



Efecto de la suplementación de α -tocoferol en la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos sobre el desarrollo embrionario

Effect of α -tocopherol supplementation during *in vitro* maturation of oocytes on bovine embryonic development

Acosta-Pérez, T.P.^{1*}  , Quezada-Casasola, A.¹⁺  , Itzá-Ortiz, M.F.¹  , Beristain-Ruiz, D.M.¹  , Aréchiga-Flores, C.F.²  , Carrera-Chávez, J.M.^{1*} 

¹ Departamento de Ciencias Veterinarias. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Av. Plutarco Elías Calles 1210, Fovissste Chamizal, C.P. 32310, Ciudad Juárez, Chihuahua, México.

² Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Zacatecas, Carretera Zacatecas-Fresnillo Km. 31.5, C.P. 98575, El Cordovel, General Enrique Estrada, Zacatecas, México.

* Estos autores contribuyeron igualmente a este trabajo



Please cite this article as/Como citar este artículo: Acosta-Pérez, T.P., Quezada-Casasola, A., Itzá-Ortiz, M.F., Beristain-Ruiz, D.M., Aréchiga-Flores, C.F., Carrera-Chávez, J.M. (2025). Effect of α -tocopherol supplementation during *in vitro* maturation of oocytes on bovine embryonic development. Revista Bio Ciencias, 12, e1732. <https://doi.org/10.15741/revbio.12.e1732>

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: August 22th 2024.

Accepted/Aceptado: August 11th 2025.

Available on line/Publicado: August 25th 2025.

RESUMEN

La maduración *in vitro* de ovocitos es un proceso crucial para la producción *in vitro* de embriones, tecnología que aún presenta desafíos para alcanzar su potencial, entre ellos el estrés oxidativo. El objetivo fue evaluar la adición de α -tocoferol (vitamina E) en la maduración *in vitro* de ovocitos y en el desarrollo embrionario subsecuente. Se utilizaron 1,019 ovocitos bovinos, clasificados como de alta y baja calidad, suplementados con etanol y α -tocoferol a 100, 200, y 400 μ M/mL durante la maduración *in vitro*, midiendo las tasas de expansión de cúmulos de los ovocitos, escisión, blastulación y expansión del blastocito. La maduración fue mayor en ovocitos de alta calidad ($p < 0.01$). La tasa de escisión y el porcentaje de blastocitos expandidos fueron superiores en embriones de ovocitos de alta calidad (HQOE) adicionados con 400 μ L ($p < 0.05$). La tasa de blastulación fue menor en HQOE adicionados con etanol y 100 μ M/mL ($p < 0.05$). En conclusión, los ovocitos de alta calidad exhibieron mayores tasas de maduración y desarrollo embrionario en comparación a los de baja calidad. El α -tocoferol a 400 μ M/mL incrementó la tasa de escisión y de blastocitos expandidos en HQOE. El etanol redujo la blastulación de HQOE, efecto que fue disminuido por la adición de 200 y 400 μ M/mL de α -tocoferol.

PALABRAS CLAVE: Vitamina E, estrés oxidativo, expansión de cúmulos, escisión de embriones, blastocito.

*Corresponding Author:

José María Carrera-Chávez. Departamento de Ciencias Veterinarias. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Av. Plutarco Elías Calles 1210, Fovissste Chamizal, C.P. 32310, Ciudad Juárez, Chihuahua, México. Telefono: (656) 688 1800.

E-mail: jose.carrera@uacj.mx

ABSTRACT

In vitro maturation of oocytes is a crucial process for *in vitro* production of embryos, a technology that still presents challenges to reach its full potential, including oxidative stress. The objective was to evaluate the addition of α-tocopherol (vitamin E) during *in vitro* oocyte maturation and its subsequent effect on embryo development. A total of 1,019 bovine oocytes were used, classified as high and low quality, supplemented with ethanol and α-tocopherol at 100, 200, and 400 μM/mL during *in vitro* maturation, measuring rates of cumulus cell expansion, cleavage, blastulation, and blastocyst expansion. Maturation was higher in high-quality oocytes ($p < 0.01$). Cleavage rate and percentage of expanded blastocysts were higher in embryos from high-quality oocytes (HQOE) supplemented with 400 μM/mL ($p < 0.05$). Blastulation rate was lower in HQOE supplemented with ethanol and 100 μM/mL ($p < 0.05$). In conclusion, high-quality oocytes exhibited higher maturation and embryo development rates compared to low-quality ones. α-tocopherol at 400 μM/mL increased cleavage and expanded blastocyst rates in HQOE. Ethanol reduced blastulation in HQOE, an effect that was diminished by the addition of 200 and 400 μM/mL of α-tocopherol.

KEY WORDS: Vitamin E, oxidative stress, cumulus expansion, embryo cleavage, blastocyst.

Introducción

La capacidad de generar grandes cantidades de embriones bovinos mediante producción *in vitro* (IVP) a un costo relativamente bajo, utilizando ovarios obtenidos en rastro, ha sido un enorme beneficio para los programas modernos de mejoramiento genético del ganado (Nogueira da Costa *et al.*, 2015). Sin embargo, aún existen desafíos importantes asociados con dicha tecnología que giran en torno a la calidad de los ovocitos y el posterior desarrollo del embrión, así, aunque la producción *in vitro* de embriones a nivel mundial ha ido incrementándose cada año, aún existe un gran porcentaje (hasta el 75 %) de ovocitos que son extraídos del entorno folicular y que no alcanzan las condiciones necesarias para ser fertilizados correctamente y producir embriones de buena calidad (Krisher & Herrick, 2024). Técnicamente, la IVP de embriones bovinos, es un proceso de tres pasos que incluye la maduración de los ovocitos, la fertilización y el cultivo de los embriones hasta la etapa de blastocito (Lonergan & Fair, 2014). En ese marco, la maduración de los ovocitos mediante técnicas *in vitro* es un complejo proceso bioquímico y estructural durante el cual el gameto femenino adquiere la capacidad de ser fecundado, proceso crucial para mantener un adecuado

desarrollo del embrión hasta la etapa de blastocito, y el posible desarrollo de un becerro vivo (Nogueira da Costa et al., 2015).

Uno de los principales inconvenientes de la maduración *in vitro* de ovocitos (IVM) es la falta o función inadecuada de los antioxidantes y la presencia de una alta concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS), que, en condiciones fisiológicas normales, participan en procesos de señalización que contribuyen al desarrollo y funcionamiento normal de las células (Khan et al., 2017). Sin embargo, las ROS son moléculas oxidantes que pueden alterar estructuralmente muchas moléculas, provocando un mal funcionamiento celular y un envejecimiento prematuro y se consideran en parte responsables de la baja eficiencia de los sistemas de producción de embriones bovinos *in vitro* (Chowdhury et al., 2017; Khan et al., 2017). En condiciones convencionales de IVP, los ovocitos y los embriones enfrentan estrés oxidativo, ya que el proceso implica exposición a la luz, concentraciones elevadas de oxígeno y concentraciones alteradas de sustratos metabólicos (Remião et al., 2016; Rocha-Frigoni et al., 2016). Si no se eliminan de las células de manera rápida y eficaz, las ROS pueden dañar una amplia gama de macromoléculas, lo que puede provocar la muerte celular. Por lo tanto, las ROS deben inactivarse continuamente para mantener niveles fisiológicamente tolerables que desempeñan un papel normal en las funciones celulares (Jeong et al., 2006; Schoots et al., 2018).

Una alternativa viable a este problema es la adición de compuestos antioxidantes al medio de maduración *in vitro*. Se ha informado que la adición de antioxidantes al medio de maduración disminuye los niveles de ROS y aumenta la producción de blastocitos (Remião et al., 2016). La vitamina E, un antioxidante no proteico y soluble en lípidos presentes en las células animales, se considera un importante eliminador de ROS. Específicamente, se ha informado que la vitamina E aumenta la tasa de desarrollo de embriones producidos *in vitro* al suprimir el daño de la membrana celular causado por un exceso de ROS (Zhang et al., 2012). Su forma activa homóloga, el α-tocoferol, protege las membranas celulares de la oxidación al reaccionar con ROS y radicales lipídicos producidos en la peroxidación lipídica (Dalvit et al., 2005). Esto se logra mediante el grupo hidroxilo en la molécula del anillo aromático, que interrumpe las reacciones en cadena de los radicales y captura los radicales libres (Engin, 2009). Si bien el efecto del α-tocoferol durante el proceso de criopreservación de los espermatozoides está bien establecido, siendo un conocido protector de membrana que inhibe la peroxidación lipídica y elimina los radicales derivados de lípidos (de Vasconcelos et al., 2016; Jiménez-Aguilar et al., 2021), su efecto sobre la capacidad de fertilización de los ovocitos después de la maduración y su desarrollo embrionario posterior no está lo suficientemente claro (Vijayalakshmi et al., 2020; Azam et al., 2024). Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la adición de α-tocoferol al medio de maduración *in vitro* sobre la tasa de maduración de los ovocitos y su posterior desarrollo embrionario.

Material y Métodos

Colección de ovarios, recuperación y clasificación de complejos ovocito-cúmulo

Se recolectaron ovarios de vacas Holstein Friesian no gestantes, con historial de ≥ 4 partos, en condición corporal ≥ 2.5 y ≤ 3 (Angel & Mahendran, 2024) sacrificadas en el rastro local de Ciudad Juárez, México, de acuerdo con las pautas nacionales para el trato humano en el movimiento de animales (Norma Oficial Mexicana NOM-051-ZOO-1995) y el sacrificio humanitario de animales domésticos y salvajes (Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014). Sólo se seleccionaron ovarios que no mostraron ninguna estructura patológica aparente. Dichos ovarios fueron enjuagados dos veces, colocados en solución salina al 0.9 % a una temperatura de 37 °C y transportados al laboratorio dentro de las 2 h posteriores a la recolección; se procesaron 20 ovarios por cada sesión de colección. Se puncionaron todos los folículos de 2 a 8 mm de diámetro de cada ovario, utilizando una jeringa de 10 mL con una aguja calibre 18, y el líquido folicular resultante se colocó en tubos de 50 mL previamente calentados, conteniendo 10 µL de heparina (5,000 UI/mL, Inhepar, PiSA Farmacéutica, México). En dichos tubos los complejos ovocito-cúmulo (COC) se dejaron sedimentar durante 10 min. Una vez transcurrido este tiempo, se recolectaron los COC y se lavaron cuatro veces en medio de lavado que contenía 600 µL de medio TCM-199 (M4530, Sigma-Aldrich, Alemania), 0.5 µL/mL de FSH (500 UI; Laboratorios Calier, Argentina), 5 % de suero fetal bovino (SFB, F4135, Sigma-Aldrich, Alemania) y 50 µL/mL de gentamicina (80 mg/mL; Rayere Pharmaceuticals, México). Se colectaron un total de 1,019 COC.

Después del lavado, los COC se clasificaron visualmente para formar dos grupos según la homogeneidad de su citoplasma y el número de capas de células del cúmulo circundante: grupo ovocitos de alta calidad, correspondiente a COC con categorías de puntuación de 1 y 2; y grupo ovocitos de baja calidad, correspondiente a COC con categorías de puntuación de 3 y 4 (Figura 1). Las categorías se establecieron acorde a la clasificación realizada por Stojkovic *et al.* (2001).

Maduración *in vitro*

Los medios de maduración se equilibraron en una atmósfera con 5 % de CO₂ por 2 h antes de la asignación de los tratamientos experimentales. Los COC de ambos grupos de calidad se colocaron en medios de maduración a una densidad de 50 estructuras por 500 µL y se asignaron a uno de 5 tratamientos experimentales: tratamiento Control (COC alta calidad, n = 105; COC baja calidad, n = 43), consistente en medio de maduración comercial BO-IVM (71001, IVF Bioscience, Reino Unido); tratamiento Etanol (n = 159; COC alta calidad, n = 100; COC baja calidad, n = 59), consistente en medio de maduración convencional (medio TCM-199 adicionado con 5 % SFB, 10 % de líquido folicular, 0.2 % de piruvato de sodio (Gibco, Estados Unidos) y 50 µg/mL de gentamicina) adicionado con 0.1 % (v/v) de etanol al 90 % (Hycel, México); tratamiento 100 µM (n = 261; COC alta calidad, n = 185; COC baja calidad, n = 76), consistente en medio de maduración convencional adicionado con 100 µM de α-tocoferol (T3251,

Sigma Aldrich, Alemania); tratamiento 200 μM ($n = 233$; COC alta calidad, $n = 154$; COC baja calidad, $n = 79$), consistente en medio de maduración convencional adicionado con 200 μM de α -tocoferol; y tratamiento 400 μM ($n = 218$; COC alta calidad, $n = 161$; COC baja calidad, $n = 57$) consistente en medio de maduración convencional adicionado con 400 μM de α -tocoferol. Las concentraciones de α -tocoferol utilizadas en el presente estudio fueron seleccionadas de acuerdo con los resultados obtenidos en experimentos consultados previamente (Naspinska *et al.*, 2023; Tripathi *et al.*, 2023).

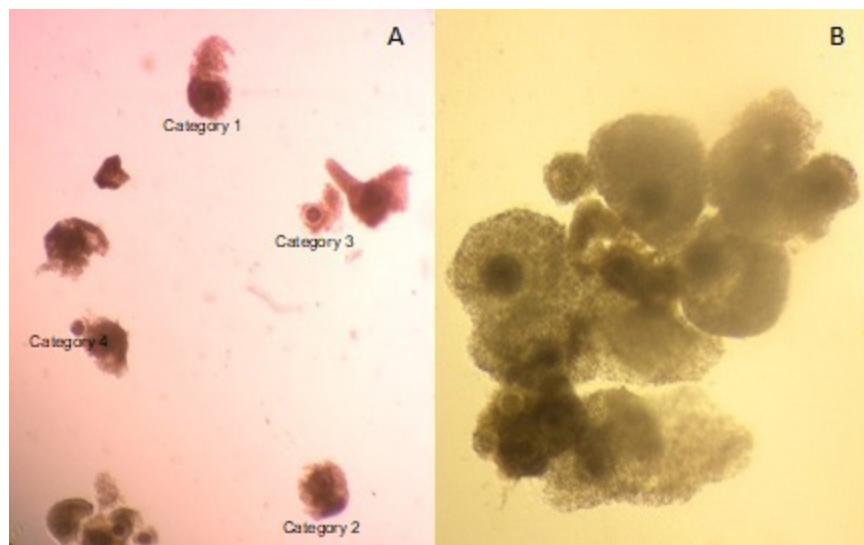


Figura 1. A. Características morfológicas de los complejos ovocito-cúmulo utilizados para su clasificación en categorías de calidad. B. Ovocitos maduros después de 22 horas de incubación. Basado en Stojkovic *et al.* (2001).

Categoría 1, citoplasma homogéneo, cúmulo compacto y con varias capas de células del cúmulo; Categoría 2, citoplasma con solo algunas pigmentaciones irregulares, cúmulo más pequeño que en la categoría 1; Categoría 3, citoplasma heterogéneo o con vacuolas, cubierto por pocas capas de células del cúmulo con áreas pequeñas desnudas; Categoría 4, citoplasma con pigmentación heterogénea, cúmulo completamente ausente o en gran parte ausente.

Los COC fueron madurados a 38.5 °C en 5 % de CO₂ con aire atmosférico humidificado (21 % O₂) durante 22 h. La maduración de los ovocitos se evaluó mediante la observación de la expansión de las células del cúmulo (Figura 1; Zhang *et al.*, 2010; Caixeta *et al.*, 2013).

Fertilización *in vitro*

Después de la maduración, los COC de cada grupo se lavaron una vez en medio de fertilización comercial tibio (BO-IVF, IVF Bioscience, Reino Unido) y se transfirieron a 200 µL de BO-IVF (pre-equilibrado en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂, por 2 h). Se descongelaron pajillas de semen congelado de dos toros con fertilidad previamente comprobada a 37 °C durante 30 a 40 segundos. Después de la descongelación, se evaluó la motilidad de los espermatozoides utilizando un sistema de evaluación de semen asistido por computadora (AndroVision, Minitube, Alemania). El semen descongelado y evaluado se lavó dos veces mediante centrifugación a 328 g durante 5 minutos en 4 mL de medio de capacitación comercial (BO-Semen Prep, IVF Bioscience, Reino Unido) a 37 °C. El sobrenadante se eliminó en ambas ocasiones, quedando aproximadamente 250 µL de suspensión de semen, y una vez hecho esto, se eliminó el sobrenadante y se reconstituyó el sedimento de espermatozoides agregando 100 µL de medio de fertilización previamente precalentado.

Los COC de cada tratamiento fueron inseminados con el volumen correspondiente de la solución final de semen, para obtener una concentración final de espermatozoides de 2 x 10⁶ células/mL en la gota de medio de fertilización correspondiente. Los espermatozoides se incubaron conjuntamente con los ovocitos maduros durante 18 h a 38.5 °C en 5 % de CO₂ en una atmósfera humidificada (21 % O₂).

Cultivo *in vitro* y evaluación del desarrollo embrionario

Los cigotos se transfirieron del medio de fertilización al medio de lavado (BO-Wash, IVF Bioscience, Reino Unido) previamente calentado y se desnudaron usando un agitador vórtex (Barnstead International, Estados Unidos) durante 90 segundos. Posteriormente, las estructuras desnudas se lavaron en medio de lavado, se enjuagaron en medio de cultivo (BO-IVC, IVF Bioscience, Reino Unido) y se cultivaron en 200 µL de medio de cultivo cubiertos con una capa de aceite mineral (BO-Oil, IVF Bioscience, Reino Unido) en una atmósfera humidificada que contenía 88 % de N₂, 6 % de CO₂ y 6 % O₂ a 38.5 °C durante 7 días. Se consideró que los embriones alcanzaron la etapa de escisión (clivaje) cuando se observaron al menos dos células en una sola estructura, aproximadamente 48 h después de la fertilización; la etapa de blastulación cuando se observó una cavidad clara (blastocoele) dentro de la zona pelúcida, aproximadamente el día 6 después de la fertilización; y la etapa de expansión cuando se observó un aumento en el diámetro que resultó en un adelgazamiento de la zona pelúcida (aproximadamente 7 a 8 d después de la fertilización) (Peippo *et al.*, 2011).

Análisis estadístico

Las proporciones de datos categóricos de ovocitos maduros (ovocitos con células del cúmulo expandido del total de estructuras utilizadas en cada grupo), escisión embrionaria (número de embriones con una división celular inicial del total de estructuras fertilizadas en cada grupo), blastulación (número de blastocitos formado a partir de embriones escindidos en cada grupo);

y la expansión de blastocitos (número de blastocitos expandidos sobre el total de embriones escindidos en cada grupo) se analizaron mediante el procedimiento LOGISTIC con un modelo bifactorial que incluyó los tratamientos experimentales (α -tocoferol a 100, 200 y 400 $\mu\text{M}/\text{mL}$) y las clasificaciones de calidad de los ovocitos (alta y baja) como efectos principales, así como su interacción. El análisis estadístico se realizó utilizando el software SAS (9.0; Statistical Analysis System Institute Inc., Estados Unidos). Cuando no se observó interacción entre estos factores ($p \geq 0.05$), se ajustó el modelo y solo se consideraron los efectos principales. Los resultados se consideraron estadísticamente diferentes cuando $p < 0.05$.

Resultados y Discusión

En el presente estudio se obtuvieron 1,019 ovocitos de 63 vacas (en promedio 16.1 ovocitos por vaca y 8.1 ovocitos por ovario). No se detectaron efectos de interacción entre los tratamientos y la clasificación de la calidad de los ovocitos en las variables evaluadas, incluyendo la maduración ovocitaria, la escisión embrionaria, la blastulación y la expansión del blastocito ($p = 0.29, 0.22, 0.26$ y 0.78 , respectivamente). Las tasas de maduración de ovocitos entre tratamientos y grados de calidad se resumen en la Tabla 1. Específicamente, en los ovocitos de alta calidad, la tasa de maduración no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0.88$), independientemente del nivel de suplementación con α -tocoferol. Se conoce que el α -tocoferol está presente en las células animales, protegiéndolas de la oxidación al reaccionar con las ROS y radicales lipídicos que se producen durante la peroxidación lipídica, evitando reacciones en cadena de radicales y aportando su propiedad antioxidante (Engin, 2009; Takahashi, 2012). Sin embargo, se ha reportado que, en la IVP de embriones bovinos, la cantidad de α -tocoferol presente en los COC se reduce a cerca del 50 %, lo que indica una pérdida parcial de la capacidad antioxidante durante el proceso (Dalvit *et al.*, 2005). Ante esto, los investigadores han considerado adicionar α -tocoferol como un eliminador de ROS y ha sido utilizado en diferentes estudios para determinar sus efectos en la IVP de embriones. Vásquez *et al.* (2014) agregaron α -tocoferol a una concentración de 100 μM al medio de maduración y evaluaron su efecto posterior sobre la producción de ROS en el medio de cultivo, reportando que en el medio tratado con α -tocoferol, la producción de ROS disminuyó en comparación con el medio Control (sin α -tocoferol). En este sentido, Vijayalakshmi *et al.* (2020) reportaron que la adición de 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (23 μM) incrementó la tasa de maduración citoplasmática y nuclear de ovocitos de búfala, aunque la adición de 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (46 μM) no presentó diferencia con el tratamiento control; los autores atribuyen el efecto benéfico en la maduración a la protección del ADN y de los ácidos grasos poliinsaturados presente en la membrana plasmática, aunque autores como Azam *et al.* (2024) reportan que la adición de diversas concentraciones de α -tocoferol (50-300 μM) en combinación con ácido α -linoleico (100 μM) en la maduración del ovocito y posterior desarrollo embrionario en búfalas no tuvo ningún efecto, indicando que esto puede ser debido a que los ovocitos seleccionados tuvieron calidad suficiente para hacer frente al estrés oxidativo. Sin embargo, en el presente estudio los ovocitos de baja calidad tratados con 400 μM de α -tocoferol presentaron una menor tasa de maduración, en comparación con los grupos de 100 μM , 200 μM , Control y Etanol ($p = 0.02$). Estos resultados coinciden con lo obtenido anteriormente (Wang *et al.*, 2002; Acosta-Pérez, 2020), en donde se reportan que altas concentraciones de α -tocoferol pueden producir citotoxicidad a los ovocitos y

reducir la maduración y desarrollo de los mismos. Sin embargo, esta tendencia no se observó durante la escisión, la blastulación o la expansión del blastocito.

Tabla 1. Expansión del cúmulo de ovocitos bovinos de alta (categorías 1 y 2) y baja calidad (categorías 3 y 4)* tratados con diferentes concentraciones de α-tocoferol durante la maduración *in vitro*.

Tratamiento	Grados de calidad de los ovocitos	
	Alta calidad (%)	Baja calidad (%)
100 μM	173/185 (93.5) ^{Aa}	60/76 (78.9) ^{Ab}
200 μM	145/154 (94.2) ^{Aa}	52/79 (65.8) ^{Ab}
400 μM	151/161 (93.8) ^{Aa}	30/57 (52.6) ^{Bb}
Control	101/105 (96.2) ^{Aa}	32/43 (74.4) ^{Ab}
Etanol	93/100 (93.0) ^{Aa}	40/59 (67.8) ^{Ab}
Total	663/705 (94.0)	214/314 (68.1)

* Clasificación de las categorías según Stojkovic *et al.* (2001).

A, B Letras diferentes en la misma columna indican diferencia ($p < 0.05$)

a, b Letras diferentes en la misma fila indican diferencia ($p < 0.01$)

Al comparar los ovocitos según su grado de calidad, se observó que los ovocitos de alta calidad presentaron tasas de maduración significativamente superiores en comparación con los ovocitos de baja calidad en todos los tratamientos experimentales ($p < 0.01$). En este sentido, otros autores (Krisher & Herrick, 2024) coinciden con estos resultados, ya que concluyen que los ovocitos de calidad 1 y 2 son más aptos para la maduración y por tanto tienen más capacidad de ser fecundados, ya que los ovocitos de calidad 3 y 4 no son aptos ni recomendados para este proceso (Azam *et al.*, 2024). Varios autores (Farghaly *et al.*, 2015; Kala *et al.*, 2017) mencionan que se ha detectado actividad de enzimas antioxidantes en ovocitos bovinos y células del cúmulo, lo que sugiere que los ovocitos de calidad 1 y 2 tienen más probabilidades de regular los niveles de ROS durante la maduración *in vitro* debido a su mayor número de células circundantes. Esto podría proporcionarles un efecto antioxidante adicional, ya que en las células del cúmulo existe una relación entre la concentración de un sistema antioxidante, y el mantenimiento y la regulación del estado redox del tiol de la célula, protegiendo al ovocito del daño oxidativo al eliminar los ROS (Deleuze & Goudet, 2010). Por otro lado, el exceso de radicales libres, por ejemplo, debido a estrés calórico o al manejo inherente a la IVP, se asocia a pobre calidad ovocitaria y arresto meiótico (Fabra *et al.*, 2020; Rakha *et al.*, 2022), lo que también explica por qué en el presente estudio la

adicción de α -tocoferol en ovocitos de mala calidad no incrementó la tasa de maduración de los mismos. No obstante, aunque se indica que se necesita una gran cantidad de células del cúmulo para lograr un alto porcentaje de maduración meiótica en los ovocitos, la actividad metabólica del ovocito sería responsable de su propia producción y control de ROS, por lo que las células del cúmulo no son las únicas responsables de desempeñar un papel protector contra el daño oxidativo causado por factores externos, y que si bien la mayoría de las unidades enzimáticas antioxidantes del ovocito y sus células circundantes dependen de la acumulación, los ovocitos desnudos también tienen sus propios mecanismos para prevenir el deterioro por efecto de las ROS (Cetica et al., 2001). Esto podría explicar por qué, en el presente estudio, algunos ovocitos desnudos (calidad 3 o incluso 4) son capaces de alcanzar la maduración, aunque en menor medida que los de calidad 1 o 2.

Basado en los resultados obtenidos por otros autores (Remião et al., 2016), se podría esperar que, además de las características de los ovocitos de grado 1 y 2, que cumplían con los requisitos morfológicos para su completo desarrollo *in vitro*, la adición de cualquier concentración de α -tocoferol proporcionaría beneficios adicionales a los ovocitos hasta alcanzar la etapa de blastocito. Esta idea se basa en la noción de que el efecto antioxidante del α -tocoferol protegería a los ovocitos y embriones durante todo el proceso, reduciendo los efectos negativos y la producción de ROS durante la manipulación, exposición a la luz y diferentes concentraciones de oxígeno (Reis et al., 2003).

La Tabla 2 presenta la comparación de las tasas de desarrollo embrionario después de la fertilización, considerando los diferentes tratamientos y la clasificación de calidad de los ovocitos. Los resultados indican que los HQOE tratados con 400 μM de α -tocoferol exhibieron una tasa de escisión más alta que los de los tratamientos 100 μM , 200 μM , Control y Etanol ($p < 0.01$), lo que coincide con lo reportado por Reis et al. (2003), quienes reportaron un efecto positivo de la adición de α -tocoferol al suero fetal bovino sobre la viabilidad de los blastocitos y con Vijayalakshmi et al. (2020), aunque estos últimos utilizaron una concentración más baja en ovocitos de búfala. Similarmente, un estudio realizado con embriones porcinos demostró que la adición de 100 μM de α -tocoferol durante todo el período de cultivo o 48 h después del inicio del período de cultivo produjo un mayor porcentaje de blastocitos en comparación con el control y los grupos con α -tocoferol añadido 96 o 120 h después del inicio del período de cultivo (Hossein et al., 2007). Otro estudio realizado con embriones porcinos adicionados con 0, 50, 100 y 200 μM de α -tocoferol obtuvo un mayor porcentaje de blastocitos en el grupo de 50 μM y 100 μM en comparación con el grupo control y el grupo de 200 μM (Jeong et al., 2006). Además, estos autores reportaron un aumento significativo en el número de células de masa celular, células de trofectodermo y células totales en los embriones tratados con 100 μM de α -tocoferol en comparación con el grupo control, teorizando que el efecto positivo de la adición de α -tocoferol es consecuencia de un efecto antiapoptótico, disminuyendo el índice de apoptosis (Jeong et al., 2006).

Tabla 2. Desarrollo embrionario de ovocitos bovinos con diferentes grados de calidad tratados con α-tocoferol durante la maduración *in vitro*.

Tratamiento	Segmentación		Blastulación		Expansión de blastocitos	
	Grado de calidad de los ovocitos					
100 μM	1 and 2 (%) 54/185 (29.2) ^{Ba}	3 and 4 (%) 17/76 (22.4) ^{Aa}	1 and 2 (%) 39/54 (72.2) ^{Ba}	3 and 4 (%) 2/17 (11.8) ^{Ab}	1 and 2 (%) 7/54 (13.0) ^{Ba}	3 and 4 (%) 0/17 (0.0) ^{Aa}
200 μM	48/154 (31.2) ^{Ba}	22/79 (27.8) ^{Aa}	42/48 (87.5) ^{Aa}	6/22 (27.3) ^{Ab}	4/48 (8.3) ^{Ba}	0/22 (0.0) ^{Aa}
400 μM	81/161 (50.3) ^{Aa}	13/57 (22.8) ^{Ab}	67/81 (82.7) ^{Aa}	1/13 (7.7) ^{Ab}	40/81 (49.4) ^{Aa}	0/13 (0.0) ^{Ab}
Control	37/105 (35.2) ^{Ba}	11/43 (25.6) ^{Aa}	35/37 (94.6) ^{Aa}	6/11 (54.5) ^{Ab}	3/37 (8.1) ^{Ba}	0/11 (0.0) ^{Aa}
Etanol	38/100 (38.0) ^{Ba}	16/59 (27.1) ^{Aa}	27/38 (71.1) ^{Ba}	5/16 (31.3) ^{Ab}	4/38 (10.5) ^{Ba}	0/16 (0.0) ^{Aa}
Total	258/705 (36.5)	79/314 (25.1)	210/258 (81.3)	20/79 (25.3)	58/258 (22.4)	0/79 (0.0)

A, B Letras diferentes en la misma columna indican diferencia ($p < 0.05$)

a, b Letras diferentes en la misma fila indican diferencia bajo el mismo estadio de desarrollo ($p < 0.01$)

En relación a los embriones originados con ovocitos de baja calidad (LQOE), estos mostraron porcentajes de escisión similares independientemente de la concentración de α-tocoferol adicionado ($p = 0.92$). Las comparaciones entre los grados de calidad de los ovocitos bajo el mismo nivel de adición de α-tocoferol, mostraron diferencias solo en el grupo de adicionado con 400 μM, en el que los HQOE tuvieron tasas de escisión más altas que los LQOE ($p < 0.01$). Todas las demás comparaciones de tasas de escisión en relación al grado de calidad bajo el mismo tratamiento fueron similares (grupo 100 μM, $p = 0.26$; grupo 200 μM, $p = 0.6$; grupo Control, $p = 0.25$ y grupo Etanol, $p = 0.16$). Esto puede indicar que esta concentración (400 μM de α-tocoferol) proporciona suficiente actividad antioxidante para mejorar los niveles de antioxidantes requeridos en la mitosis embrionaria. Sin embargo, este efecto entre tratamientos no se observa durante la etapa de blastulación, probablemente porque el efecto antioxidante tuvo lugar durante el proceso de maduración y las estructuras que no presentaron división celular fueron excluidas del experimento, además de que las ROS producidas durante el proceso de maduración *in vitro* sobrepasan la capacidad antioxidante de los ovocitos de mala calidad, afectando su calidad y capacidad de desarrollo (Azam *et al.*, 2024).

En los HQOE, la tasa de blastulación fue mayor en los grupos de 200 μM, 400 μM y Control que en los grupos de 100 μM y Etanol ($p = 0.02$). Por otro lado, en los LQOE se observaron tasas de blastulación similares en todos los grupos ($p = 0.06$), semejante a lo reportado por Tripathi *et al.* (2023), quienes incluso reportan que el número de células del blastocito se incrementa, relacionándolo con la reducción en la cantidad de ROS causado por la adición del antioxidante.

Las comparaciones entre los grados de calidad de los ovocitos bajo el mismo tratamiento mostraron tasas de blastulación más altas en los HQOE, en comparación con los LQOE en todos los tratamientos ($p < 0.01$; Tabla 2). Como previamente se señaló, los ovocitos con puntajes de calidad de 3 y 4 (baja calidad) tienen menos probabilidades de obtener un desarrollo embrionario completo (Marei *et al.*, 2014); los hallazgos del presente estudio indican que la suplementación con α -tocoferol en las concentraciones evaluadas durante la maduración ovocitaria no generó efectos citotóxicos sobre la formación y el desarrollo embrionario.

En HQOE, la tasa de expansión del blastocito fue mayor cuando fueron tratados con 400 μM de α -tocoferol, en comparación con 100 μM , 200 μM , Control y Etanol ($p < 0.01$). Otros investigadores han adicionado el mismo antioxidante (Olson *et al.*, 2000), reportando que una mayor proporción de cigotos se desarrollaron a blastocitos expandidos cuando al medio de cultivo se le añadió 100 μM de vitamina E (el α -tocoferol es una forma específica de la vitamina E), en comparación con su grupo control. Esta etapa de desarrollo de los blastocitos se caracteriza por una gran actividad metabólica de los factores de transcripción, cuya síntesis y producción se sabe que son altamente sensibles al estrés oxidativo del entorno en el que se encuentra el embrión (Kimura *et al.*, 2004). Aunque en el presente estudio, basándose en que previamente se ha reportado que concentraciones mayores podrían producir citotoxicidad, no se utilizó una concentración mayor a 400, es posible suponer que esta cantidad de α -tocoferol utilizada en el presente experimento disminuyó el estrés oxidativo presente hasta la etapa de expansión del blastocito.

En LQOE, las tasas de expansión del blastocito fueron similares entre todos los grupos experimentales ($p = 1.0$), ya que no se observó expansión en ningún tratamiento. En la comparación entre calidades, en el grupo tratado con 400 μL se observó una mayor proporción de blastocitos expandidos en HQOE en comparación con LQOE ($p < 0.01$). Todas las demás comparaciones de grados de calidad para la expansión del blastocito bajo el mismo tratamiento fueron similares (grupo de 100 μL , $p = 0.13$; grupo de 200 μL , $p = 0.21$; grupo de Control, $p = 0.44$ y grupo de Etanol, $p = 0.23$). En este sentido, al ser ovocitos de baja calidad, con pocas células de la granulosa, y que en sí mismo el proceso de cultivo reduce a la mitad la cantidad de α -tocoferol presente en los COC (Dalvit *et al.*, 2005), la adición de α -tocoferol suplementario incrementó la calidad del blastocito, lo que coincide con Báez *et al.* (2021), quienes indican que la adición de α -tocoferol afecta el desarrollo embrionario de una manera dosis-dependiente, reduciendo la apoptosis e induciendo la sobre expresión de genes envueltos en la respuesta al estrés oxidativo como *SOD2*. Como sucedió en el presente estudio, debido a que conforme avanzan las etapas de desarrollo de los embriones, el número se va disminuyendo (Fabra *et al.*, 2020), en estudios posteriores se recomienda incrementar el número de ovocitos en estudio, para contar con información en etapas avanzadas de desarrollo embrionario.

Un hallazgo interesante del presente estudio fue el efecto del etanol en el desarrollo embrionario en los HQOE. Se utilizó etanol al 90 % como solvente del α -tocoferol (siguiendo las indicaciones del proveedor), y de esta forma poder adicionarlo a los grupos experimentales correspondientes. En el estudio, aun considerando que se utilizó una concentración de 0.1 % (v/v) de etanol al 90 %, se encontró diferencia significativa en la tasa de blastulación en los HQOE

entre el tratamiento Control y el tratamiento Etanol ($p < 0.05$). Usar etanol como solvente es frecuentemente utilizado en algunas técnicas reproductivas como la IVP de embriones cuando se desea adicionar compuestos que tienen baja o nula solubilidad en agua; sin embargo, se reconoce que altas dosis de etanol puede ser dañinas para el desarrollo embrionario (Avery & Greve, 2000). Estos autores indican que concentraciones de 0.01 y 0.1 % de etanol (concentración utilizada en el presente estudio) no tienen efecto ni en la maduración de los COC ni en el posterior desarrollo embrionario; sin embargo, concentraciones de 0.3 y 1.0 % de etanol tienen un efecto negativo sobre el desarrollo embrionario desde la etapa de mórlula hasta blastocito de 9 días, sugiriendo que el límite para que tenga efectos negativos es muy pequeño, considerando que el etanol altera las propiedades fisicoquímicas de las membranas biológicas, lo que ocasiona cambios en la actividad de la membrana. Dado que el α-tocoferol es un compuesto liposoluble, debe disolverse en sustancias como etanol, cloroformo, acetona o dimetilsulfóxido (DMSO), por lo que se recomienda que en estudios posteriores donde sea necesario utilizar etanol como solvente de antioxidantes, se utilicen concentraciones de 0.01 % o menores, y de ser posible, diluirlo en DMSO, ya que este tiene menor citotoxicidad que el etanol (Tsvetkov *et al.*, 2023; Van Nguyen *et al.*, 2023).

Conclusiones

En conclusión, la tasa de maduración y el desarrollo embrionario fue mayor en los ovocitos clasificados como de alta calidad en relación con los ovocitos clasificados como de baja calidad, independientemente de la adición de α-tocoferol; sin embargo, la tasa de escisión y el porcentaje de blastocitos expandidos fue mayor en los ovocitos de alta calidad adicionados con 400 μM de α-tocoferol. Asimismo, en la etapa de blastulación de embriones originados con ovocitos de alta calidad, la adición de etanol tuvo un efecto detrimental en los embriones, efecto negativo que fue contrarrestado cuando se adicionaron 200 y 400 μM de α-tocoferol. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, es recomendable la realización de experimentos que incluyan α-tocoferol en concentraciones diferentes a las utilizadas, así como en combinación con otras moléculas con capacidad antioxidante demostrada con el fin de proponer estrategias adicionales que incrementen la producción de embriones *in vitro* a nivel comercial. Asimismo, por su menor citotoxicidad, se recomienda sustituir el etanol por dimetilsulfóxido como solvente de α-tocoferol.

Contribución de los autores

APTP, QCA y CChJM conceptualizaron, desarrollaron la metodología y realizaron la validación experimental. Todos los autores contribuyeron a la redacción, revisión y edición del manuscrito final. Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

Financiamiento

Esta investigación fue financiada con fondos propios del Departamento de Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ).

Declaraciones éticas

Los autores declaran que los procedimientos se realizaron de acuerdo con la norma mexicana para el trato humano en el movimiento de animales (Norma Oficial Mexicana NOM-051-ZOO-1995) y el sacrificio humanitario de animales domésticos y salvajes (Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014).

Declaración de consentimiento informado

No aplica

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONAHCYT por el apoyo otorgado para el equipamiento del Laboratorio de Reproducción Animal e Investigación de la UACJ (INFR201501-251729).

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias

- Acosta-Pérez, T. P. (2020). Effect of the addition of α -tocopherol to *in vitro* maturation media of bovine oocytes. *Journal of Animal Science*, 98 (Suppl. 2), 2–3. <https://doi.org/10.1093/jas/skz397.005>
- Angel, T. R., & Mahendran, S. A. (2024). Comparison of manual and automated body condition scoring of commercial dairy cattle. *Veterinary Record*, 195 (7), e4535. <https://doi.org/10.1002/vetr.4535>
- Avery, B., & Greve T. (2000). Effects of ethanol and dimethylsulphoxide on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Molecular Reproduction and Development*, 55, 438–445. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200004\)55:4<438::AID-MRD12>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200004)55:4<438::AID-MRD12>3.0.CO;2-Y)
- Azam, A., Ejaz, R., Qadeer, S., Irum, S., Ul-Husna, A., Ullah, S., Shahzad, Q., Akhtar, T., & Akher,

- S. (2024). Synergistic impact of α-linolenic acid and α-tocopherol on *in vitro* maturation and culture of buffalo oocytes. *Brazilian Journal of Biology*, 84, e253514. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.253514>
- Báez, F., Gómez, B., de Brun, V., Rodríguez-Osorio, N., & Viñoles, C. (2021). Effect of ethanol on parthenogenetic activation and α-Tocopherol supplementation during *in vitro* maturation on developmental competence of summer-collected bovine oocytes. *Current Issues in Molecular Biology*, 43, 2253–2265. <https://doi.org/10.3390/cimb43030158>
- Caixeta, E. S., Sutton-McDowall, M. L., Gilchrist, R. B., Thompson, J. G., Price, C. A., Machado, M. F., Lima, P. F., & Buratini, J. (2013). Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during *in vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Reproduction*, 146 (1), 27-35. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0079>
- Cetica, P. D., Pintos, L. N., Dalvit, G. C., & Beconi, M. T. (2001). Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte *in vitro* maturation. *Life*, 51, 57-64. <https://doi.org/10.1080/15216540152035073>
- Chowdhury, M. M. R., Choi, B. H., Khan, I., Lee, K. L., Mesalam, A., Song, S. H., Xu, L., Joo, M. D., Afrin, F., & Kong, I. K. (2017). Supplementation of lycopene in maturation media improves bovine quality *in vitro*. *Theriogenology*, 103, 173-184. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.003>
- Dalvit, G., Llanes, S. P., Descalzo, A., Insani, M., Beconi, M., & Cetica, P. (2005). Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte *in vitro* maturation. *Reproduction in Domestic Animals*, 40(2), 93-97. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00522.x>
- de Vasconcelos, F. J. S., Faheem, M., Chaveiro, A., & Moreira da Silva, F. (2016). Effects of α-tocopherol and freezing rates on the quality and heterologous *in vitro* fertilization capacity of stallion sperm after cryopreservation. *Theriogenology*, 86, 957-962. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.019>
- Deleuze, S., & Goudet, G. (2010). Cysteamine supplementation of *in vitro* maturation media: a review. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 476-482. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01587.x>
- Engin, K. N. (2009). Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant. *Molecular Vision*, 15, 55-860. <http://www.molvis.org/molvis/v15/a88>
- Fabra, M. C., Izquierdo, I., Anchordoquy, J. M., Anchordoquy, J. P., Carranza-Martín, A. C., Nikoloff, N., & Furnus, C. C. (2020). Effect of alpha-lipoic acid during preimplantation development of cattle embryos when there were different *in vitro* culture conditions. *Animal Reproduction Science*, 221, 106550. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106550>
- Farghaly, T., Khalifa, E., Mostafa, S., Hussein, M., Bedaiwy, M., & Ahmady, A. (2015). The effect of temporary meiotic attenuation on the *in vitro* maturation outcome of bovine oocytes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal*, 51, 662-671. <https://doi.org/10.1007/s11626-015-9878-y>
- Hossein, M. S., Hashem, M. D. A., Jeong, Y. W., Lee, M. S., Kim, S., Kim, J. H., Koo, O. J., Park, S. M., Lee, E. G., Park, S. W., Kang, S. K., Lee, B. C., & Hwang, W. S. (2007). Temporal effects of α-tocopherol and L-ascorbic acid on *in vitro* fertilized porcine embryo development. *Animal Reproduction Science*, 100, 107-117. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.06.013>
- Jeong, Y. W., Park, S. W., Hossein, M. S., Kim, S., Kim, J. H., Lee, S. H., Kang, S. K., Lee, B. C., &

- Hwang, W. S. (2006). Antiapoptotic and embryotrophic effects of α-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>
- Jiménez-Aguilar, E., Quezada-Casasola, A., Prieto-Caraveo, M., Orozco-Lucero, E., Itzá-Ortiz, M., & Carrera-Chávez, J. (2021). Evaluation of the addition of quercetin and vitamin E to the cryopreservation medium of ram semen on *in vivo* fertility. *Abanico Veterinario*, 11, 1-14. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2021.36>
- Kala, M., Vaseem, S. M., & Nivsarkar M. (2017). Equilibrium between anti-oxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. *Reproductive Medicine and Biology*, 16, 28-35. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12013>
- Khan, I., Chowdhury, M. M. R., Song, S. H., Mesalam, A., Zhang, S., Khalil A. A. K., Jung E. H., Kim, J. B., Jafri, L., Mirza, B., & Kong I. K. (2017). Lupeol supplementation improves the developmental competence of bovine embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 107, 203-210. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.017>
- Kimura, K., Spate, L. D., Green, M. P., & Roberts, R. M. (2004). Effects of oxidative stress and inhibitors of the pentose phosphate pathway on sexually dimorphic production of IFN-τ by bovine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development*, 68, 88-95. <https://doi.org/10.1002/mrd.20053>
- Krischer, R. L., & Herrick, J. R. (2024) Bovine embryo production *in vitro*: evolution of culture media and commercial perspectives. *Animal Reproduction*, 21(3) e20240051. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2024-0051>
- Lonergan, P., & Fair, T. (2014). The ART of studying early embryo development: Progress and challenges in ruminant embryo culture. *Theriogenology*, 81, 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.021>
- Marei, W. F., Abaysekara, D. R. E., Wathes, D. C., & Fouladi-Nashta, A. A. (2014). Role of PTGS2-generated PGE2 during gonadotrophin-induced bovine oocyte maturation and cumulus cell expansion. *Reproductive BioMedicine Online*, 28, 388-400. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.11.005>
- Naspinska, R., Moreira da Silva, M. H., & Moreira da Silva, F. (2023). Current advances in bovine *in vitro* maturation and embryo production using different antioxidants: a review. *Journal of Developmental Biology*, 11(3), 36. <https://doi.org/10.3390/jdb11030036>
- Nogueira da Costa, N., Brito, K. N. L., Santana, P. P. B., Cordeiro, M. S., Silva, T. V. G. Santos, A. X., Ramos, P. C., Santos, S. S. D., King, W. A., Miranda, M. S., & Ohashi O. M. (2015). Effect of cortisol on bovine oocyte maturation and embryo development *in vitro*. *Theriogenology*, 85, 323-329. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.08.010>
- Olson, S. E., & Seidel, G. E. (2000). Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. *Biology of Reproduction*, 62, 248-52. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.2.248>
- Peippo, J., Machaty, Z., & Peter, A. (2011). Terminologies for the pre-attachment bovine embryo. *Theriogenology*, 76 (8), 1373-1379. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.018>
- Rakha, S.I., Elmetwally, M.A., El-Sheikh Ali, H., Balboula, A., Mahmoud, A.M., & Zaabel, S.M. (2022). Importance of antioxidant supplementation during *in vitro* maturation of mammalian oocytes. *Veterinary Sciences*, 9, 439. <https://doi.org/10.3390/vetsci9080439>
- Reis, A., Rooke, J. A., McCallum, G. J., Staines, M.E., Ewen, M. Lomax, M.A., & McEvoy, T.G.

- (2003). Consequences of exposure to serum, with or without vitamin E supplementation, in terms of the fatty acid content and viability of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*, 15, 275-284. <https://doi.org/10.1071/RD03004>
- Remião, M. H., Lucas, C. G., Domingues, W. B., Silveira, T., Barther, N. N. Komninou, E. R., Basso, A. C., Jornada, D. S., Beck, R. C. R., Pohlmann, A. R., Junior, A. S. V., Seixas, F. K., Campos, V. F., Guterres, S. S., & Collares T. (2016). Melatonin delivery by nanocapsules during *in vitro* bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. *Reproductive Toxicology*, 63, 70-81. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.05.016>
- Rocha-Frigoni, N. A. S., Leao, B. C. S., Dall'Acqua, P. C., & Mingoti, G. Z. (2016). Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured *in vitro* with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development. *Theriogenology*, 86, 1897-1905. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.06.009>
- Schoots, M. H., Gordijn, S. J., Scherjon, S. A., van Goor, H., & Hillebrands J. L., (2018). Oxidative stress in placental pathology. *Placenta*, 69, 153-161. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.03.003>
- Stojkovic, M., Machado, S. A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Goncalves, P. B., & Wolf, E. (2001). Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biology of Reproduction*, 64, 904-909. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>
- Takahashi, M. (2012). Oxidative stress and redox regulation on *in vitro* development of mammalian embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 58, 1-9. <https://doi.org/10.1262/jrd.11-138N>
- Tsvetkov, T., Petrova, N., Blagova, H., Daskalova, D., Vitanova, D., & Shumkova, R. (2023). Effectiveness of glycerol, DMSO and trehalose in the process of cryopreservation of drone semen from the species *Apis mellifera*. *Science, Engineering and Education*, 8(1), 21-28. <https://doi.org/10.59957/see.v8.i1.2023.2>
- Tripathi, S. K., Nandi, S., Gupta, P. S. P., & Mondal, S. (2023). Antioxidants supplementation improves the quality of *in vitro* produced ovine embryos with amendments in key development gene expressions. *Theriogenology*, 201, 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.11.048>
- Van Nguyen, V., Ponchunchoovong, S., Kupittayanant, S., & Kupittayanant, P. (2023). Effects of green tea polyphenols, vitamin E, and *Ocimum gratissimum* leaf essential oils as a supplement to extender on chilled canine sperm quality. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 11(8). <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2023/11.8.1250.1260>
- Vásquez, N. A., Torres, V., & Rojano, B.A. (2014). Efecto del ácido ascórbico durante maduración *in vitro* de oocitos bovinos en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y competencia para el desarrollo embrionario. *Información Tecnológica*, 25, 141-150. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000200016>
- Vijayalakshmi, K.S., Sathisha, K. B., Yathish, H. M., Girish, M. H., Naveen Kumar, G. S., Bijurkar, R. G., & Kartikesh, S. M. (2020). Effect of alpha-Tocopherol supplementation in TCM199 medium on *in vitro* maturation and cleavage of buffalo oocytes. *The Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology*, 15(4), 66-70. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20210049039>

- Wang, X., Falcone, T., Attaran, M., Goldberg, J. M., Agarwal, A., & Sharma, R. K. (2002). Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertility and Sterility*, 78, 1272-1277. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04236-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04236-X)
- Zhang, K., Hansen, P. J., & Ealy, A. D. (2010). Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence *in vitro*. *Reproduction*, 140 (6), 815-826. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0190>
- Zhang, W., Yi, K., Yan, H., & Xu, Z. (2012). Advances on in vitro production and cryopreservation of porcine embryos. *Animal Reproduction Science*, 132, 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.05.008>