. 2000. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*, 25, 3-9.
- Gorshinova V, Tsvirkun D, Sukhanova I, Tarasova N, Volodina M, Marey M , Sukhikh G. 2017. Cumulus cell mitochondrial activity in relation to body mass index in women undergoing assisted reproductive therapy. *BBA clinical*, 7, 141-146. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2017.03.005>
- Goto K, Kinoshita, A., Takuma Y y Ogawa, K. 1990. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. *Veterinary record*, 127, 517-20.
- Granleese T, Clark S, Swan A y Van Der Werf J. 2015. Increased genetic gains in sheep, beef, and dairy breeding programs from using female reproductive technologies combined with optimal



---

---

contribution selection and genomic breeding values. *Genetics selection evolution*, 47, 71-13. <https://doi.org/10.1186/s12711-015-0151-3>

-Gocher T. 2020. The effect of supplementation of different antioxidants during maturation of caprine oocytes *in vitro*. *Journal of entomology and zoology studies*, 8, 175-180.

-González M, Fernández I y Bauza JY. 2007. Indicadores de estrés oxidativo en cerebros de ratas viejas con déficit cognitivo. *Biotecnología aplicada*, 24, 145-50.

-Guo Q, Xuan MF, Luo Z, Wang J, Jin S, Yin X y Kang J. 2019. Baicalin improves IVM of pig oocytes and subsequent preimplantation embryo development by inhibiting apoptosis. *Reproduction, fertility, and development*, 31, 983-992. <https://doi.org/10.1071/RD18333>

-Han Y, Ishibashi S, Iglesias-Gonzalez J, Chen Y, Love N y Amaya E. 2018. Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial ROS regulate the early embryonic cell cycle. *Cell reports*, 22, 218-231. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.042>

-Hashem M, Bhandari D, Hossein M, Jeong Y, Kim S, Kim J y Kang S. 2007. Effect of essential and nonessential amino acids in North Carolina State University (NCSU)-23 medium on development of porcine *in vitro* fertilized embryos. *Asian-australasian journal of animal sciences*, 20, 693-700. <https://doi.org/10.5713/ajas.2007.693>.

-Herradón P, Quintela L, Becerra J, Ruibal S, Fernández M. 2007. Fecundación *in vitro*: Alternativas para la mejora genética de bovinos. *Archivos latinoamericanos de producción animal*; 15:33-40.

-Hernández A. 2013. Viabilidad y función espermática de semen descongelado de porcino adicionado con plasma seminal homólogo. Tesis de maestría. Universidad Veracruzana, Veracruz.

-Hernández-Fernández A y Hernández-Fonseca H. 2010. Efecto de la suplementación con L-cisteína en la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos. *Revista científica*, 20, 268-273. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95916116008>

-Hernández J, Fernández F, Ducolomb R, Fierro R, Romo S y Betancourt M. 2013. La Inyección Intracitoplásmica del espermatozoide (ICSI) y la vitrificación de ovocitos y embriones como técnicas de Reproducción asistida: *una revisión*. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Serie Académicos CBS (110), 14-15. ISBN: 978-607-477-927-1.

-Hernández-Pichardo J, Ducolomb Y, Romo S, Kjelland M, Fierro R, Casillas F y Betancourt M. 2016. Pronuclear formation by ICSI using chemically activated ovine oocytes and zona pellucida

---

---

bound sperm. Journal of Animal Science and Biotechnology, 7, 1-8. [Doi: 10.1186/s40104-016-0124-](https://doi.org/10.1186/s40104-016-0124-6)

[6](https://doi.org/10.1186/s40104-016-0124-6)

-Heydarnejad A, Ostadhosseini S, Varnosfaderani R, Jafarpour F, Moghimi A y Nasr-Esfahani H. 2019. Supplementation of maturation medium with CoQ10 enhances developmental competence of ovine oocytes through improvement of mitochondrial function. Molecular reproduction and development, 86, 812-824. <https://doi.org/10.1002/mrd.23159>.

-Hicks E, Mentler, M y Whitaker B. 2020. 184 Effects of cyanidin supplementation on *in vitro* maturation of pig oocytes. Reproduction, fertility, and development, 32, 220-220. <https://doi.org/10.1071/RDv32n2Ab184>

-Hiramoto Y. 1962. Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs. Experimental Cell Reserch, 27, 416-426. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(62\)90006-X](https://doi.org/10.1016/0014-4827(62)90006-X)

-Hosoi Y, Miyake M, Utsumi K y Iritani A. 1988. Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoon. Internacional congres animals reproduction artificial,3, 331-3.

-Hoyos-Marulanda V, Alves B, Rosa P, Vieira A, Gasperin B, Mondadori R y Lucia J. 2019. Effects of polyunsaturated fatty acids on the development of pig oocytes *in vitro* following parthenogenetic activation and on the lipid content of oocytes and embryos. Animal reproduction science, 205, 150-155. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.05.003>

-Huerta J, Ortega C, Cobos P, Herrera H, Díaz C y Guinzberg P. 2005. Estrés oxidante y el uso de antioxidantes en animales domésticos. Asociación interciencia, 30, 728-734.

-Iritani A. 1991. Micromanipulation of gametes for *in vitro* assisted fertilization. Molecular reproduction development; 28, 199-207. <https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch31>

-Ismail A, Abdel-Khalek A, Khalil W y El-Harairy M. 2020. Influence of adding green synthesized gold nanoparticles to tris-extender on sperm characteristics of cryopreserved goat semen. Journal of animal and poultry production, 11, 39-45. [10.21608 / JAPPMU.2020.78854](https://doi.org/10.21608/JAPPMU.2020.78854).

-Iwata H, Akamatsu S, Minami N y Yamada M. 1998. Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. Theriogenology, 50, 365-375. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00146-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00146-0)

---

---

-Jamil M, Debbarih H, Aboulmaouahib S, Filali O, Mounaji K, Zarqaoui M y Cadi R. 2020. Reactive oxygen species in reproduction: harmful, ¿essential or both? *Zygote*, 28, 1-15. <https://doi.org/10.1017/S0967199420000179>.

-Jannatifar R, Parivar K, Roodbari N y Nasr-Esfahani M. 2019. Effects of N-acetyl-cysteine supplementation on sperm quality, chromatin integrity and level of oxidative stress in infertile men. *Reproductive biology and endocrinology*, 17, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0468-9>

-Javvaji P, Dhali A, Francis R, Kolte P, Mech A, Sathish, L y Roy C. 2019. Interleukin-7 improves *in vitro* maturation of ovine cumulus-oocyte complexes in a dose dependent manner. *Cytokine*, 113, 296-304. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.07.025>

-Jeong Y, Park S, Hossein M, Kim S, Kim J y Lee S. 2006. Antiapoptotic and embryotrophic effects of alpha-tocopherol and L-ascorbic acid on porcine embryos derived from *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 66, 2104-2112. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.06.007>

-Jin J, Lee S, Taweechaipaisankul A, Kim G y Lee B. 2017. Melatonin regulates lipid metabolism in pig oocytes. *Pineal research journal*, 62,1-10. <https://doi.org/10.1111/jpi.12388>

-Jiang H, Liang S, Yao X, Jin Y, Shen X, Yuan B y Kim, NH. 2018. Laminarin improves the developmental capacity of early-stage pig embryos by inhibiting oxidative stress. *Theriogenology*, 115, 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.019>.

-Joao C. 2018 (23 de Febrero del 2021). 2018. Statistics of embryo production and transfer in domesticfarm. [https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS\\_Data\\_Retrieval\\_Report\\_2018.pdf](https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2018.pdf)

-Kaabi M, Barakat H, Alajmi R y Abdel-Daim M. 2020. Use of black seed (*Nigella sativa*) honeybee to improve sheep oocyte maturation medium. *Environmental science and pollution research*, 27, 33872 – 33881. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09504-7>.

- 
- 
- Kala M, Shaikh M, Nivsarkar M. 2017. Equilibrium between antioxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. *Reproductive medicine and biology*, 1, 28-35. Doi: [10.1002/rmb2.12013](https://doi.org/10.1002/rmb2.12013)
- Kang J, Kwon D, Park S, Kim S, Moon J, Koo O, Lee B. 2013. Quercetin improves the *in vitro* development of porcine oocytes by decreasing reactive oxygen species levels. *Journal of veterinary science* 14, 15–20. <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.15.0341>
- Khan I, Chowdhury M, Song S, Mesalam A, Zhang S, Khalil A y Kong I. 2018. Lupeol supplementation improves the developmental competence of bovine embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 107, 203-210. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.017>
- Kim W, Lee S, Park Y, Jeong S, Kim E y Park S. 2019. Antioxidant hesperetin improves the quality of pig oocytes during *in vitro* aging. *Molecular reproduction and development*, 86, 32-41. Doi: [10.1002/mrd.23079](https://doi.org/10.1002/mrd.23079).
- Könisberg M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. 1ra. Edición, México: Manual moderno. ISBN: 9786074481501.
- Lane M y Gardner D. 2007. Embryo culture medium: which is the best? Best practice y research. *Clinical obstetrics and gynaecology*, 21, 83-100. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2006.09.009>
- Lian H, Gao Y, Jiao G, Sun M, Wu X, Wang T y Tan J. 2013. Antioxidant supplementation overcomes the deleterious effects of maternal restraint stress-induced oxidative stress on mouse oocytes. *Reproduction*, 146, 559-568. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0268>
- Liang S, Guo J, Jin Y, Yuan B, Zhang J y Kim N. 2018. C-Phycocyanin supplementation during *in vitro* maturation enhances preimplantation developmental competence of parthenogenetic and cloned embryos in pigs. *Theriogenology*, 106, 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.001>.
- Livingston T, Eberhardt D, Edwards L y Godkind J. 2004. Retinol improves bovine embryonic development *in vitro*. *Reproductive biology and endocrinology* 28, 83-90. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-83>
- (a)Liu G, Pan B, Li S, Ren J, Wang B, Wang C y Dai Y. 2020. Effect of bioactive peptide on ram semen cryopreservation. *Cryobiology*, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.08.007>.

---

---

- (b) Liu H, Sun Y, Zhao J, Dong W y Yang G. 2020. Effect of zinc supplementation on semen quality, sperm antioxidant ability, and seminal and blood plasma mineral profiles in cashmere goats. *Biological trace element research*, 196, 438-445. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01933-x>.

-Lonergan P, Fair T, Forde N y Rizos D. 2016. Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*, 86, 270-277. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.040>.

-Longobardi V, Zullo G, Cotticelli A, Salzano A, Albero G., Navas L y Neglia G. 2020. Crocin improves the quality of cryopreserved goat semen in different breeds. *Animals*, 10, 1101. <https://doi.org/10.3390/ani10061101>

- (a) Lu J, Wang Z, Cao J, Chen Y y Dong Y. 2018. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive biology and endocrinology*, 16, 80. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0391-5>

- (b) Lu X, Wu Z, Wang M, Cheng W. 2018. Effects of vitamin C on the outcome of *in vitro* fertilization-embryo transfer in endometriosis: A randomized controlled study. *Journal international medical research*, 46, 4624–4633. [Doi: 10.1177/0300060518786918](https://doi.org/10.1177/0300060518786918)

-Luo D, Zhang J, Peng Y, Liu J, Han D, Wang Y y Jiang H. 2020. Imperatorin improves *in vitro* porcine embryo development by reducing oxidative stress and autophagy. *Theriogenology*, 146, 145-151. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.029>

-Luo D, Zhang, J, Liu W, Yao X, Guo H, Jin Z y Kim N. 2020. Leonurine improves *in vitro* porcine embryo development competence by reducing reactive oxygen species production and protecting mitochondrial function. *Theriogenology*, 156, 116-123. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.038> .

-Lv C, Larbi A, Wu G, Hong Q y Quan G. 2019. Improving the quality of cryopreserved goat semen with a commercial bull extender supplemented with resveratrol. *Animal reproduction science*, 208, 106127. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106127>.

-Marín-Guzman J, Mahan D y Whitmoyer R. 2000. Effect of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extended semen on sperm motility. *Journal animal science*, 78, 1544-1550. <https://doi.org/10.2527/n/2000.7861544x>

- 
- 
- Martín-Romero F, Miguel-Lasobras E, Domínguez-Arroyo J, González-Carrera E y Álvarez I. 2008. Contribution of culture media to oxidative stress and its effects on human oocytes. *Reproductive biomedicine online*, 17, 652-661. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60312-4](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60312-4)
- Mata-Miranda M y Vásquez-Zapién G. 2018. La fecundación *in vitro*: Louise Brown, a cuatro décadas de su nacimiento. *Revista de sanidad militar*, 72, 363-365.
- Matxain J, Ristilä M, Strid Å y Eriksson A 2006. Theoretical study of the antioxidant properties of pyridoxine. *Journal of physical chemistry*, 110, 13068-13072. Doi: [10.1021/jp065115p](https://doi.org/10.1021/jp065115p)
- Mattioli M, Bacci M, Galeati G y Seren E. 1991. Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 36, 95-105. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90438-J](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90438-J)
- McCollin A, Swann R, Summers M, Handyside A y Ottolini CS. 2020. Abnormal excision and arrest of the development of pre-implantational human embryos *in vitro*. *European journal of medical genetics*, 63, 103651. Doi: [10.1016/j.ejmg.2019.04.008](https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2019.04.008)
- Membrillo A, Córdova A, Hicks J, Olivares-Corichi I, Martínez Torres V y Valencia Méndez J. 2003. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: Una revisión. *Interciencia*, 28, 699-704.
- Menchaca A, Barrera N, Dos Santos Neto P, Cuadro F y Crispo M. 2018. Advances and limitations of *in vitro* embryo production in sheep and goats. *Animal Reproduction*, 13, 273-278. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR871>
- Menéndez-Blanco I, Catala M, Roura M, Soto-Heras S, Piras A, Izquierdo D y Paramio M. 2019. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of prepubertal goat oocytes using fresh and frozen-thawed semen. *Small ruminant research*, 170, 137-142.
- Menéndez-Blanco I, Soto-Heras S, Catalá MG, Roura M, Izquierdo D y Paramio M. 2020. Effect of crocetin added to IVM medium for prepubertal goat oocytes on blastocyst outcomes after IVF, intracytoplasmic sperm injection and parthenogenetic activation. *Theriogenology*, 155, 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.008>.

---

-Meriem H. 2013. Efecto de las células epiteliales del oviducto bovino y de sus vesículas extracelulares en el cultivo embrionario bovino *in vitro*. Tesis de maestría. Universidad Politécnica de Valencia, España.

-Merlo B, Iacono E, Bucci D, Spinaci M, Galeati G y Mari G. 2016. Beta-mercaptoethanol supplementation of *in vitro* maturation medium does not influence nuclear and cytoplasmic maturation of equine oocytes. *Reproduction in domestic animals*, 51, 992-996. <https://doi.org/10.1111/rda.12778>.

-Metcalf S, Masterson R, Battaglia D, Thompson G, Foss R, Beck R y O'Leary, T. 2020. Conditions to optimise the developmental competence of immature equine oocytes. *Reproduction, fertility, and development*, 32, 1012-1021. <https://doi.org/10.1071/RD19249>.

-Miran-Kim M. 2011. Comparación de medios de maduración *in vitro* de ovocitos inmaduros: la efectividad del medio de cultivo para blastocitos. *Revista iberoamericana de fertilidad y Reproducción Humana* 33, 1695-3703.

-Mishra A, Reddy J, Gupta P y Mondal S. 2016. L-carnitine mediated reduction in oxidative stress and alteration in transcript level of antioxidant enzymes in sheep embryos produced *in vitro*. *Reproduction in domestic animals*, 51, 311-321. <https://doi.org/10.1111/rda.12682>.

-Moradi M, Karimi I, Ahmadi S y Mohammed L. 2020. The necessity of antioxidant inclusion in caprine and ovine semen extenders: A systematic review complemented with computational insight. *Reproduction in domestic animals*, 55, 1027-1043. <https://doi.org/10.1111/rda.13754>.

-Najafi A, Kia D, Mehdipour M, Shamsollahi M y Miller D. 2019. Does fennel extract ameliorate oxidative stress frozen-thawed ram sperm? *Cryobiology*, 87, 47-51. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.02.006>

-Natarajan, R, Shankar B y Munuswamy D. 2010. Effect of  $\alpha$ -tocopherol supplementation on *in vitro* maturation of sheep oocytes and *in vitro* development of preimplantation sheep embryos to the blastocyst stage. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 27, 483-490. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9430-7>.

- 
- 
- Nateq S, Moghaddam G, Alijani S y Behnam M. 2020. The effects of different levels of Nano selenium on the quality of frozen-thawed sperm in ram. *Journal of applied animal research*, 48, 434-439. <https://doi.org/10.1080/09712119.2020.1816549>
- Nazari L, Salehpour S, Hosseini S, Allanan F, Jahanmardi F, Azizi E y Hashemi, T. 2020. Effect of antioxidant supplementation containing L-carnitine on semen parameters: a prospective interventional study. *JBRA Assisted reproduction*, 1-5. [Doi:10.5935/1518-0557.20200043](https://doi.org/10.5935/1518-0557.20200043)
- Nery I, Araújo Silva R, Souza H, Arruda L, Monteiro M, Seal C y Câmara D. 2020. Effects of L-carnitine on equine semen quality during liquid storage. *Biopreservation and biobanking*, 18, 403-408. <https://doi.org/10.1089/bio.2020.0025>.
- Nikoloff N, Campagna A, Luchetti C, Carranza-Martín A, Pascua A, Anchordoquy J y Furnus CC. 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. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.028>.
- Nie J, Yan K, Sui L, Zhang H, Zhang H, Yang X y Liang X. 2020. Mogroside V improves *in vitro* maturation of pig oocytes and subsequent embryonic development. *Theriology*, 141, 35-40. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.010>.
- Nimse S y Pal D. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances*, 5, 27986-28006. [Doi: 10.1039/c4ra13315c](https://doi.org/10.1039/c4ra13315c)
- Niu Y, Zhou W, Guo J, Nie Z, Shin K, Kim N y Cui XS. 2017. C-Ficocyanine protects against mitochondrial dysfunction and oxidative stress in partogenetic pig embryos. *Scientific reports*, 7, 1-10. [Doi:10.1038/s41598-017-17287-0](https://doi.org/10.1038/s41598-017-17287-0).
- Nguyen T, Tanihara F, Do L, Sato Y, Taniguchi M, Takagi M y Otoi T. 2017. Chlorogenic acid supplementation during *in vitro* maturation improves maturation, fertilization, and competition from the development of pig oocytes. *Reproduction in domestic animals*, 52, 969-975. <https://doi.org/10.1111/rda.13005>
- Nguyen T, Wittayarat M, Do L, Nguyen TV, Nii M, Namula Z y Otoi T. 2018. Effects of chlorogenic acid supplementation (CGA) during *in vitro* maturation culture on the development and quality of



---

---

porcine embryos with electroporation treatment after *in vitro* fertilization. *Animal science journal*, 89, 1207-1213. <https://doi.org/10.1111/asj.13049>

-Nguyen T, Do L, Somfai T, Otoi T, Taniguchi M y Kikuchi K. 2019. The presence of chlorogenic acid during *in vitro* maturation protects pig oocytes from the negative effects of heat stress. *Animal science journal*, 90, 1530-1536. <https://doi.org/10.1111/asj.13302>

-Zheng M, Tong J, Li W, Chen ZJ, Zhang C. 2018. Melatonin concentration in follicular fluid is correlated with antral follicle count (AFC) and *in vitro* fertilization (IVF) outcomes in women undergoing assisted reproductive technology (ART) procedures. *Gynecology endocrinology*, 34, 446–450. [Doi: 10.1080/09513590.2017.1409713](https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1409713)

-Ochiai A, Kuroda K, Ikemoto Y, Ozaki R, Nakagawa K, Nojiri S, Takeda S, Sugiyama R. 2019. Influence of resveratrol supplementation on IVF-embryo transfer cycle outcomes. *Reproduction biomedical online*, 39, 205–210. [Doi: 10.1016/j.rbmo.2019.03.205](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.03.205).

-Oliva-Trejo J. 2004. Efecto del pH de un extensor de semen porcino sobre la calidad espermática. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

-Paál D, Strejček F, Tvrda E, Formicki G, Klein S, Rath D y Massanyi, P. 2018. The *in vitro* effect of taurine in boar spermatozoa quality. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 66, 131-137. <https://doi.org/10.11118/actaun201866010131>.

-Pandey A y Chaube SK. 2014. A moderate increase of hydrogen peroxide level is beneficial for spontaneous resumption of meiosis from diplotene arrest in rat oocytes cultured *in vitro*. *BioResearch Open Access*, 3, 183-191. <https://doi.org/10.1089/biores.2014.00131>

-Park Y, Lee S, Son Y, Jeong S, Shin M, Kim W y Park S. 2018. Antioxidant  $\beta$ -cryptoxanthin enhances porcine oocyte maturation and subsequent embryo development *in vitro*. *Reproduction, fertility, and development*, 30, 1204-1213. <https://doi.org/10.1071/RD17444>

-Park H, Park S, Kim J, Yang S, Kim M, Jegal H y Koo D. 2018. Melatonin improves oocyte maturation and mitochondrial functions by reducing bisphenol A-derived superoxide in porcine oocytes *in vitro*. *International journal of molecular sciences*, 19,1-19. <https://doi.org/10.3390/ijms19113422>.

- 
- 
- Peña J, Gummow B, Parker A y Paris D. 2019. Antioxidant supplementation mitigates DNA damage in boar (*Sus scrofa domesticus*) spermatozoa induced by tropical summer. PloSone, 14, e021614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216143>.
- Pintus E, Kadlec M, Jovičić M, Sedmíková M y Ros-Santaella J. 2018. Aminoguanidine protects boar spermatozoa against the deleterious effects of oxidative stress. Pharmaceutics, 10,1-14. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040212>.
- Piras A, Menéndez-Blanco I, Soto-Heras S, Catalá M, Izquierdo D, Bogliolo L y Paramio M. 2019. Resveratrol supplementation during *in vitro* maturation improves embryo development of prepubertal goat oocytes selected by brilliant cresyl blue staining. Journal of reproduction and development, 65, 113-120. <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-077>.
- Plusa B y Hadjantonakis A. 2016. Mammalian development: mechanics drives cell differentiation. Nature, 536, 281-283. [Doi: 10.1038/nature18920](https://doi.org/10.1038/nature18920)
- Poniedziałek-Kempny K. 2020. *In vitro* production of porcine embryos: status and possibilities a review. Annals of animal science, 20, 775-796. <https://doi.org/10.2478/aoas-2020-0030>
- Poniedziałek-Kempny K, Gajda B, Rajska I, Gajda L y Smorag Z. 2020. Piglets produced by transfer of embryos obtained by *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro* with thymosin: A case report. Medical weter, 76, 181-185. [Doi: dx.doi.org/10.21521/mw.6356](https://doi.org/10.21521/mw.6356)
- Prasad S, Tiwari M, Pandey A, Shrivastav T y Chaube S. 2016. Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome. Journal of biomedical science, 23, 1-5. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0253-4>
- Qi J, Li X, Diao Y, Liu P, Wang D, Bai C y Sun B. 2020. Asiatic acid supplementation during the *in vitro* culture period improves early embryonic development of porcine embryos produced by parthenogenetic activation, somatic cell nuclear transfer and *in vitro* fertilization. Theriogenology, 142, 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.027>
- Rajabi-Toustani R, Motamedi-Mojdehi R, Mehr A y Motamedi-Mojdehi, R. 2013. Effect of *Papaver rhoeas L.* extract on *in vitro* maturation of sheep oocytes. Small ruminant research, 114, 146-151. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.06.010>

- 
- 
- Ramos P, Nascimento P, Vieira J, Chaves M, Albuquerque K, Ferreira-Silva J y Oliveira M. 2020 . Application of platelet-rich plasma in the *in vitro* production of bovine embryos. *Tropical animal health and production*, 1-6. [doi: 10.1007/s11250-020-02307-5](https://doi.org/10.1007/s11250-020-02307-5).
- Rodick T, Seibels D, Babu J, Huggins K, Ren G y Mathews S. 2018. Potential role of coenzyme Q 10 in health and disease conditions. *Nutrition and dietary supplements*, 1-11. <https://doi.org/10.2147/NDS.S112119>
- Rodríguez-Varela C y Labarta E. 2020. Clinical application of antioxidants to improve human oocyte mitochondrial function: A review. *Antioxidants*, 9, 1197. <https://doi.org/10.3390/antiox9121197>
- Romek M, Gajda B, Krzysztofowicz E, Sucia M, Uzarowska A y Smorag Z. 2017. Improved quality of porcine embryos cultured with hyaluronan due to the modification of the mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species level. *Theriogenology*, 102, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.06.026>
- Ros-Santaella J, Kadlec M y Pintus E. 2020. Pharmacological activity of honeybush (*Cyclopia intermedia*) in boar spermatozoa during semen storage and under oxidative stress. *Animals*, 10, 1-13. <https://doi.org/10.3390/ani10030463>
- Saadah A y Widjiati H. 2020. Moringa Leaf (*Moringa oleifera Lam*) nanoparticle supplementation on zygote cleavage in goat embryo culture *in vitro*. *Indian journal of forensic medicine y toxicology*, 14, 1752-1757. <https://doi.org/10.37506/ijfmt.v14i3.10669>
- Salamone D, Canel N y Rodríguez M. 2017. Intracytoplasmic sperm injection in domestic and wild mammals *Reproductio* , 154 , F111-F124.
- Sánchez B. 2018. Las técnicas de reproducción asistida como herramientas para la conservación de *Panthera onca*. 2-4.
- Santos M, Da Silva A, Praxedes É, Borges A, Teles Filho A, Souza-Junior J y Pereira A. 2019. Antioxidant effects of the essential oil of *Syzygium aromaticum* on bovine epididymal spermatozoa. *Andrology*, 51, 1-8. <https://doi.org/10.1111/and.13448>.

- 
- 
- Sato D, Sakurai K, Monji Y, Kuwayama T y Iwata H. 2013. Supplementation of maturation medium with folic acid affects DNA methylation of porcine oocytes and histone acetylation of early developmental stage embryos. *Journal of mammalian ova research*, 30, 109-116. <https://doi.org/10.1274/jmor.30.109>
- Seifi-Jamadi A, Ahmad E, Ansari M y Kohram H. 2017. Antioxidant effect of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezing capacity of goat semen. *Cryobiology*, 75, 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.03.002>
- Shi L, Jin T, Hu Y, Ma Z, Niu H y Ren Y. 2020. Effects of reduced glutathione on ram sperm parameters, antioxidant status, mitochondrial activity and the abundance of hexose transporters during liquid storage at 5°C. *Small ruminant research*, 189, 106139. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106139>
- Simopoulou M, Gkoles L, Bakas P, Giannelou P, Kalampokas T, Pantos K y Koutsilieris, M. 2016. ICSI improvement: a review from a sperm perspective. *Systems biology in reproductive medicine*, 62, 359–371. [doi: 10.1080/19396368.2016.1229365](https://doi.org/10.1080/19396368.2016.1229365).
- Sirard M, Richard F, Blondin P y Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65, 126-136. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.020>
- Soto-Heras S y Paramio M. 2020. Impact of oxidative stress on oocyte competence for *in vitro* embryo production programs. *Research in veterinary science*, 132, 342-350. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.013>.
- Sovernigo T, Adona P, Monzani P, Guemra S, Barros F, Lopes F y Leal C. 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, 561-569. <https://doi.org/10.1111/rda.12946>.
- Sugiyama M, Kawahara-miki R, Kawana H, Shirasuna K, Kuwayama T y Iwata H. 2015. Resveratrol-induced mitochondrial synthesis and autophagy in oocytes derived from early antral follicles of aged cows. *Journal of reproduction and development*, 4, 251-259. <https://doi.org/10.1262/jrd.2015-001>

- 
- 
- Susilowati S, Triana I, Wurlina W, Arimbi A, Srianto P y Mustofa I. 2019. Addition of L-arginine in skim milk extender maintains goat spermatozoa quality in chilled temperature for five days. *Veterinary world*, 12, 1784. [10.14202 / vetworld.2019.1784-1789](https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1784-1789)
- (a) Swain J. 2019. Controversies in ART: Can the IVF Laboratory Influence preimplantation embryo aneuploidy? *Reproductive biomedicine online*, 39, 599-607. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.06.009>.
- (b) Swain J. 2019. Culture media in IVF: Decisions for the laboratory. *In vitro fertilization, springer, cham*, 105-119. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-43011-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-43011-9_12)
- Tian H, Qi Q, Yan F, Wang C, Hou F, Ren W y Hou J. 2021. Enhancing the developmental competence of prepubertal lamb oocytes by supplementing the *in vitro* maturation medium with sericin and the fibroblast growth factor 2-leukemia inhibitory factor-insulin-like growth factor 1 combination. *Theriogenology*, 159, 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.019>
- Tiwari M, Prasad S, Tripathi A, Pandey A, Singh A, Shrivastav T y Chaube S. 2016. Involvement of reactive oxygen species in meiotic cell cycle regulation and apoptosis in mammalian oocytes. *Reactive oxygen species*, 1, 110-116. <http://dx.doi.org/10.20455/ros.2016.817>
- Torres-Osorio V, Urrego R, Echeverri-Zuluaga J y López-Herrera, A. 2019. Oxidative stress and antioxidant use during *in vitro* mammal embryo production. *Review*, 10, 433-459. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4652>.
- Tvrđá E, Michalko J, Matušiková I y Lukáč N. 2016. *In vitro* effects of the *Chlamydomonas reinhardtii* extract on bovine spermatozoa. *Journal of microbiology, biotechnology, and food sciences*, 6, 972-975. Doi: [10.15414/jmbfs.2016/17.6.3.972-975](https://doi.org/10.15414/jmbfs.2016/17.6.3.972-975)
- Tvrđá E, Straka P, Galbavy D, Ivanič P. 2019. Epicatechin provides antioxidant protection to bovine sperm under induced oxidative stress. *Molecules*, 24, 1-12. <https://doi.org/10.3390/molecules24183226>
- Tvrđá E, Debacker M, Ďuračka M, Kováč J y Bučko O. 2020. Quercetin and naringenin provide functional and antioxidant protection to stored boar semen. *Animals*, 10, 1-16. <https://doi.org/10.3390/ani10101930>
- Tvrđá E, Michalko J, Árvay J, Vuković N, Ivanišová E, Ďuračka M y Kačaniová M. 2020. Characterization of the Omija (*Schisandra chinensis*) Extract and Its effects on the bovine sperm

---

---

vitality and oxidative profile during *in vitro* storage. Evidence-based complementary and alternative medicine, 20, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2020/7123780>

-Valiollahpoor A, Deldar H, Ansari P. 2016. Impact of supplementary royal jelly on *in vitro* maturation of sheep oocytes: genes involved in apoptosis and embryonic development. Systems biology in reproductive medicine 62, 31-38. <https://doi.org/10.3109/19396368.2015.1088102>.

-Vander-Borghet M y Wyns C. 2018. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. Clinical biochemistry, 62, 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>

-Veshkini A, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Ghanem N, Abazari-kia A, Mottaghi E, Kamaledini, R y Gastal E. 2018. Oocyte maturation with royal jelly increases embryo development and reduces apoptosis in goats. Animal reproduction, 15, 124-134. [Doi: 10.21451/1984-3143-2017-AR986](https://doi.org/10.21451/1984-3143-2017-AR986)

-Vessey W, Saifi S, Sharma A, McDonald C, Almeida P, Figueiredo M y Jayasena C. 2021. Baseline levels of seminal reactive oxygen species predict improvements in sperm function following antioxidant therapy in men with infertility. Clinical endocrinology, 94, 102-110. <https://doi.org/10.1111/cen.14328>

-Vichas L, Tsakmakidis I, Vafiadis D, Tsousis G, Malama E y Boscos C. 2018. The effect of antioxidant agents' addition and freezing method on quality parameters of frozen thawed ram semen. Cell and tissue banking, 19, 113-121. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9633-6>

-Wang F, Tian X, Zhang L, He C, Ji P, Li Y y Liu G. 2014. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. Fertility and sterility, 101, 577-586. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.10.041>

-Will M, Clark N y Swain J. 2011. Biological pH buffers in IVF: help or hindrance to success? Journal of assisted reproduction and genetics, 28, 711-724. [Doi: 10.1007/s10815-011-9582-0](https://doi.org/10.1007/s10815-011-9582-0)

-Wong H, Villanueva J, Cress A y Duleba A. 2010. Effects of resveratrol on proliferation and apoptosis in rat ovarian theca-interstitial cells. Molecular human reproduction, 16, 251-259. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq002>

-Wu G, Jia B, Li J, Fu X, Zhou G, Hou Y y Zhu S. 2011. L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs. Theriogenology, 76, 785-793. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.04.011>

- 
- 
- Yoon J, Lee S, Park Y, Kim W, Park H, Park C y Kim E. 2020. The antioxidant icariin protects porcine oocytes from age-related damage *in vitro*. Asian-australasian journal of animal sciences. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0046>.
- Yu X, Liu Y, Liu X, Wang P, Liu S, Miao J y Yang C. 2018. Ascorbic acid induces global epigenetic reprogramming to promote meiotic maturation and developmental competence of porcine oocytes. Scientific reports, 8, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24395-y>
- Yuan Y y Krisher R. 2010. Effect of ammonium during *in vitro* maturation on oocyte nuclear maturation and subsequent embryonic development in pigs. Animal reproduction science 117, 302-307. [Doi:10.1038/s41598-018-24395-y](https://doi.org/10.1038/s41598-018-24395-y).
- Yuan B, Liang S, Kwon J, Jin Y, Park S, Wang H, y Kim N. 2016. The role of glucose metabolism on porcine oocyte cytoplasmic maturation and its possible mechanisms. PloSone, 11, e0168329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168329>
- Zabihi A, Shabankareh K, Hajarian H y Foroutanifar, S. 2019. Resveratrol addition to *in vitro* maturation and *in vitro* culture media enhances developmental competence of sheep embryos. Domestic animal endocrinology, 68, 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2018.12.010>.
- Zacchini F, Toschi P y Ptak G. 2017. Cobalamin supplementation during *in vitro* maturation improves developmental competence of sheep oocytes. Theriogenology, 93, 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.035>
- Zamiri M 2020. Update on semen cryopreservation in sheep and goats: A review. Journal of livestock science and technologies, 8, 1-15. [10.22103 / JLST.2020.15927.1321](https://doi.org/10.22103/JLST.2020.15927.1321).
- Zhang H, Wu B, Liu H, Qiu M, Liu J, Zhang Y y Quan F. 2013. Improving development of cloned goat embryos by supplementing  $\alpha$ -lipoic acid to oocyte *in vitro* maturation medium. Theriogenology, 80, 228-233. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.03.027>
- Zhang J, Jiang Y, Lin T, Kang J, Lee JE y Jin DI. 2015. Lysophosphatidic acid improves porcine oocyte maturation and embryo development *in vitro*. Molecular Reproduction Development 82, 66–77. <https://doi.org/10.1002/mrd.22447>

---

-Zhou H, McKiernan S, Ji W y Bavister B. 2000. Effect of antibiotics on the *in vitro* development of hamster pronucleated eggs. Therinology, 54, 999-1006. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00408-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00408-8)

-Zhu J, Moawad R, Wang Y, Li F, RenY y Dai F. 2018. Advances in *in vitro* production of sheep embryos. International journal of veterinary science and medicine, 6, 15-26. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.02.003>.