






Estrés oxidativo durante la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos: una revisión

Romero-Monteleone, S.I.^{1*} ; Navarro-Krilich, L.M.¹ ; Yostar, E.J.¹ ; Dellavalle, F.A.^{1,2} ; Capellari, A.¹ ; Ynsaurralde-Rivolta, A.E.² 

¹Cátedra de Producción Bovina, Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina. ²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Mercedes, Corrientes, Argentina. ✉ sabrina.romeromonteleone@vet.unne.edu.ar

Resumen

La producción *in vitro* (PIV) de embriones bovinos se ha consolidado como la biotecnología reproductiva más difundida a nivel global. Dentro de este sistema, la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos constituye un punto crítico, ya que durante este proceso ocurren transformaciones nucleares, citoplasmáticas y del cúmulo que determinan la competencia para la fecundación y el desarrollo embrionario. La MIV es altamente sensible a factores ambientales como el tiempo de cultivo, la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno, la exposición a la luz, los cuales pueden inducir estrés oxidativo y comprometer la viabilidad celular. La sobreproducción de especies reactivas de oxígeno daña estructuras esenciales como el ADN, las proteínas y las mitocondrias, afectando la maduración y el posterior desarrollo del embrión. Estudios recientes evidencian que el cultivo prolongado y las fluctuaciones térmicas generan una memoria molecular que reduce la competencia ovocitaria, aun en condiciones posteriores normales. Frente a estas limitaciones, se han propuesto diversas estrategias. La suplementación con antioxidantes como cisteamina, L-cisteína, melatonina, epigallocatequina, resveratrol, vitamina C y ácidos grasos omega-3 ha mostrado efectos positivos en la maduración y en la reducción del daño oxidativo, aunque con resultados variables. Más recientemente, el ácido fólico ha cobrado relevancia por sus efectos antioxidantes y epigenéticos, al inhibir la ferroptosis y mejorar la competencia ovocitaria. En conclusión, la optimización de la MIV requiere integrar el control de factores ambientales con estrategias antioxidantes y moleculares adaptadas a cada laboratorio, a fin de preservar la calidad ovocitaria y maximizar el potencial de desarrollo embrionario.

Palabras clave: competencia ovocitaria, cultivo *in vitro*.

Oxidative stress during *in vitro* maturation of bovine oocytes: a review

Abstract. *In vitro* production (IVP) of bovine embryos has become the most widely used reproductive biotechnologies worldwide. Within this system, *in vitro* maturation (IVM) of oocytes is a critical step, as it involves nuclear, cytoplasmic, and *cumulus* cell transformations that determine oocyte competence for fertilization and subsequent embryonic development. IVM is highly sensitive to environmental factors such as temperature, pH, oxygen concentration, light exposure, and culture duration, which may induce oxidative stress and compromise cell viability. Excessive production of reactive oxygen species (ROS) damages key cellular structures, including DNA, proteins, and mitochondria, thereby impairing oocyte maturation and embryonic development. Recent studies indicate that prolonged culture and thermal fluctuations can generate a “molecular memory” that reduces oocyte competence, even under otherwise normal conditions. Several strategies have been proposed to overcome these limitations. Supplementation with antioxidants such as cysteamine, L-cysteine, melatonin, epigallocatechin, resveratrol, vitamin C, and omega-3 fatty acids has shown beneficial effects on oocyte maturation and the reduction of oxidative damage, although with variable outcomes. More recently, folic acid has gained attention due to its antioxidant and epigenetic properties, particularly through the inhibition of ferroptosis and the enhancement of oocyte competence. In conclusion, optimizing IVM requires integrating strict control of environmental conditions with targeted antioxidant and molecular strategies tailored to each laboratory to preserve oocyte quality and maximize embryonic developmental potential.

Key words: oocyte competence, *in vitro* culture.

INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* (PIV) de embriones bovinos ha transformado la reproducción animal, consolidándose como la técnica predominante a nivel global. Según el último reporte de la International Embryo Technology Society (Viana 2024), en 2023 se produjeron 1,87 millones de embriones bovinos *in vitro*, superando en cinco veces a los derivados de técnicas de producción de embriones *in vivo* (371.138 embriones). Este crecimiento (del 15,8% respecto a 2022) refleja su adopción masiva en regiones como Sudamérica (643.004 embriones PIV) y Norteamérica (1,09 millones), donde la eficiencia reproductiva es prioritaria (Viana 2024). Sin embargo, este éxito contrasta con desafíos persistentes: sólo el 42,1% de los embriones PIV fueron transferidos (vs. 58,9% de los *in vivo*), y la tasa de gestación sigue siendo inferior a la deseada (Viana 2024).

Estas limitaciones, en parte se deben a que la técnica de PIV de embriones es sensible a diferentes factores inherentes tanto a la calidad de las gametas como a los pasos que la integran (Bahrami y Cottee 2022). Sin lugar a dudas, la maduración *in vitro* (MIV) es un punto crítico dentro del sistema y es crucial para el éxito de la biotecnología (Adona et al. 2016, Lee et al. 2016, Hatirnaz et al. 2018, Zhang et al. 2018, Richani et al. 2021) ya que durante esta etapa los ovocitos alcanzan la competencia para lograr una correcta fecundación y un desarrollo embrionario exitoso (Hardy et al. 2000, Hussein et al. 2006, Rimon-Dahari et al. 2016, Conti y Franciosi 2018, Lodde et al. 2021).

En este contexto, mejorar la eficiencia de la MIV en los mamíferos continúa siendo un desafío para la industria ganadera (Hardy et al. 2000, Lonergan y Fair 2016). Si bien se ha avanzado en el desarrollo de diversos protocolos de MIV y pre-MIV, factores críticos como condiciones subóptimas pueden generar alteraciones en el ovocito que comprometan el desarrollo embrionario posterior.

El objetivo de esta revisión es analizar el impacto de las condiciones de MIV sobre la competencia ovocitaria para producir blastocistos, así como describir la importante función de las sustancias antioxidantes agregadas a los medios de maduración con énfasis en estudios realizados en bovinos.

Eventos celulares durante la MIV.

Durante la vida fetal los ovocitos ingresan en la meiosis y se detienen en la fase de diploteno de la profase I, conocida como etapa de vesícula germinal hasta el reinicio durante la maduración (Fair et al. 1995).

En condiciones *in vivo*, la meiosis se reanuda luego del pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH). Esto induce la caída de la concentración de adenosín monofosfato cíclico, activa la fosforilación de proteínas específicas como el factor promotor de la mitosis que reinician el ciclo celular (Dekel 2005, Rimon-Dahari et al. 2016, Taugourdeau et al. 2019). Por otra parte, en condiciones *in vitro* esto se logra mediante la suplementación del medio de MIV con la hormona folículo-estimulante (FSH) (Xiao et al. 2014, Richani y Gilchrist 2018). La FSH *in vitro* parece actuar tanto para su propia función como para la de la LH *in vivo* (Sirard et al. 2007).

Durante el proceso de maduración se evidencian cambios en tres estructuras principales, el núcleo, el citoplasma y el *cumulus*. En el núcleo se observa la evolución desde la Profase I hasta la Metafase II, en el cual el contenido genético se reduce a haploide (1n) (Cooper 2000, Voronina y Wessel 2003) debido a la extrusión del primer corpúsculo polar (1° CP) (Cavallera et al. 2019).

Durante la maduración citoplasmática ocurren la transcripción de ARN, síntesis de proteínas, reorganización de diversos orgánulos celulares como la dispersión de las mitocondrias -fundamentales para el abastecimiento energético durante este proceso-, la fragmentación del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico, y migración de los gránulos corticales (Watson 2007, Mao et al. 2014, Morimoto et al. 2017). Dentro de las proteínas sintetizadas en este periodo se encuentran aquellas involucradas en el ciclo celular que aseguran la correcta finalización de la meiosis y primeros ciclos de mitosis durante la vida embrionaria temprana (Watson 2007). La calidad de esta maduración citoplasmática condiciona el potencial de desarrollo del embrión (Grøndahl 2008, Lodde et al. 2021).

Finalmente, en las células del *cumulus* se observa la desconexión de las uniones intercelulares y de las *Gap Junctions*, acompañada de la liberación de ácido hialurónico al exterior (Gilchrist et al. 2004, Uyar et al. 2013, Abedini Najafabadi 2015). Este cambio es denominado, expansión del *cumulus* y facilita el paso de los espermatozoides aumentando la probabilidad de fertilización (Ploutarchou et al. 2015, Kahraman et al. 2018).

Consecuencias de alteraciones durante la MIV en el desarrollo embrionario.

El potencial de desarrollo embrionario depende en gran medida de la calidad y el estado funcional del ovocito (Aguilar-Piña 2012, Lonergan y Fair 2016). Durante la MIV, diversos factores externos pueden comprometer la competencia ovocitaria y, en consecuencia, afectar negativamente la fecundación y el desarrollo embrionario. Entre ellos, se destacan la temperatura, el tiempo de transporte, la concentración de oxígeno, la exposición a la luz, el tipo de manipulación ovocitaria y otros parámetros fisicoquímicos del entorno *in vitro* (Hanada et al. 1986, First y Parrish 1987). Estos factores pueden inducir alteraciones en el metabolismo celular que comprometen la viabilidad del ovocito (Lin y Wang 2021, Keane y Ealy 2024).

En los apartados siguientes se desarrollan de forma específica los principales factores que afectan la maduración *in vitro* y se discuten sus consecuencias sobre la competencia ovocitaria y el desarrollo embrionario posterior.

Tiempo de maduración. Un tiempo inadecuado de maduración puede permitir la formación anormal de la cromatina (Dominko y First 1997), el envejecimiento del ovocito (Hunter y Greve 1997) y un desarrollo comprometido del mismo (Park et al. 2005). Diversos estudios describen una variación amplia en el tiempo requerido para completar la meiosis *in vitro*, variando desde las 16 hasta las 32 h (Chauhan y Anand 1991, Crozet et al. 1995, Taru et al. 1996, Landínez Aponte et al. 2010).

No obstante, se ha comprobado que la MIV de ovocitos bovinos se completa de manera óptima en un intervalo cercano a las 22–24 h (Gilchrist et al. 2016, Sugimura et al. 2017, Soares et al. 2020).

Estudios más recientes confirman que periodos prolongados de MIV inducen alteraciones asociadas al envejecimiento ovocitario. Koyama et al. (2014) observaron que, aunque las tasas de fertilización fueron similares, ovocitos cultivados 30–34 h mostraron menor desarrollo a blastocisto y mayores cambios bioenergéticos vinculados al estrés oxidativo. De forma complementaria, Soares et al. (2020) reportaron que tras 30 h de MIV los ovocitos presentan incremento de peróxido de hidrógeno y alteraciones mitocondriales comparables a las observadas en el envejecimiento *in vivo*, lo que confirma que la duración del cultivo es un factor crítico para preservar la calidad ovocitaria y la competencia de desarrollo embrionario.

Temperatura. En los sistemas de PIV, la temperatura constituye un factor crítico tanto antes como durante la MIV. En el caso de ovarios bovinos provenientes de matadero, el transporte hasta el laboratorio representa una etapa particularmente sensible a la temperatura de almacenamiento, lo que condiciona la viabilidad folicular y la competencia de los ovocitos (Barberino et al. 2019). Se ha demostrado que el almacenamiento de ovarios a temperaturas moderadas o reducidas puede atenuar el estrés isquémico y metabólico asociado a la extracción. Wang et al. (2011) observaron que el transporte ovárico durante 3–4 h a 15 °C preservó una mayor proporción de ovocitos de buena calidad, aumentó las tasas de maduración a metafase II y redujo los índices de apoptosis, en comparación con temperaturas más elevadas (25–35 °C). De forma complementaria, Matsushita et al. (2004) demostraron que el almacenamiento de ovarios bovinos a 10 °C durante 24 h no comprometió la maduración ovocitaria ni el desarrollo embrionario hasta blastocisto tras fertilización *in vitro*.

En contextos de aspiración folicular (OPU), los ovocitos recuperados deben ser mantenidos bajo condiciones térmicas controladas hasta el inicio de la MIV. Pascottini et al. (2018) reportaron que ovocitos bovinos inmaduros pueden mantenerse en un medio comercial a temperatura ambiente (22–25 °C) hasta 10 h sin comprometer las tasas de maduración ni la producción de blastocistos. En contraste, la retención a 38,5 °C durante 6 h, y a 4 °C durante 10 h o la prolongación del tiempo de retención a 14 h a temperatura ambiente redujeron significativamente las tasas de maduración y/o de desarrollo embrionario. El control estricto de la temperatura antes de la MIV, tanto para transporte ovárico como de ovocitos tras OPU, es fundamental para preservar la calidad ovocitaria.

En continuidad con lo anterior, la temperatura durante el proceso de MIV de ovocitos bovinos actúa como un factor determinante de su competencia, con efectos críticos que se manifiestan en múltiples niveles celulares. Estudios claves demostraron que incluso fluctuaciones aparentemente menores (del orden de 1–2 °C por encima o por debajo del rango óptimo fisiológico 38,5–37 °C) alteran irreversiblemente procesos claves: desde la despolimerización de microtúbulos del huso meiótico (Aman y Parks 1994, Payton et al. 2004) hasta

la redistribución anormal de orgánulos citoplasmáticos como gránulos corticales y mitocondrias (Edwards et al. 2005, Sakatani 2017, Naranjo-Gómez et al. 2021). Estas alteraciones estructurales se traducen en fallos funcionales, evidenciados por tasas reducidas de fecundación y un descenso del 30-50% en la producción de blastocistos cuando los ovocitos se exponen a ≥ 41 °C durante 6-12 horas (Silva et al. 2013, Camargo et al. 2019, Stamperna et al. 2020). Curiosamente, el daño térmico persiste incluso cuando el desarrollo embrionario posterior ocurre en condiciones normales, sugiriendo que la MIV establece una “memoria molecular” vulnerable al estrés (Hansen 2007, Camargo et al. 2019, Stamperna et al. 2021).

A nivel molecular, el calor afecta simultáneamente a ovocitos y células del cúmulo. Por un lado, induce estrés oxidativo mediante la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) que dañan el ADN y activan vías apoptóticas (Roth y Hansen 2004, Ju et al. 2005); por otro, altera la expresión génica en ambos tipos celulares, comprometiendo su comunicación metabólica (Luciano et al. 2005, Rispoli et al. 2013, Campen et al. 2018).

Ticianelli et al. (2017) observaron que la exposición de los complejos ovocito-cúmulo (COCs) al calor provoca fragmentación del ADN en las células del *cúmulo*. Latorraca et al. (2020) reportaron que uno de los mecanismos celulares activados por el estrés térmico en los ovocitos es la autofagia. Por su parte, Campen et al. (2018) encontraron que la comunicación de las *Gap Junctions*, se redujo significativamente a 41,0 y 42,0 °C, acompañándose de cromatina en etapas más avanzadas y menor actividad de proteína quinasa activada por AMP (AMPK). Además, se detectó un aumento en la producción de progesterona durante las primeras horas de MIV a altas temperaturas, lo que sugiere que la alteración en las funciones de las células del *cúmulo* contribuye a acelerar la meiosis ovocitaria.

Intervenciones como el uso de gradientes térmicos controlados (38,5 °C – 37 °C) han demostrado mitigar parcialmente estos efectos, mejorando hasta un 20% la formación de mórulas (Shi et al. 1998), lo que subraya la delicada homeostasis térmica requerida durante la MIV.

Por otra parte, los ovocitos bovinos son particularmente sensibles al enfriamiento (Martino et al. 1996). El daño celular aumenta a medida que la temperatura disminuye, y por debajo de los 10 °C los ovocitos no sobreviven más de 0,1 minutos. Parte de este daño se asocia a alteraciones en el huso meiótico, cuya integridad es crucial para la maduración. Wu et al. (1999) observaron que el enfriamiento de ovocitos en etapa de vesícula germinal a 4 °C o menos durante solo 10 minutos redujo significativamente la formación de husos normales y las tasas de segmentación posterior. De forma coincidente, otros autores también han reportado que los ovocitos bovinos muestran una alta sensibilidad a bajas temperaturas (Martino et al. 1996, Maya-Soriano et al. 2013).

Importancia del pH en la MIV. La alteración del pH influye en la homeostasis intracelular, afectando procesos clave como la síntesis de proteínas, la función mitocondrial, el metabolismo celular y la remodelación del citoesqueleto. En condiciones *in vitro*, las fluctuaciones del pH del medio de cultivo impactan negativamente en la motilidad

espermática, la maduración de los ovocitos y el desarrollo embrionario (Will et al. 2011). El pH también modifica los elementos del citoesqueleto de actina (Squirrell et al. 2001), siendo éste esencial para el posicionamiento del huso meiótico en el ovocito (Zhu et al. 2003, Lénárt et al. 2005). Una concentración moderada y estable de dióxido de carbono (CO₂) contribuye a mantener el pH del medio dentro del rango fisiológico (Pinyopummintr y Bavister 1995), siendo especialmente importante ya que variaciones como la exposición del medio al aire ambiental, la fuga de CO₂ en la incubadora o durante el transporte, y la apertura repetida de la incubadora, pueden alterar el pH y reducir la competencia de los ovocitos (Clark y Swain 2014, Barceló-Fimbres et al. 2015). Además, una temperatura elevada puede reducir el pH y favorecer el estrés oxidativo, interrumpiendo funciones celulares esenciales (Larkindale y Knight 2002).

Tensión de oxígeno durante la MIV. Diversos factores pueden potenciar la producción endógena de ROS en condiciones *in vitro*; entre ellos, el ambiente gaseoso del cultivo constituye un componente clave. Las condiciones atmosféricas convencionales contienen alrededor de un 20% de oxígeno, lo que excede notablemente las concentraciones fisiológicas del tracto reproductivo, estimadas entre el 3% y el 13% y reduce las tasas de logro de blastocistos respecto a cultivos *in vitro* realizados con 5% de oxígeno (Wrenzycki y Stinshoff 2013, Rosado-Pérez et al. 2019). Esta diferencia pone de manifiesto que los requerimientos de oxígeno varían según la etapa del proceso *in vitro*. No obstante, a diferencia de lo que ocurre en la etapa de cultivo *in vitro* de embriones, concentraciones de oxígeno del 20% parecen ser beneficiosas durante la maduración *in vitro* de los ovocitos (Pinyopummintr y Bavister 1995).

Madurar y fertilizar ovocitos bovinos *in vitro* bajo una tensión de oxígeno fisiológica (5%) mejoró significativamente las tasas de segmentación (89,3% vs. 82,5%) y formación de blastocistos (36,7% vs. 29,2%) en comparación con una tensión de oxígeno atmosférica (20%). Además, los blastocistos generados con bajo O₂ mostraron mayor tasa de eclosión (41,7% vs. 18,9%) y mayor número de células tras la criopreservación, lo que indica una mejor criotolerancia (Báez et al. 2021).

Implicancias de la exposición lumínica durante la MIV. Durante el desarrollo fisiológico, los ovocitos y embriones de mamíferos se encuentran protegidos de la exposición directa a la luz, lo que sugiere que no poseen mecanismos específicos para contrarrestar los efectos de la radiación electromagnética (Takenaka et al. 2007, Khodavirdilou et al. 2021). En contraste, durante los procedimientos de PIV, la exposición a la luz visible (400–700 nm) resulta inevitable como consecuencia de las manipulaciones necesarias, tales como la observación microscópica, la evaluación del desarrollo embrionario y la selección de ovocitos o embriones viables (Vernon et al. 2011).

Investigaciones previas han demostrado que la exposición lumínica actúa como un factor físico estresante capaz de inducir un desequilibrio entre sistemas prooxidantes y antioxidantes, promoviendo la

generación ROS y daño oxidativo celular (Lin y Wang 2021, Khodavirdilou et al. 2021). En particular, se ha descrito que exposiciones superiores a cinco minutos pueden incrementar significativamente la producción de ROS, afectando la calidad ovocitaria y embrionaria (Goto et al. 1993). La toxicidad lumínica depende de múltiples variables, entre ellas la longitud de onda, la intensidad de la luz, la duración de la exposición y la etapa del desarrollo en la que se produce el estímulo (Khodavirdilou et al. 2021).

En relación con la longitud de onda, numerosos trabajos coinciden en que los efectos eliminadores de la luz aumentan a medida que disminuye la longitud de onda. La luz azul (aproximadamente 400–500 nm) ha sido consistentemente asociada con un incremento marcado en la producción de ROS, oxidación de biomoléculas, daño en el ADN y alteraciones en el desarrollo embrionario (Hockberger et al. 1999, Oh et al. 2007, Takenaka et al. 2007, Du Plessis et al. 2008). Por el contrario, la luz roja, con longitudes de onda más largas (≈550–730 nm), ha demostrado ser considerablemente menos perjudicial, mostrando efectos mínimos o nulos sobre la viabilidad y el desarrollo embrionario en distintas especies, incluidos bovinos (Takenaka et al. 2007, Bognar et al. 2019, Bodis et al. 2020).

La vulnerabilidad del ovocito frente a la exposición lumínica se explica, en gran medida, por su particular fisiología mitocondrial. Las mitocondrias constituyen las principales fuentes celulares de ROS y cumplen un rol central en el metabolismo energético del ovocito (Keane y Ealy 2024). El ADN mitocondrial es especialmente susceptible al daño oxidativo debido a su proximidad al sitio de generación de ROS. Esta susceptibilidad se ve acentuada en los ovocitos, que contienen una cantidad elevada de mitocondrias —superior a las 100.000— en comparación con las células somáticas, que presentan entre 1.000 y 2.500 mitocondrias (Malott et al. 2022). En este contexto, la exposición lumínica durante la MIV puede exacerbar el daño oxidativo mitocondrial y comprometer la competencia ovocitaria y el desarrollo embrionario posterior.

Si bien la exposición a la luz durante los procedimientos *in vitro* no puede eliminarse por completo, diversos estudios han demostrado que la implementación de estrategias de mitigación resulta eficaz para reducir sus efectos adversos. Entre ellas, se destaca el uso de filtros ópticos, particularmente filtros rojos, durante la observación microscópica, los cuales han mostrado minimizar la generación de ROS y preservar la calidad embrionaria (Takenaka et al. 2007). Asimismo, se ha evidenciado que la intensidad total de la luz y el tiempo de exposición desempeñan un rol más determinante que la longitud de onda de manera aislada, reforzando la necesidad de limitar la duración de las manipulaciones bajo iluminación directa (Khodavirdilou et al. 2021).

La exposición lumínica constituye un factor ambiental relevante durante el MIV. Por lo tanto, la optimización de las condiciones de iluminación, mediante la reducción del tiempo de exposición, el control de la intensidad lumínica y el uso de filtros adecuados, representan una estrategia clave para preservar la calidad ovocitaria y mejorar los resultados de la PIV.

Estrés oxidativo durante la MIV. Durante las funciones celulares normales, como resultado de reacciones metabólicas y enzimáticas, se generan ROS, moléculas caracterizadas por la presencia de electrones no apareados, entre las que se incluyen el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH) (Guérin et al. 2001, Phaniendra et al. 2015). Además de su origen endógeno, las ROS también pueden generarse a partir de factores exógenos propios de los sistemas de PIV, como inadecuadas condiciones ambientales (Kumar et al. 2017, Haida y Hakiman 2019).

Estas especies presentan diferentes propiedades químicas y capacidades de difusión. Mientras que el OH ejerce su acción en un radio muy limitado alrededor de su sitio de formación, el O_2^- puede desplazarse a mayores distancias antes de interactuar con sus blancos celulares (Fridovich 1998). A través de estas interacciones, las ROS pueden modificar de manera oxidativa proteínas, receptores, fosfatasa, quinasas, canales iónicos y factores de transcripción, afectando múltiples vías de señalización celular (De Giusti et al. 2013, Zhao et al. 2019).

En condiciones fisiológicas, niveles controlados de ROS cumplen funciones celulares esenciales, participando en procesos como la adquisición de la competencia ovocitaria y el desarrollo embrionario temprano (Blondin et al. 1997, Combelles et al. 2009, Scialo et al. 2017). Sin embargo, cuando la producción de ROS excede la capacidad antioxidante del sistema, se establece un estado de estrés oxidativo.

El estrés oxidativo resulta del desequilibrio entre la generación de ROS y la eficacia de los mecanismos antioxidantes endógenos, lo que puede deberse tanto a una producción aumentada de radicales libres como a una disminución en la disponibilidad o actividad de antioxidantes celulares, incluyendo vitaminas B, C y E, selenio, glutatión (GSH), glutatión peroxidasa (GPX), superóxido dismutasa (SOD) y coenzima Q10 (Agarwal et al. 2014, Cagnone y Sirard 2016, Rosado-Pérez et al. 2019). Este desbalance favorece un círculo vicioso que amplifica la generación de ROS y agrava el daño celular (Fridovich 1998, Luberdá 2005).

En el contexto de la MIV, el exceso de ROS puede inducir daños oxidativos en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, comprometiendo la integridad celular del ovocito y afectando negativamente su competencia de desarrollo, así como activar vías asociadas a disfunción mitocondrial y apoptosis (Guérin et al. 2001, Yang et al. 2018, Lin y Wang 2021).

En la última década, se ha propuesto que, además de los mecanismos clásicos de apoptosis y autofagia, el estrés oxidativo excesivo durante la MIV puede activar vías alternativas de muerte celular. Entre ellas, la ferroptosis ha emergido como un proceso relevante, caracterizado como un tipo de muerte celular dependiente de hierro y de ROS, claramente distinta de la necrosis, la autofagia y la apoptosis. Sus rasgos característicos incluyen la captación celular de hierro, la generación intracelular de ROS mediante la reacción de Fenton, el agotamiento de GSH y la inactivación del glutatión peroxidasa 4 (GPX4) (Dixon et al. 2012, Jiang et al. 2021, Liu et al. 2023).

Uso de antioxidante durante la MIV.

Se define como antioxidante a toda sustancia que, presente en bajas concentraciones en relación con el sustrato oxidable, es capaz de retrasar o inhibir significativamente la oxidación de dicho sustrato (Guérin et al. 2001, Prasad et al. 2018).

Durante la MIV, la actividad antioxidante resulta esencial para proteger la viabilidad celular y favorecer la competencia ovocitaria (Lodde et al. 2021). El ovocito, por sí mismo, no cuenta con una maquinaria antioxidante suficientemente eficiente, por lo que depende en gran medida de las células del *cumulus* circundante. Estas células cumplen un rol fundamental al proporcionar metabolitos como GSH y melatonina, además de NADPH derivado del metabolismo de la glucosa, necesario para mantener el GSH reducido y funcional (El-Raey et al. 2011, Gutnisky et al. 2013, Lodde et al. 2021). Asimismo, expresan múltiples enzimas antioxidantes que contribuyen a neutralizar las ROS en el entorno inmediato del ovocito (Ali et al. 2003, Shaeib et al. 2016). Esta interacción es clave, ya que las células del *cumulus* también participan en la adquisición de la competencia del desarrollo durante la MIV (Gordon 2003, Lodde et al. 2021).

La suplementación del medio de maduración con antioxidantes ha demostrado ser una estrategia efectiva para mitigar los efectos del estrés oxidativo (Lodde et al. 2021). Uno de los primeros agentes estudiados es la cisteamina (compuesto tiólico), cuya inclusión en el medio de cultivo estimula la síntesis de GSH intracelular, un poderoso inhibidor de ROS (de Matos et al. 1995, Balasubramanian y Rho 2007, Biradar et al. 2025).

De manera similar, la suplementación con melatonina ha mostrado efectos beneficiosos, mejorando tanto la maduración nuclear como la citoplasmática, evidenciada por la extrusión 1° CP, una distribución normal de gránulos corticales y mitocondrias, y un mayor potencial de membrana mitocondrial. Además, se observó una reducción significativa en los niveles de ROS intracelulares, un aumento en la producción de GSH y una disminución en la tasa de apoptosis temprana (Pang et al. 2018). Sin embargo, se ha demostrado que concentraciones elevadas de melatonina pueden interferir con la progresión meiótica. En particular, la suplementación con dosis altas (100 μ M) durante la MIV redujo significativamente la tasa de maduración ovocitaria y aumentó la proporción de ovocitos detenidos en metafase I, en comparación con concentraciones bajas (0,01–1 μ M), sin evidenciar efectos citotóxicos directos (Farahavar y Shahne 2010).

Posteriormente, Gutiérrez-Añez et al. (2021) evaluaron el efecto de la melatonina durante la MIV en ovocitos bovinos de donantes prepúberes y adultas. Observaron que la suplementación con melatonina aumentó significativamente la tasa de blastocistos tanto en vacas adultas (24,8% vs. 16,0%) como en donantes prepúberes (23,1% vs. 11,1%). Además, mejoró la calidad embrionaria al incrementar el número total de células, el macizo celular interno (ICM) y la relación ICM:TE (trofoectodermo). En los ovocitos prepúberes, la melatonina permitió alcanzar valores comparables a los obtenidos en donantes adultas. En conjunto, este estudio evidencia que la melatonina

potencia la competencia ovocitaria y la calidad embrionaria en ambas categorías etarias.

Más recientemente, Biradar et al. (2025) compararon el efecto de melatonina y cisteamina sobre la MIV. La suplementación con melatonina (10^{-9} mol L⁻¹) resultó en mayores tasas de ovocitos en MII, segmentación y formación de blastocistos en comparación con cisteamina (50 μ M) y con el grupo control. Estos hallazgos sugieren que, mientras la cisteamina favorece principalmente la maduración citoplasmática al incrementar los niveles de GSH, la melatonina ejerce un efecto más amplio al mejorar tanto la maduración citoplasmática como nuclear, potenciando así la competencia de desarrollo embrionario.

La L-cisteína es un aminoácido azufrado reconocido por su capacidad para estimular la síntesis de GSH, proteger contra ROS y contribuir al mantenimiento del equilibrio redox celular (Nabenishi et al. 2012). Dado que el GSH extracelular no puede atravesar la membrana del ovocito, su acumulación intracelular depende de la habilidad de las células del *cumulus* para captar tioles y sintetizar GSH (Li et al. 2018). En este contexto, Elgebaly et al. (2022) demostraron que la suplementación del medio de MIV con 0,8 mM de L-cisteína incrementó la proporción de ovocitos en metafase II, mejoró la expansión y comunicación de los COCs, y elevó la expresión de factores clave en la maduración ovocitaria.

Entre los compuestos naturales con potencial antioxidante evaluados recientemente, se encuentra la epigallocatequina (EGCG). A una concentración de 10 μ M, su presencia en el medio de maduración aumentó significativamente las tasas de maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos, mostrando mejores resultados que el alfa tocoferol solo o en combinación (Singh et al. 2019).

Otros antioxidantes como la quercetina, la vitamina C y el resveratrol también han demostrado su eficacia al reducir los niveles intracelulares de ROS en ovocitos madurados *in vitro* (Sovernigo et al. 2017).

Por otra parte, en situaciones que simulan condiciones de estrés metabólico como el balance energético negativo en vacas lecheras de alta producción, se ha observado que la suplementación con ácido alfa-linolénico (ALA, un omega-3) durante la MIV protege la viabilidad de los ovocitos expuestos a ambientes lipotóxicos, especialmente al preservar la integridad de las células del *cumulus* (Marei et al. 2017).

En ovocitos bovinos, los desequilibrios redox pueden inducir ferroptosis, afectando directamente la MIV (Dixon et al. 2012, Jiang et al. 2021). En este contexto, el ácido fólico (AF) ha sido evaluado como antioxidante durante la MIV, principalmente por su capacidad para restablecer el equilibrio redox y reducir la acumulación de ROS. Su papel en procesos epigenéticos lo posiciona como un factor clave para mejorar tanto la competencia ovocitaria como el desarrollo embrionario (Baghshahi et al. 2021, Verruma et al. 2021, Yang et al. 2024).

Verruma et al. (2021) evaluaron la suplementación con 0, 10, 30 y 100 μ M de AF durante la MIV de ovocitos de distinto grado de calidad. Encontraron que 30 μ M mejoró la producción embrionaria en ovocitos de menor calidad (GIII), mientras que 100 μ M redujo la producción

en ovocitos de alta calidad (GI). Baghshahi et al. (2021) estudiaron los efectos de añadir 100 ng mL⁻¹ de AF disminuyó significativamente los niveles intracelulares de ROS y mejoró las tasas de fertilización, además de inducir cambios en la expresión de genes de metilación del ADN (Dnmt1, Dnmt3a y Dnmt3b).

Más recientemente, Yang et al. (2024) reportaron que 50 μ M incrementó la maduración ovocitaria en un 8,95%, la tasa de segmentación en 6,94% y la formación de blastocistos en 4,36% respecto al grupo control. Además, demostraron que este efecto estuvo mediado por la inhibición de la ferroptosis: el AF redujo la acumulación intracelular de Fe²⁺ y ROS, al tiempo que aumentó los niveles de GSH.

El AF mejora la competencia ovocitaria y el desarrollo embrionario de forma dosis-dependiente, integrando efectos antioxidantes y epigenéticos mediados por la vía de la ferroptosis.

CONCLUSIONES

La maduración *in vitro* es un punto crítico dentro del sistema de producción *in vitro* de embriones, ya que pequeñas variaciones en las condiciones de cultivo pueden comprometer significativamente la competencia ovocitaria y el desarrollo embrionario posterior. Factores inherentes a la manipulación *in vitro*, como el tiempo de maduración, la temperatura, el pH y la exposición a la luz, pueden inducir un desequilibrio redox caracterizado por un aumento en la producción endógena de especies reactivas del oxígeno. Si bien, como se evidenció anteriormente, pequeñas cantidades de ROS son necesarias para funciones celulares esenciales, su exceso puede provocar serios daños oxidativos en estructuras intracelulares hasta activación de las vías de muerte celular. En este contexto, diversas estrategias basadas en la suplementación antioxidante de los medios de maduración han sido evaluadas, mostrando resultados dependientes del tipo de compuesto, la dosis empleada y las condiciones específicas del sistema de cultivo. Frente a esta circunstancia, el desafío futuro de cada laboratorio será llevar un riguroso control e identificar los puntos críticos a fin de reducir al mínimo la exposición de las gametas a factores estresantes e identificar la estrategia antioxidante que mejor se adapte a sus condiciones.

Contribución de los autores. RMSI: conceptualización, metodología, curación de datos, análisis formal, visualización, redacción y redacción-revisión. NKLM: curación de datos, análisis formal y redacción-revisión. YEJ: curación de datos, análisis formal y redacción-revisión. DFA: análisis formal, validación y redacción-revisión. CA: conceptualización, metodología, supervisión y redacción-revisión. YRAE: conceptualización, metodología, supervisión y redacción-revisión.

Declaración de conflictos de intereses. Los autores declaran no tener conflictos de intereses financieros ni relaciones personales conocidas que pudieran haber influido en el trabajo presentado en este artículo.

ORCID

Romero-Monteleone, S.I.  <https://orcid.org/0009-0007-4639-2651>

Navarro-Krilich, L.M.  <https://orcid.org/0009-0003-3688-2308>

Yostar, E.J.  <https://orcid.org/0009-0006-9130-4027>

Dellavalle, F.A.  <https://orcid.org/0009-0003-3321-8284>

Capellari, A.  <https://orcid.org/0009-0003-9501-2935>

Ynsaurralde-Rivolta, A.E.  <https://orcid.org/0009-0000-9437-6815>

REFERENCIAS

1. Abedini Najafabadi A. Elucidation of the biological roles of Wnt5a signaling in follicle development. Tesis Doctoral (PhD), Doctoral Dissertation, The University of Montreal, Montreal, Canadá. 2015.
2. Adona PR, Leal CL, Biase FH, De Bem TH, Mesquita LG, Meirelles FV, Guemra S. *In vitro* maturation alters gene expression in bovine oocytes. *Zygote*. 2016; 24(4): 624-633.
3. Agarwal A, Durairajanayagam D, Du Plessis SS. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014; 12(1): 112.
4. Aguilar-Piña RE. El regreso del ovocito: de la olvidada transferencia citoplasmática a la actual transferencia del huso meiótico. *Rev Mex Med Reprod*. 2012; 4(3): 132-138.
5. Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology*. 2003; 59: 939-949.
6. Aman RR, Parks JE. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro*-matured bovine oocytes. *Biology of Reproduction*. 1994; 50(1), 103-110.
7. Báez F, de Brun V, Rodríguez-Osorio N, Viñoles C. 32 Low oxygen tension during *in vitro* oocyte maturation and fertilisation improves cryotolerance of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Reprod Fertility Dev*. 2021; 34(2): 251-251.
8. Baghshahi H, Zeynoudini S, Shahneh AZ, Khanian SE, Yousefi AR, Goodarzi, A. Effect of adding different levels of folic acid to the culture medium on developmental competence of bovine oocytes. *Iran J Appl Anim Sci*. 2021; 11(2).
9. Bahrami M, Cottee PA. Culture conditions for *in vitro* maturation of oocytes—A review. *Reprod Breed*. 2022; 2(2): 31-36.
10. Balasubramanian S, Rho GJ. Effect of cysteamine supplementation of *in vitro* matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. *Anim Reprod Sci*. 2007; 98: 282–292.
11. Barberino RS, Silva JRV, Figueiredo JR, Matos M HT. Transport of domestic and wild animal ovaries: a review of the effects of medium, temperature, and periods of storage on follicular viability. *Biopreservation and biobanking*. 2019; 17(1): 84-90.
12. Barceló-Fimbres M, Campos-Chillón LF, Mtango NR, Altermatt J, Bonilla L, Koppang R, Verstegen JP. Improving *in vitro* maturation and pregnancy outcome in cattle using a novel oocyte shipping and maturation system not requiring a CO₂ gas phase. *Theriogenology*. 2015; 84(1), 109–117.
13. Biradar P, Singh P, Singh N, Honparkhe M, Sethi RS. Developmental competence of ovum pick up derived Sahiwal cow oocytes in maturation media supplemented with cysteamine and melatonin. *Tissue Cell*. 2025; 95: 102819.
14. Blondin P, Coenen K, Sirard MA. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl*. 1997; 18(4): 454-60.
15. Bodis J, Gödöny K, Várnagy Á, Kovács K, Koppán M, Nagy B, Erostyák J, Herczeg R, Szekeres-Barthó J, Gyenesei A, Kovács GL. How to reduce the potential harmful effects of light on blastocyst development during IVF. *Med Princ Pract*. 2020; 29(6): 558-564.
16. Bognar Z, Csabai TJ, Pallinger E, Balassa T, Farkas N, Schmidt J, Görgey E, Berta G, Szekeres-Bartho J, Bodis J. The effect of light exposure on the cleavage rate and implantation capacity of preimplantation murine embryos. *J Reprod Immunol*. 2019; 132: 21-28.
17. Cagnone G, Sirard MA. The embryonic stress response to *in vitro* culture: insight from genomic analysis. *Reproduction*. 2016; 152(6): R247-R261.
18. Camargo LSA, Aguirre-Lavin T, Adenot P, Araujo TD, Mendes VRA, Louro ID, Beaujean N, Souza ED. Heat shock during *in vitro* maturation induces chromatin modifications in the bovine embryo. *Reproduction*. 2019; 158(4): 313-322.
19. Campen KA, Abbott CR, Rispoli LA, Payton RR, Saxton AM, Edwards JL. Heat stress impairs gap junction communication and cumulus function of bovine oocytes. *J Reprod Dev*. 2018; 64(5): 385-392.
20. Cavalera F, Zanoni M, Merico V, Sacchi L, Bellazzi R, Garagna S, Zuccotti M. Chromatin organization and timing of polar body I extrusion identify developmentally competent mouse oocytes. *Int J Dev Biol*. 2019; 63(3-4-5): 245-251.
21. Chauhan MS, Anand SR. *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. *Ind J Exp Biol*. 1991; 29: 105-110.
22. Clark NA, Swain JE. Buffering systems in IVF. In: Quinn P, editor. *Culture media, solutions, and systems in human ART*. Cambridge: Cambridge University Press; 2014. p. 30-46.
23. Combelles CM, Gupta S, Agarwal A. Could oxidative stress influence the *in-vitro* maturation of oocytes. *Reprod Biomed*. 2009; 18: 864-880.
24. Conti M, Franciosi F. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. *Hum Reprod Update*. 2018; 24(3): 245-266.
25. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Meiosis and Fertilization. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9901/>. Último acceso: 20 de julio de 2025.

26. Crozet N, Ahmaed-Ali M, Dubos MP. Developmental competence of goat oocyte from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *J Reprod Fertil.* 1995; 103: 293-298.
27. De Giusti VC, Caldiz CI, Ennis IL, Perez NG, Cingolani HE, Aiello EA. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) as signaling molecules of intracellular pathways triggered by the cardiac renin-angiotensin II-aldosterone system (RAAS). *Front Physiol.* 2013; 4: 126.
28. de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Baldassarre H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev.* 1995; 42(4): 432-436.
29. Dekel N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol.* 2005; 234(1-2): 19-25.
30. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Stockwell BR. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* 2012; 149(5): 1060-1072.
31. Dominko T, First NL. Timing of meiotic progression in bovine oocyte and its effect on early embryo development. *Mol Reprod Dev.* 1997; 47: 456-467.
32. Du Plessis SS, Makker K, Desai NR, Agarwal A. Impact of oxidative stress on IVF. *Expert Rev Obstet Gynecol.* 2008; 3(4): 539-554.
33. Edwards JL, Saxton AM, Lawrence JL, Payton RR, Dunlap JR. Exposure to a physiologically relevant elevated temperature hastens *in vitro* maturation in bovine oocytes. *J Dairy Sci.* 2005; 88(12): 4326-4333.
34. Elgebaly MM, Hazaa ABM, Amer H A, Mesalam A. L-Cysteine improves bovine oocyte developmental competence *in vitro* via activation of oocyte-derived growth factors BMP-15 and GDF-9. *Reprod Domest Anim.* 2022; 57(7): 734-742.
35. El-Raey M, Geshi M, Somfai T, Kaneda M, Hirako M, Abdel-Ghaffar AE, Sosa GA, A. AE-RME, Nagai T. Evidence of melatonin synthesis in the *cumulus* oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation *in vitro* in cattle. *Mol Reprod Dev.* 2011; 78: 250-262.
36. Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev.* 1995; 42: 437-42.
37. Farahavar A, Shahne AZ. Effect of melatonin on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Afr J Biotechnol.* 2010; 9(17): 2579-2583.
38. First NL, Parrish JJ. *In vitro* fertilization of ruminants. *J Reprod Fertil.* 1987; 34: 151-165.
39. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol.* 1998; 201(Pt 8): 1203-1209.
40. Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci.* 2004; 82: 431-446.
41. Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, Zeng HT, Wang X, Vos MD. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction.* 2016; 152: R143-R157.
42. Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. 2nd ed. Wallingford (UK): CABI International Publishing; 2003. p. 157.
43. Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*. *Free Radic Biol Med.* 1993; 15(1): 69-75.
44. Grøndahl C. Oocyte maturation. Basic and clinical aspects of *in vitro* maturation (IVM) with special emphasis of the role of FF-MAS. *Dan Med Bull.* 2008; 55(1): 1-16.
45. Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update.* 2001; 7(2): 175-89.
46. Gutiérrez-Añez JC, Lucas-Hahn A, Hadelér KG, Aldag P, Niemann H. Melatonin enhances *in vitro* developmental competence of *cumulus*-oocyte complexes collected by ovum pick-up in prepubertal and adult dairy cattle. *Theriogenology.* 2021; 161: 285-293.
47. Gutnisky C, Dalvit GC, Thompson JG, Cetica PD. Pentose phosphate pathway activity: effect on *in vitro* maturation and oxidative status of bovine oocytes. *Reprod Fertil Dev.* 2013; 25: 1026-1035.
48. Haida Z, Hakiman M. A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food Sci Nutr.* 2019; 7: 1555-1563.
49. Hanada A, Shioya Y, Suzuki T. Birth of calves after non-surgical transfer of bovine IVM/IVF oocytes. *In: Proceedings of the 78th Meeting of the Japanese Society of Zootechnical Science.* 1986; p. 18.
50. Hansen PJ. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology.* 2007; 68(1): S242-S249.
51. Hardy K, Wright CS, Franks S, Winston, RM. *In vitro* maturation of oocytes. *Br Med Bull.* 2000; 56(3): 588-602.
52. Hatırnaz S, Ata B, Hatırnaz ES, Dahan MH, Tannus S, Tan J, Tan SL. Oocyte *in vitro* maturation: A systematic review. *Turk J Obstet Gynecol.* 2018; 15(2): 112.
53. Hockberger PE, Skimina TA, Centonze VE, Lavin C, Chu S, Dadrás S, Reddy JK, White JG. Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H₂O₂ in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 6255-6260.
54. Hunter HF, Greve T. ¿Could artificial insemination of cattle be more fruitful? Penalties associated with aging eggs. *Reprod Dom Anim.* 1997; 32: 137-142.
55. Hussein T, Thompson J, Gilchrist R. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Develop Biol.* 2006; 296: 514-521.
56. Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021; 22(4): 266-282.
57. Ju JC, Jiang S, Tseng JK, Parks JE, Yang X. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology.* 2005; 64(8): 1677-1689.
58. Kahraman S, Çetinkaya CP, Çetinkaya M, Tüfekçi MA, Ekmekçi CG, Montag M. Is there a correlation

- between follicle size and gene expression in *cumulus* cells and is gene expression an indicator of embryo development? *Reprod Biol Endocrinol.* 2018; 16: 69.
59. Keane JA, Ealy AD. An overview of reactive oxygen species damage occurring during *in vitro* bovine oocyte and embryo development and the efficacy of antioxidant use to limit these adverse effects. *Animals.* 2024; 14(2): 330.
 60. Khodavirdilou R, Pournaghi M, Oghbaei H, Rastgar Rezaei Y, Javid F, Khodavirdilou, L, Dittrich, R. Toxic effect of light on oocyte and pre-implantation embryo: a systematic review. *Arc Toxicol.* 2021; 95(10): 3161-3169.
 61. Koyama K, Kang SS, Huang W, Yanagawa Y, Takahashi Y, Nagano M. Aging-related changes in *in vitro*-matured bovine oocytes: oxidative stress, mitochondrial activity and ATP content after nuclear maturation. *J Reprod Dev.* 2014; 60(2): 136-142.
 62. Kumar S, Sharma S, Vasudeva N. Review on antioxidants and evaluation procedures. *Chin J Integr Med.* 2017; 1-12.
 63. Landínez Aponte JA, Villamediana PC, Hernández Fonseca HJ, Soto Belloso E. Efecto del tiempo de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos sobre la progresión meiótica. Nota técnica. *Rev Cient.* 2010; 20(6): 659-664.
 64. Larkindale J, Knight MR. Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiol.* 2002; 128: 682-695.
 65. Latorraca LB, Feitosa WB, Mariano C, Moura MT, Fontes PK, Nogueira MF, Paula-Lopes FF. Autophagy is a pro-survival adaptive response to heat shock in bovine *cumulus*-oocyte complexes. *Sci Rep.* 2020; 10(1): 13711.
 66. Lee JY, Jung YG, Seo BB. Effects of culture media conditions on *in vitro* fertilized egg production from high-grade Hanwoo ovary-derived embryos. *J Anim Sci Technol.* 2016; 58(1): 1.
 67. Lénárt P, Bacher CP, Daigle N, Hand AR, Eils R, Terasaki M, Ellenberg J. A contractile nuclear actin network drives chromosome congression in oocytes. *Nature.* 2005; 436(7052): 812-818.
 68. Li Z, Gu R, Lu X, Zhao S, Feng Y, Sun Y. Preincubation with glutathione ethyl ester improves the developmental competence of vitrified mouse oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 2018; 35(7): 1169-1178.
 69. Lin J, Wang L. Oxidative stress in oocytes and embryo development: Implications for *in vitro* systems. *Antioxid Redox Signal.* 2021; 34(17): 1394-1406.
 70. Liu M, Wu K, Wu Y. The emerging role of ferroptosis in female reproductive disorders. *Biomed Pharmacother.* 2023; 166:115415. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115415
 71. Lodde V, Luciano AM, Musmeci G, Miclea I, Tessaro I, Aru M, Albertini DF, Franciosi F. A Nuclear and cytoplasmic characterization of bovine oocytes reveals that cysteamine partially rescues the embryo development in a model of low ovarian reserve. *Animals.* 2021; 11(7): 1936.
 72. Lonergan P, Fair T. Maturation of oocytes *in vitro*. *Annu Rev Anim Biosci.* 2016; 4: 255-268.
 73. Lubarda Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol.* 2005; 5(1): 5-17.
 74. Luciano AM, Lodde V, Beretta MS, Colleoni S, Lauria A, Modina S. Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact *cumulus*-oocyte complexes: Role of *cumulus* cells, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glutathione. *Mol Reprod Dev.* 2005; 71(3): 389-397.
 75. Malott KF, Reshel S, Ortiz L, Luderer U. Glutathione Deficiency Decreases Lipid Droplet Stores and Increases Reactive Oxygen Species in Mouse Oocytes. *Biol Reprod.* 2022; 106: 1218-1231.
 76. Mao L, Lou H, Lou Y, Wang N, Jin F. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. *Reprod Biomed Online.* 2014; 28: 284-299.
 77. Marei WFA, De Bie J, Mohey-Elsaeed O, Wydooghe E, Bols PEJ, Leroy JLMR. Alpha-linolenic acid protects the developmental capacity of bovine *cumulus*-oocyte complexes matured under lipotoxic conditions *in vitro*. *Biol Reprod.* 2017; 96(6): 1181-1196.
 78. Martino A, Pollard JW, Leibo SP. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol Reprod Dev.* 1996; 45(4): 503-12.
 79. Matsushita S, Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and developmental potential of follicular oocytes after *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation, or somatic cell nucleus transfer. *Anim Reprod Sci.* 2004; 84(3-4): 293-301.
 80. Maya-Soriano MJ, López-Gatius F, Andreu-Vázquez C, López-Béjar M. Bovine oocytes show a higher tolerance to heat shock in the warm compared with the cold season of the year. *Theriogenology.* 2013; 79(2): 299-305.
 81. Morimoto Y, Hashimoto S, Yamochi T, Goto H, Amo A, Yamanaka M, Inoue M. Mitochondria of the oocyte. In: Morimoto Y, editor. Development of *in vitro* maturation for human oocytes: Natural and mild approaches to clinical infertility treatment. Cham (Switzerland): Springer International Publishing; 2017. p. 75-91.
 82. Nabenishi H, Ohta H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K, Tsuzuki Y. The effects of cysteine addition during *in vitro* maturation on the developmental competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. *Zygote.* 2012; 20(3): 249-259.
 83. Naranjo-Gómez JS, Uribe-García HF, Herrera-Sánchez MP, Lozano-Villegas KJ, Rodríguez-Hernández R, Rondón-Barragán IS. Heat stress on cattle embryo: Gene regulation and adaptation. *Heliyon.* 2021; 7(3): e06570.
 84. Oh SJ, Gong SP, Lee ST, Lee EJ, Lim JM. Light intensity and wavelength during embryo manipulation are important factors for maintaining viability of preimplantation embryos *in vitro*. *Fertil Steril.* 2007; 88: 1150-1157.
 85. Pang Y, Zhao S, Sun Y, Jiang X, Hao H, Du W, Zhu H. Protective effects of melatonin on the *in vitro*

- developmental competence of bovine oocytes. *Anim Sci J.* 2018; 89(4): 648-660.
86. Park Y, Kim S, Kim J, Park H, Byun M. The effects of duration of *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. *Theriogenology.* 2005; 64: 123-134.
 87. Pascottini OB, Catteduw M, Van Soom A, Opsomer G. Holding immature bovine oocytes in a commercial embryo holding medium: High developmental competence for up to 10 h at room temperature. *Theriogenology.* 2018; 107: 63-69.
 88. Payton RR, Romar R, Coy P, Saxton AM, Lawrence JL, Edwards JL. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress *in vitro*. *Biol Reprod.* 2004; 71(4): 1303-1308.
 89. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015; 30(1): 11-26.
 90. Pinyopummintr T, Bavister BD. Optimum gas atmosphere for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology.* 1995; 44(4): 471-7.
 91. Ploutarchou P, Melo P, Day AJ, Milner CM, Williams SA. Molecular analysis of the *cumulus* matrix: Insights from mice with O-glycan-deficient oocytes. *Reproduction.* 2015; 149: 533-543.
 92. Prasad SV, Ghongane BB, Chourishi A, Vakade K, Kunkulol RR. Role of Antioxidants in Male Reproduction. *Int J Physiol Pharmacol,* 2018; 2: 1-6.
 93. Richani D, Gilchrist RB. The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Hum Reprod Update.* 2018; 24: 1-14.
 94. Richani D, Dunning KR, Thompson JG, Gilchrist RB. Metabolic co-dependence of the oocyte and *cumulus* cells: essential role in determining oocyte developmental competence. *Hum Reprod Update.* 2021; 27(1): 27-47.
 95. Rimon-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L, Dekel N. Ovarian folliculogenesis. *Results Probl Cell Differ.* 2016; 58: 167-190.
 96. Rispoli LA, Payton R, Gondro C, Saxton A, Nagle K, Jenkins BW, Schrick F, Edwards JL. Heat stress effects on the *cumulus* cells surrounding the bovine oocyte during maturation: Altered matrix metalloproteinase 9 and progesterone production. *Reproduction.* 2013; 146(2): 193-207.
 97. Rosado-Pérez J, Aguiñiga-Sánchez I, Santiago-Osorio E, Mendoza-Núñez VM. Effect of *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* (Chayote) on oxidative stress and pro-inflammatory markers in older adults with metabolic syndrome: an exploratory study. *Antioxidants.* 2019; 8(5): 146.
 98. Roth Z, Hansen PJ. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol Reprod.* 2004; 71(6): 1898-1906.
 99. Sakatani M. Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced *in vitro*. *J Reprod Dev.* 2017; 63(4): 347-352.
 100. Scialo F, Fernandez-Ayala DJ, Sanz A. Role of mitochondrial reverse electron transport in ROS signaling: potential roles in health and disease. *Front Physiol.* 2017; 8: 428.
 101. Shaieb F, Khan SN, Ali I, Thakur M, Saed MG, Dai J, Awonuga AO, Banerjee J, Abu Soud HM. The defensive role of *cumulus* cells against reactive oxygen species insult in metaphase II mouse oocytes. *Reprod Sci.* 2016; 23(4):498-507.
 102. Shi DS, Avery B, Greve T. Effects of temperature gradients on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Theriogenology.* 1998; 50(4): 667-674.
 103. Silva CF, Sartorelli ES, Castilho ACS, Satrapa RA, Puelker RZ, Razza EM, Ticianelli JS, Eduardo HP, Loureiro B, Barros CM. Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced *in vitro*. *Theriogenology.* 2013; 79(2): 351-357.
 104. Singh WL, Barua PM, Sonowal J. Influence of Media Supplementation with Alpha Tocopherol and/or Epigallocatechin Gallate on *in vitro* Maturation and Subsequent Fertilization of Bovine Oocytes. *J Anim Res.* 2019; 9(6): 863-868.
 105. Sirard MA, Desrosier S, Assidi M. *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *Theriogenology.* 2007; 68: S71-S76.
 106. Soares M, Sousa AP, Fernandes R, Ferreira AF, Almeida-Santos T, Ramalho-Santos J. Aging-related mitochondrial alterations in bovine oocytes. *Theriogenology.* 2020; 157: 218-225.
 107. Sovernigo TC, Adona PR, Monzani PS, Guemra S, Barros FDA, Lopes FG, Leal CLV. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reprod Domest Anim.* 2017; 52(4): 561-569.
 108. Squirrell JM, Lane M, Bavister BD. Altering intracellular pH disrupts development and cellular organization in preimplantation hamster embryos. *Biol Reprod.* 2001; 64: 1845-1854.
 109. Stamperna K, Giannoulis T, Nanas I, Kalemkeridou M, Dadouli K, Moutou K, Amiridis GS, Dovolou E. Short term temperature elevation during IVM affects embryo yield and alters gene expression pattern in oocytes, *cumulus* cells and blastocysts in cattle. *Theriogenology.* 2020; 156: 36-45.
 110. Stamperna K, Dovolou E, Giannoulis T, Kalemkeridou M, Nanas I, Dadouli K, Moutou K, Mamuris Z, Amiridis GS. Developmental competence of oocytes from Holstein and Limousine cows exposed to heat stress *in vitro* matured. *Reprod Domest Anim.* 2021; 56(9): 1302-1314.
 111. Sugimura S, Kobayashi N, Okae H, Yamanouchi T, Matsuda H, Kojima T, Yajima A, Hashiyada Y, Kaneda M, Sato K, Imai K, Tanemura K, Arima T, Gilchrist RB. Transcriptomic signature of the follicular somatic compartment surrounding an oocyte with high developmental competence. *Sci Rep.* 2017; 7: 6815.
 112. Takenaka M, Horiuchi T, Yanagimachi R. Effects of light on development of mammalian zygotes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 14289-14293.

113. Taru SG, Majumdar AC, Bonde S. Chronology of maturational events in goat oocytes cultured *in vitro*. *Small Rum Res.* 1996; 22: 25-30.
114. Taugourdeau A, Desquret-Dumas V, Hamel JF, Chupin S, Boucret L, Ferre-L'Hotellier V, Bouet PE, Descamps P, Procaccio V, Reynier P. The mitochondrial DNA content of *cumulus* cells may help predict embryo implantation. *J Assist Reprod Genet.* 2019; 36: 223-228.
115. Ticianelli JS, Emanuelli IP, Satrapa RA, Castilho ACS, Loureiro B, Sudano MJ, Paula-Lopes FF. Gene expression profile in heat-shocked Holstein and Nelore oocytes and *cumulus* cells. *Reprod Fertil Dev.* 2017; 29(9): 1787-1802.
116. Uyar A, Torrealday S, Seli E. *Cumulus* and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertil Steril.* 2013; 99(4): 979-997.
117. Vernon M, Stern JE, Ball GD, Wining D, Mayer J, Racowsky C. Utility of the national embryo morphology data collection by the Society for Assisted Reproductive Technologies (SART): correlation between day-3 morphology grade and live-birth outcome. *Fertil Steril.* 2011; 95(8): 2761-2763.
118. Verruma CG, Eiras MC, Fernandes A, Vila RA, Furtado CLM, Ramos ES, Lôbo RB. Folic acid supplementation during oocytes maturation influences *in vitro* production and gene expression of bovine embryos. *Zygote.* 2021; 29(5): 342-349.
119. Viana JHM. The number of *in vitro*-produced cattle embryos worldwide is now fivefold greater than that of *in vivo*-derived embryos. *Embryo Technology Newsletter.* 2024; 42(4). Disponible en: <https://www.iets.org/Committees/Data-Retrieval-Committee>. Último acceso: 20 julio 2025.
120. Voronina E, Wessel GM. The regulation of oocyte maturation. *Curr Top Dev Biol.* 2003; 58: 53-110.
121. Watson AJ. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J Anim Sci.* 2007; 85: E1-E3.
122. Wang YS, Zhao X, Su JM, An ZX, Xiong XR, Wang LJ, Zhang Y. Lowering storage temperature during ovary transport is beneficial to the developmental competence of bovine oocytes used for somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci.* 2011; 124(1-2): 48-54.
123. Will MA, Clark NA, Swain JE. Biological pH buffers in IVF: help or hindrance to success. *J Assist Reprod Genet.* 2011; 28: 711-724.
124. Wrenzycki C, Stinshoff H. Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes. *Reprod Domest Anim.* 2013; 48(1): 38-43.
125. Wu B, Tong J, Leibo SP. Effects of cooling germinal vesicle-stage bovine oocytes on meiotic spindle formation following *in vitro* maturation. *Mol Reprod Dev.* 1999; 54(4): 388-395.
126. Xiao X, Zi XD, Niu HR, Xiong XR, Zhong JC, Li J, Li W, Yong W. Effect of addition of FSH, LH and proteasome inhibitor MG132 to *in vitro* maturation medium on the developmental competence of yak (*Bos grunniens*) oocytes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014; 12(1): 30.
127. Yang Z, Wei Y, Fu Y, Wang X, Shen W, Shi A, Zhang H, Li H, Song X, Wang J, Jin M, Zheng H, Tao J, Wang Y. Folic acids promote *in vitro* maturation of bovine oocytes by inhibition of ferroptosis via upregulated glutathione and downregulated Fe²⁺ accumulation. *Anim Reprod Sci.* 2024; 270: 107605
128. Yang SG, Park HJ, Kim JW, Jung JM, Kim MJ, Jegal HG, Kim IS, Kang MJ, Wee G, Yang HY, Lee YH, Seo JH, Kim SU, Koo DB. Mito-TEMPO improves development competence by reducing superoxide in preimplantation porcine embryos. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 10130.
129. Zhang T, Fan X, Li R, Zhang C, Zhang J. Effects of pre-incubation with C-type natriuretic peptide on nuclear maturation, mitochondrial behavior, and developmental competence of sheep oocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 497(1): 200-206.
130. Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu ZB. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. *Int J Mol Med.* 2019; 44(1): 3-15.
131. Zhu ZY, Chen DY, Li JS, Lian L, Lei L, Han ZM, Sun QY. Rotation of meiotic spindle is controlled by microfilaments in mouse oocytes. *Biol Reprod.* 2003; 68(3): 943-946.