



Universidad de la República
Licenciatura en Biología Humana
Informe de Pasantía de Grado

**Estrategias para potenciar la capacidad de desarrollo
de ovocitos bovinos.**

Autor: Bruno Francisco Barcelona Cabrera

Tutor: Dr. Francisco Báez

Orientador de Pasantía: Dr. Francisco Báez

Lugar de realización: Laboratorio de Producción *In Vitro*, CENUR Noreste, Sede Tacuarembó.

Tacuarembó, mayo 2025.

Índice:

1. Resumen.....	3
2. Introducción.....	4
3. Revisión bibliográfica.....	7
3.1. Descripción de procedimientos estándares de producción <i>in vitro</i> (PIV) de embriones bovinos.....	7
3.1.1. Maduración <i>in vitro</i> (MIV).....	7
3.1.2. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV).....	8
3.1.3. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	8
3.1.4. Cultivo en incubadoras Time-Lapse.....	9
3.2. Efectos negativos del estrés calórico sobre los ovocitos.....	10
3.3. Uso de α -tocoferol.....	12
3.4. Efecto de la tensión de oxígeno.....	13
3.5. Acetilación de histonas.....	14
4. Objetivos.....	15
4.1. Objetivo general.....	15
4.2. Objetivos específicos.....	15
5. Metodología.....	16
5.1. Diseño experimental.....	16
5.2. Obtención y búsqueda de COCs.....	18
5.3. Maduración <i>in vitro</i>	18
5.4. Fecundación <i>in vitro</i>	18
5.5. Cultivo <i>in vitro</i>	19
5.6. Evaluación de la progresión meiótica y fecundación en ovocitos.....	19
5.7. Producción de ROS.....	19
5.8. Tinción de apoptosis.....	20
5.9. Expresión de genes.....	20
5.10. Acetilación de histona H3 (H3K9).....	21
5.11. Análisis estadístico.....	22
6. Resultados.....	23
6.1. Efectos del α -tocoferol sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos.....	23
6.2. Efecto de estación y la tensión de oxígeno sobre capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos.....	26
6.3. Acetilación de histona H3 (H3K9).....	29
7. Discusión.....	30
7.1. Suplementación con α -tocoferol.....	30
7.2. Efecto de la tensión de oxígeno.....	31
7.3. Acetilación de histona H3 (H3K9).....	32
8. Conclusiones.....	33
9. Referencias bibliográficas.....	34

1. Resumen

La producción *in vitro* (PIV) de embriones bovinos se practica en todo el mundo para fines comerciales y de investigación. Una de las ventajas de la práctica de esta biotecnología es que el embrión bovino es particularmente adecuado para abordar ciertas preguntas en biología celular y combina ventajas técnicas para estudiar fenómenos biológicos únicos. Debido a la similitud en la cinética embrionaria entre bovinos y humanos, la PIV en bovinos es un modelo relevante para la biología reproductiva y medicina humana. Para la realización de este trabajo de pasantía se tomó el embrión bovino como modelo para la adquisición de conocimientos y competencias relacionadas con la PIV, con la proyección para futuras aplicaciones en embriones humanos. El presente proyecto se desarrolló en el laboratorio de Producción *In Vitro* de embriones del CENUR-Noreste de la Sede Tacuarembó. Haciendo uso de la biotecnología *in vitro*, en combinación de la microscopía de fluorescencia y técnicas moleculares, se estudió el impacto estacional, el uso de α -tocoferol y la tensión de oxígeno sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos provenientes de vacas para carne en sistemas pastoriles en la Región Norte del Uruguay. En primer lugar, se comprobó que la suplementación con α -tocoferol mejora significativamente el potencial de desarrollo de los ovocitos recolectados durante el verano, lo que resulta en mejores tasas de maduración, división y proporción de blastocistos. Segundo, se demostró que la alta tensión de oxígeno en los procesos de maduración y fecundación *in vitro* exacerban los efectos negativos que tiene el estrés calórico experimentado en verano sobre los ovocitos bovinos. Asimismo, se comprobó que el uso de una baja tensión podría ser un método viable para obtener embriones de mejor calidad. Por último, se estandarizó la técnica de tinción inmunohistoquímica para identificar la acetilación de histonas, lo que representa un importante aporte a las metodologías del laboratorio destinadas a evaluar la calidad de los embriones producidos. Este trabajo puede contribuir significativamente en las estrategias para mejorar la eficiencia de la producción de embriones en el ganado bajo condiciones ambientales altamente estresantes.

2. Introducción

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) se practican en todo el mundo con fines comerciales y de investigación (Ferré et al., 2020). Entre ellas, en especial, la Producción *In Vitro* (PIV) de embriones se ha desarrollado a lo largo del tiempo gracias a los avances en la investigación y la biotecnología (Hasler, 2014). Estas técnicas son de gran importancia porque permiten la reproducción de animales de interés zootécnico o avances en la medicina reproductiva de manera más efectiva y controlada, lo que puede tener beneficios significativos para la salvaguarda de la producción de alimentos y la investigación biomédica (Fernández, 2021).

Las TRA surgieron a partir de la necesidad de superar ciertos problemas de reproducción en animales, como la infertilidad, las bajas tasas de nacimientos y la propagación de enfermedades genéticas. Estas técnicas incluyen la inseminación artificial, la fecundación *in vitro*, el diagnóstico genético preimplantacional, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, la criopreservación (de gametos y embriones) y la transferencia de embriones a receptoras. A medida que se han ido desarrollando nuevas técnicas, las TRA se han vuelto cada vez más sofisticadas y precisas (Souza, 2019). En el informe más reciente de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (IETS) destaca que desde 2016, la cantidad de embriones bovinos derivados *in vivo* fue superada por los embriones producidos *in vitro*, los cuales representan el 80% del total de embriones bovinos transferidos (Valente *et al.*, 2022).

Aunque, en primera instancia, el promotor del avance en las técnicas de reproducción asistida haya sido de su aplicación casi exclusivamente en animales, los avances en estas técnicas son aplicables entre especies y particularmente en humanos, ya que los embriones bovinos representan un modelo útil para comprender y estudiar la embriogénesis de la especie humana debido a varias similitudes biológicas (Speckhart et al., 2022). En el trabajo de Santos et al. (2014), se demostró que el desarrollo embrionario en bovinos y humanos transcurre en tiempos muy similares, desde la maduración del ovocito hasta las primeras etapas del desarrollo del embrión, como el estadio de dos células, blastocisto expandido e incluso los eclosionados. Por tanto, todos los procesos en relación con los protocolos de maduración, fecundación y cultivo *in vitro*, al igual que los métodos invasivos o no invasivos en embriones humanos, podrían simularse, en parte, con el modelo

bovino.

Esto último parece adquirir una relevancia significativa en las últimas décadas ya que ha permitido el desarrollo de técnicas y tratamientos para muchos problemas que afligen a la medicina moderna (Hernández y Dorticós, 2004). En primera instancia la que más ha marcado el futuro de estas técnicas es la medicina regenerativa, teniendo como base la utilización de células madre que pueden extraerse de embriones en estadios tempranos y con capacidad de desarrollar cualquier tejido, con un alto potencial para aplicarse en el tratamiento de enfermedades como diabetes tipo I, enfermedades cardiovasculares, enfermedades de las células sanguíneas, entre otras (Arias y Felmer, 2009). Por otra parte, existen otras problemáticas que afectan a muchos países, especialmente a Uruguay, que presenta un descenso en la fecundidad sin precedentes, pasando de una tasa de fertilidad de 2,0 en 2016 a 1,37 en 2022, muy por debajo de la tasa de reemplazo (Cabella et al., 2024). Si bien éste fenómeno sostiene una explicación multicausal, revela un factor fundamental, que es la infertilidad, la cual se ha situado como uno de los problemas de la esfera reproductiva en los países que atraviesan transiciones demográficas (Bazzano et al., 2017).

Hoy en día, para tratar estas dificultades se utilizan técnicas de alta complejidad (Bazzano et al., 2017). Sin embargo, los resultados de los tratamientos correspondientes a dicho período reflejaron una proporción de partos, en relación con las transferencias de embriones realizadas, de un 29,1%. Aunque este porcentaje demuestra una eficacia que se compara a países del primer mundo, como es el caso de España, mantiene unos rangos bajos y queda evidenciada la falta de optimización de las técnicas aplicadas (Bazzano et al., 2017).

Por tanto, realizar un adecuado entrenamiento en las técnicas de reproducción asistida y una evaluación exhaustiva de embriones producidos *in vitro*, tomando como modelo la especie bovina (dada las limitaciones bioéticas de este tipo de prácticas en la especie humana), parece un procedimiento adecuado para la formación de recursos humanos. En este sentido, el modelo bovino posee características favorables, entre ellas: la amplia disponibilidad de gametos (gran número de ovarios provenientes del frigorífico local y facilidad para acceder a semen bovino congelado), la larga experiencia y estandarización mundial de protocolos de PIV de embriones en esta especie y, la existencia de un genoma de referencia bovino extensamente anotado, lo que permite realizar diversas pruebas

moleculares.

En el laboratorio de Producción *In Vitro* de la Sede Tacuarembó se han formado estudiantes de grado y posgrado en base a proyectos de investigación, que tienen como objetivo estudiar el impacto del estrés calórico sobre el desarrollo embrionario de bovinos, un problema que se ha visto agravado por el cambio climático. El laboratorio está diseñado de acuerdo con normas internacionales para descender al mínimo los niveles de contaminación; equipado con una cámara de flujo laminar horizontal para garantizar esterilidad, mientras se trabaja con la preparación de medios de cultivo, y manipulación de gametos y embriones. Además, cuenta con equipos de última generación lo que garantiza un desempeño eficiente de las biotecnologías reproductivas. Se cuenta con la acreditación para llevar a cabo estas prácticas con animales de experimentación, con el recurso humano y técnicas-procedimientos estandarizados. Actualmente, el desafío, en esta nueva etapa de investigación, es poner a punto técnicas en biología molecular como la PCR en tiempo real, para estudiar el impacto de la estación sobre el perfil transcripcional de ovocitos y embriones preimplantacionales.

Este informe final de pasantías, llevado a cabo en el laboratorio de Producción *in vitro* de la Sede Tacuarembó, fue desarrollado en dos etapas. En la primera, se realizó la revisión bibliográfica sobre: la producción *in vitro* de embriones bovinos, el efecto del estrés calórico sobre el desarrollo ovocitario y embrionario, la descripción de algunas estrategias de atenuación, y la fundamentación de algunas técnicas actuales de evaluación embrionarias, que se describen a continuación. En la segunda etapa, se describe la realización de dos experimentos y la estandarización de una técnica de evaluación embrionaria. El primer experimento tuvo como objetivo analizar el efecto estacional del α -tocoferol sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos expuestos o no al estrés calórico. Cabe mencionar que este trabajo fue publicado recientemente en la revista [Animal Reproduction](#). El segundo experimento fue realizado con el objetivo de evaluar el efecto de la alta y baja tensión de oxígeno durante la MIV-FIV sobre el índice de apoptosis y la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y apoptótico en embriones bovinos. Por último, se estandarizó la tinción de acetilación de histonas como una técnica para evaluar el potencial de desarrollo embrionario *in vitro* en bovinos.

3. Revisión bibliográfica

3.1. Descripción de procedimientos estándares de producción *in vitro* (PIV) de embriones bovinos

La PIV de embriones bovinos permite la obtención en el laboratorio de un gran número de embriones en el mismo estadio de desarrollo que pueden utilizarse tanto para estudios científicos, como para fines comerciales (Hasler, 2014). La optimización de esta técnica ha requerido una profundización en los conocimientos sobre calidad y origen de los gametos, la maduración, fecundación, y las condiciones de cultivo *in vitro* (Báez y Rodríguez-Osorio, 2024). En la actualidad, la obtención de ovocitos de ovarios recuperados de los frigoríficos o de hembras vivas por punción transvaginal guiada ecográficamente (*Ovum Pick-up*) y su posterior cultivo, permiten la producción de embriones que pueden ser criopreservados o bien transferidos a hembras receptoras (Hasler, 2014).

La PIV de embriones consta de tres pasos principales: maduración *in vitro* de complejos cumulus-ovocito (COCs), la fecundación *in vitro* de los ovocitos maduros con espermatozoides capacitados y finalmente el cultivo *in vitro* de los presuntos cigotos durante un período de 7, 8 ó 9 días.

3.1.1. Maduración *in vitro* (MIV)

El proceso de MIV permite obtener ovocitos maduros sin la necesidad de recurrir a la estimulación ovárica con gonadotrofinas. Esta técnica implica la extracción de los COCs de los folículos antrales y su posterior cultivo hasta que alcanzan la metafase II (Roelen, 2020). El tiempo requerido para alcanzar la mayor tasa de ovocitos en metafase II más cuerpo polar es de 24 horas, con una atmósfera de 5% CO₂ (Caínzos, 2012). Los medios más frecuentemente utilizados para la MIV de los ovocitos son complejos. Para la especie bovina es habitual el uso de TCM-199, y suplementado con piruvato, suero fetal bovino (hasta 10%), hormonas folículo estimulante, luteinizante, coriónica equina y antibiótico (Speckhart et al., 2022).

La valoración de la progresión meiótica consiste en dos técnicas complementarias. En primer lugar, se valora el grado de expansión de las células del cúmulus y se lo clasifica como expansión ligera, moderada o total, siendo este último representativo de una maduración

exitosa (Zabihi et al. 2020). Posteriormente, el ovocito pasa por un proceso de denudación de las células del cumulus mediante agitación mecánica y se aplica una tinción con el compuesto Hoechst 33342, el cuál tiñe el DNA. Utilizando un microscopio de fluorescencia se observa el estadio de la cromatina. Los ovocitos que se encuentran en los estadios de vesícula germinal, metafase I, ana-telo I y telofase I son clasificados como inmaduros; mientras que los que presentan una metafase II + cuerpo polar son clasificados como maduros (Ambroggi et al., 2017). En esta etapa se espera que al menos el 80-85% de los ovocitos puestos en cultivo alcancen la metafase II (Roelen, 2020).

3.1.2. Fecundación *in vitro* (FIV)

La fecundación es la etapa que asegura la formación de un nuevo individuo a partir de dos gametos, uno masculino y otro femenino. Tras la fusión de los gametos, los dos sets de cromosomas haploides se asocian en el huso mitótico y se produce la primera división mitótica embrionaria. Para que este proceso ocurra satisfactoriamente, varios eventos deben producirse: (i) penetración del espermatozoide a través de las envolturas ovocitarias, (ii) interacción del espermatozoide con la zona pelúcida, (iii) fusión ovocito-espermatozoide, (iv) activación del ovocito, (v) descondensación del núcleo espermático y formación de los pronúcleos (PN), (vi) desarrollo de los PN masculino y femenino y su migración al centro del ovocito, (vii) asociación de los cromosomas paternos al huso mitótico de la primera división celular (Plachot, 2000). Para lograr la fecundación bajo condiciones *in vitro*, los espermatozoides deben ser seleccionados y capacitados. Para este fin, pasan un periodo de tiempo (alrededor de 1 hora) en el medio suplementado con albúmina sérica bovina (Speckhart et al., 2022). Posteriormente, son unidos con los ovocitos madurados en medio FIV por 22 horas a 5% CO₂ y atmósfera húmeda. La tasa de ovocitos normalmente fecundados (2 PN) es un dato del éxito de las etapas previas (MIV y FIV) y aseguraría una buena proporción de blastocistos. Varios laboratorios emplean de manera rutinaria la valoración de la tasa de fecundación con una metodología similar a la de la maduración de los ovocitos (Caínzos, 2012).

3.1.3. Cultivo *in vitro* (CIV)

El CIV tiene como objetivo simular las condiciones *in vivo* en las que el embrión se desarrolla normalmente. A lo largo de los años las condiciones y características del medio de

cultivo se han optimizado de acuerdo con los avances en la comprensión de los requerimientos bio-energéticos del embrión durante su desarrollo y, de qué manera este interactúa con el medio y los componentes que allí se encuentran. A su vez, también se han tenido en cuenta los posibles desechos que se pueden producir en el proceso y de qué manera afectan su desarrollo (Gonella et al., 2013; Palma, 2018). El medio más utilizado a nivel mundial para los procesos de CIV es el denominado SOF, que se traduce como *Fluido de Oviducto Sintético*. Como su nombre indica, este medio busca proporcionar al embrión los componentes presentes de forma natural en el oviducto materno, los cuales son esenciales para su desarrollo. En términos generales, el SOF está compuesto por agua ultrapura, sales inorgánicas, aminoácidos, piruvato, albúmina sérica bovina, gentamicina, myo inositol, citrato, entre otros (Holm et al., 1999).

Luego de transcurrido el proceso de FIV los presuntos cigotos son transferidos al medio de cultivo. Durante esta etapa, el cigoto, que inicialmente es una sola célula de gran tamaño, experimenta una serie de divisiones sucesivas, que dan lugar a múltiples células más pequeñas. La primera evaluación se realiza el día dos o tres del CIV, donde el embrión se clasifica según la cantidad de células que lo componen (2, 4, 8, y 16), hasta alcanzar la fase de mórula (Gonella et al., 2013).

Conocer la cinética habitual del desarrollo embrionario permite evaluar su viabilidad durante el cultivo. La tasa de división se determina según la cantidad de embriones que se han dividido al día 2 posterior a la fecundación; mientras que la tasa de blastocistos se calcula a partir de la cantidad de blastocistos presentes al día 9 (Palma, 2018). Otra de las condiciones habituales de cultivo es que se realice en una atmósfera del 5% CO₂, 5% O₂, balance de N₂ y alta humedad (Ferré et al., 2020).

3.1.4. Cultivo en incubadoras Time-Lapse

Durante el cultivo desde el estadio de cigoto hasta el de blastocisto, el embrión atraviesa cambios morfológicos dinámicos cuya cinética específica determina su capacidad de desarrollo. Evaluar la calidad embrionaria solo en el estadio de blastocisto, como se hace en incubación convencional, es un enfoque estático, limitado y en muchos casos insuficiente. En cambio, el sistema de incubadoras *Time-Lapse*, introducido hace más de dos décadas (Payne et al., 1997), permite obtener imágenes de alta calidad en tiempo real. Dichos sistemas están equipados con varias placas, un microscopio y una cámara integrados,

que permiten monitorear de forma continua, no invasiva y automatizada el desarrollo embrionario, evaluando la morfología y la cronología en cada etapa, lo que habilita a realizar una mejor selección de los embriones con mayor potencial de implantación y gestación (Yaacobi-Artzi et al., 2022).

La obtención de imágenes de alta calidad en ‘tiempo real’ permite registrar datos morfocinéticos detallados durante todo el proceso, desde la maduración del ovocito hasta el desarrollo embrionario que son imposibles de obtener mediante el uso de métodos convencionales. Además, el uso de incubadoras equipadas con esta tecnología optimiza el consumo de gases, lo que contribuye a una reducción significativa en los costos asociados a la PIV (Payne et al., 1997). Gracias a estas ventajas, la tecnología *time-lapse* representa una incorporación prometedora para mejorar la calidad de los embriones producidos, así como los datos que se pueden extraer, a partir de los datos almacenados que permitirían su observación y profundo análisis.

3.2. Efectos negativos del estrés calórico sobre los ovocitos

Estudios realizados en el noreste de Uruguay demostraron que, durante el entore, que ocurre en verano, se presentan condiciones de estrés calórico y que, en veranos muy calurosos, se ve afectado el momento de la concepción en vacas para carne (Santa Cruz et al., 2019). Vacas de las razas Hereford, Angus y sus cruza, muestran un aumento lineal de la temperatura vaginal a partir de un Índice de Temperatura y Humedad (ITH) superior a 72,8, lo que conduciría a una reducción en la tasa de preñez (Fedrigo et al., 2021). Esto es particularmente relevante, considerando que la reducción de la fertilidad en los bovinos, a causa del estrés calórico, no se limita a los meses calurosos (verano) sino que puede persistir hasta el otoño (Roth 2008). Se ha documentado que el impacto negativo del estrés calórico ocurre a diferentes niveles en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, afectando incluso el ambiente uterino (Wolfenson 2000). Existen evidencias, tanto *in vivo* como *in vitro*, que muestran que el ovocito es la estructura más sensible a los efectos deletéreos causados por el estrés calórico materno (Torres-Júnior et al., 2008; Gendelman y Roth, 2012).

Haciendo uso del modelo *in vitro*, Báez et al. (2022) demostraron que el estrés calórico durante el verano aumenta los niveles de fragmentación del DNA en células del cúmulus y reduce la tasa de blastocistos en comparación con lo observado durante el

invierno. Estos hallazgos aportan a resultados que sugieren que el verano ejerce un efecto deletéreo sobre el desarrollo de la competencia en ovocitos (Gendelman et al., 2012) y espermatozoides (Morell, 2020), que se manifiesta en un retraso en el desarrollo embrionario (Yaacobi-Artzi et al., 2022), baja calidad de los blastocistos (Báez et al., 2022) y alteraciones en la expresión génica (Yaacobi-Artzi et al., 2022; Gendelman et al., 2010; Llamas et al., 2020).

Recientemente, Yaacobi-Artzi et al. (2022) reportaron que durante el verano las tasas de blastocistos PIV fueron significativamente menores que durante el invierno, lo que explicaría, en parte, la reducción de las tasas de preñez en las vacas durante las épocas más calurosas. Si bien, la reproducción en bovinos está influenciada por muchos factores externos, incluida la nutrición, la sanidad, y el manejo, las condiciones climáticas en particular, tienen un impacto determinante (Rahman et al., 2018; Dovolou et al., 2023; Li et al., 2023).

Cada vez más evidencias sugieren que tanto las condiciones ambientales (Baruselli et al., 2020; Crean e Immler, 2021) como las del CIV pueden impactar el potencial de desarrollo embrionario (Shahzad et al., 2020). Entre otros mecanismos, el estrés calórico induce daño en el ovocito y afecta el desarrollo embrionario al generar un desequilibrio en la producción de especies oxígeno reactivas (ROS), incluyendo anión superóxido, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico (Yaacobi-Artzi et al., 2020). El aumento en los niveles de ROS implica varios tipos de daño celular como la peroxidación lipídica de las membranas, oxidación de ácidos nucleicos, apoptosis y necrosis (Guérin et al., 2001; Feng et al., 2024).

Diversos estudios han demostrado que moléculas termoprotectoras, como los antioxidantes y factores de crecimiento, ayudan a mitigar el daño celular causado por altas temperaturas en ovocitos bovinos y ovinos. Su accionar contribuye a restaurar la actividad mitocondrial, fortalecer la respuesta al estrés oxidativo, estabilizar la membrana celular e impedir la apoptosis mediada por caspasas. Entre dichas moléculas encontramos a: astaxantina, resveratrol, derivados de la vitamina A, coenzima Q10, cisteína, IGF-1 y vitamina E o α -tocoferol (Zabihi et al., 2020; Báez et al., 2021; Barrera et al., 2023; Tripathi et al., 2023).

3.3. Uso de α -tocoferol

El estrés calórico puede inducir o agravar los efectos del estrés oxidativo en el ganado. Varios trabajos en bovinos han demostrado que las consecuencias negativas del estrés calórico en el desempeño reproductivo de los animales pueden tener una explicación a nivel molecular, basada en la reducción de los niveles séricos de antioxidantes como la vitamina A y E, así como en un aumento en la producción de ROS (Chauhan et al., 2021).

Aunque las ROS participan en la regulación de funciones celulares y activan distintas vías de señalización, en exceso, pueden estar implicadas en diversos tipos de daños celulares. Ovocitos que presentan daños a nivel mitocondrial, han mostrado una capacidad reducida para neutralizar las ROS, y una capacidad de desarrollo embrionario más baja (Tripathi et al, 2023). Bajo condiciones *in vivo*, por acción de sistemas antioxidantes, el efecto deletéreo de ROS puede ser neutralizado, pero en condiciones *in vitro* una vez que las concentraciones superan el límite en el que los sistemas antioxidantes propios de la célula pueden contrarrestar las ROS, donde cosecuentemente la posibilidad de muerte celular aumenta (Tripathi et al, 2023). Dadas las limitaciones que las condiciones *in vitro* presentan, es importante reconocer qué moléculas se pueden incorporar a los distintos medios en las diferentes etapas del proceso y que puedan tener efecto antioxidante que proteja a las células del estrés oxidativo.

Varios estudios indican que la presencia de antioxidantes, como la vitamina E o el α -tocoferol, puede revertir muchos de estos efectos adversos causados por las ROS. Esta molécula, de naturaleza lipídica, se suplementa al medio de maduración diluída en etanol (Báez et al., 2021) y es considerada un antioxidante porque protege a la célula contra la lipoperoxidación al eliminar los radicales peroxilo. Además, su incorporación en los medios de cultivo se asocia con una mayor proporción y calidad de blastocistos PIV en varias especies; asociando su efecto al incremento en la actividad de genes antioxidantes como, por ejemplo, *CAT*, *SOD1* y *SOD2* (Arias-Alvarez et al., 2018; Báez et al., 2021; Tripathi et al., 2023).

Trabajos realizados recientemente en el laboratorio de Producción *In Vitro*, demostraron que la adición de 100 μ M de α -tocoferol durante la MIV mejora la competencia de desarrollo de los ovocitos bovinos recolectados durante la temporada de verano, lo que conduce a un aumento en la producción de blastocistos y una mayor calidad de los

embriones (Báez et al., 2021). Sin embargo, el efecto beneficioso que posee la suplementación con α -tocoferol durante la MIV no ha sido comprobado en las estaciones más frescas. Por tanto, se plantea la hipótesis que la suplementación con 100 μ M de α -tocoferol durante la MIV mejora las capacidades de desarrollo de los ovocitos bovinos tanto en primavera como en verano.

3.4. Efecto de la tensión de oxígeno

Es frecuente que, para disminuir costos durante la PIV de embriones bovinos, la MIV de los ovocitos y la FIV de los ovocitos madurados se lleven a cabo a tensión de oxígeno atmosférica (~20%). Esta tensión es mucho mayor a la encontrada en el folículo (<5-14%), el oviducto (~2%) y el útero de la hembra bovina (1,5-8% O₂) (Harvey, 2007).

He et al., (2020) encontraron que el 5% de O₂ durante la MIV-FIV mejora la maduración de los ovocitos, el desarrollo del embrión, y aumenta el número de células en blastocistos. Trabajos realizados en el laboratorio de Producción *In Vitro* afirman que la aplicación de un 5% de O₂ en todas las fases de PIV de embriones mejora la criotolerancia y expresión de genes relacionados con la calidad de los blastocistos bovinos (Báez et al., 2024).

La alta tensión de oxígeno puede causar un incremento en la producción de ROS (Harvey 2007), con lo que el ambiente hiperóxico generado podría exacerbar la magnitud de los daños que experimentan los ovocitos que son expuestos a altas temperaturas (Hashimoto et al., 2000). En el trabajo realizado por Rodríguez et al. (2023) en el Norte del país, se demostró que la estación del año y la tensión de oxígeno, durante la maduración y fecundación *in vitro* afectaron significativamente las tasas de división temprana, la tasa de blastocistos y la calidad de los embriones. Los ovocitos bovinos recolectados en invierno y, madurados y fecundados usando 5% de O₂ obtuvieron mejores tasas de desarrollo; mientras que los ovocitos recolectados en verano y que además fueron sometidos a 20% de O₂ durante la maduración y la fecundación, tuvieron tasas de desarrollo significativamente menores ($P<0,05$).

Estos hallazgos sugieren que el estrés calórico, sumado a la alta tensión de oxígeno, tiene un efecto negativo acumulativo sobre la capacidad de desarrollo de los ovocitos. Adicionalmente, plantean que el uso de una baja tensión de oxígeno mitiga los efectos

negativos del estrés calórico antes mencionados. A pesar de que estos descubrimientos son cruciales para una mejora en la PIV de embriones, se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales son efectivos. Por lo tanto, estudiar la expresión de genes como los referentes a estrés oxidativo, estrés calórico, apoptosis y potencial de desarrollo son de interés para comprender los mecanismos involucrados y generar herramientas para revertir los daños ocasionados por las condiciones ambientales experimentadas durante el verano.

3.5. Acetilación de histonas

Las modificaciones en el perfil epigenético de las células desempeñan un papel fundamental durante todas las etapas del desarrollo embrionario, ya que regulan el metabolismo celular, median las respuestas a estímulos y condiciones ambientales, favorecen la supervivencia celular y permiten un desarrollo adecuado (Brooker, 2012; Ispada et al., 2021). Las alteraciones covalentes en la estructura química de las histonas (proteínas alrededor de las cuales el DNA se enrolla) influyen en la conformación estructural de la cromatina, promoviendo así su compactación o relajación. Una cromatina compacta impide el acceso de los factores de transcripción y de la maquinaria transcripcional, lo que resulta en una menor actividad génica. En cambio, una cromatina relajada facilita dicho acceso, favoreciendo así un estado transcripcionalmente activo (Jenuwein y Allis 2001; Brooker, 2012; Ispada et al., 2021). El proceso de adición de un grupo acetilo a los residuos de lisina en las colas de las histonas, provoca una relajación del material genético. Este proceso es conocido como acetilación y hace más accesible la cromatina para los factores de transcripción y, por lo tanto, promueve la expresión génica (Brooker, 2012). En modelos porcinos y murinos se ha descrito el proceso de acetilación de histonas como esencial para lograr una correcta maduración del ovocito. Adicionalmente, en bovinos se ha encontrado evidencia de que es a partir de los mecanismos de desmetilación del material nuclear, durante el desarrollo embrionario preimplantacional, que la maquinaria celular obtiene acceso al material genético altamente metilado de los gametos paternos y puede así, reprogramarlo para generar blastómeros totipotentes (Saraiva et al., 2022).

A través del uso de técnicas inmunohistoquímicas se puede efectuar la identificación de mecanismos como la metilación, acetilación y fosforilación de histonas en muestras biológicas y, explicar los procesos de transcripción activa o silenciamiento de genes (Ispada

et al., 2021). En este trabajo se tuvo en cuenta los experimentos realizados por Zuo et al. (2020), los investigadores explican procedimientos que utilizan anticuerpos para marcar la acetilación del residuo de lisina 9 de la histona H3 (H3K9), y detallan cómo esta técnica, mediante el análisis de intensidad de fluorescencia, permite cuantificar la transcripción activa de genes.

En consideración de lo expresado anteriormente y con la existencia de evidencia que sugiere que las TRA podrían influir en procesos epigenéticos como la metilación del DNA y las modificaciones de histonas (Saraiva et al., 2022), es importante implementar la tinción inmunohistoquímica como método para los análisis del potencial de desarrollo embrionario para futuros trabajos a realizarse en el laboratorio.

En virtud de la información presentada en las secciones anteriores se plantearon los siguientes objetivos.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Estudiar diferentes estrategias para potenciar la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos expuestos a altas temperaturas.

4.2. Objetivos específicos

- Actualizar los conocimientos relacionados con las biotecnologías reproductivas.
- Evaluar el efecto estacional del uso de α -tocoferol sobre la capacidad de desarrollo en ovocitos.
- Valorar el efecto de la estación y la tensión de oxígeno sobre la expresión de genes en blastocistos bovinos producidos *in vitro*.
- Estandarizar la tinción de la histona H3 en blastocistos bovinos PIV.

5. Metodología

5.1. Diseño experimental

El primer experimento se describe en la Figura 1. Los complejos cumulus-ovocito (COCs) fueron colectados durante la primavera (10 de noviembre - 15 de diciembre 2023) y el verano (16 de enero - 22 de febrero 2024). Un grupo de COCs fueron madurados con 0,05% de etanol sin α -tocoferol (control) y otro grupo con 0,05% de etanol + 100 μ M α -tocoferol. En este experimento fue evaluada la tasa de maduración (24 hs), tasa de fecundación (20 hs post-inseminación), desarrollo embrionario temprano (día 3), producción de blastocistos tempranos, expandidos y eclosionados (día 9). En los blastocistos expandidos se evaluó la calidad mediante la producción de ROS, índice de apoptosis (tinción de TUNEL) y expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo (*HSPA1A* y *CAT*), apoptosis (*BAX* y *BCL2*), reconocimiento materno de la preñez (*IFNT2*), transporte de membrana (*AQP3*) y pluripotencia (*OCT4*).

El segundo experimento se describe en la Figura 2. Los COCs fueron colectados durante el invierno (20 de diciembre de 2021 - 15 de febrero de 2022) y el verano (12 de junio - 28 de agosto de 2022). Para cada estación, un grupo de COCs fueron madurados y fecundados *in vitro* a 5% CO₂, 20% de O₂ y N₂ balanceado; mientras que el un segundo grupo fue madurado y fecundado *in vitro* a 5% CO₂, 5% de O₂ y N₂ balanceado. Posteriormente, los presuntos cigotos de ambos grupos fueron cultivados *in vitro* a una atmósfera de 5% CO₂, 5% de O₂, con N₂ balanceado y a una temperatura de 38,5°C. En este experimento fue evaluada la tasa de desarrollo de blastocistos tempranos, expandidos y eclosionados al día 8, y su calidad mediante el índice de apoptosis (tinción de TUNEL) y expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo (*SOD2*, *CAT*) y apoptosis (*BAX*, *BCL2*).

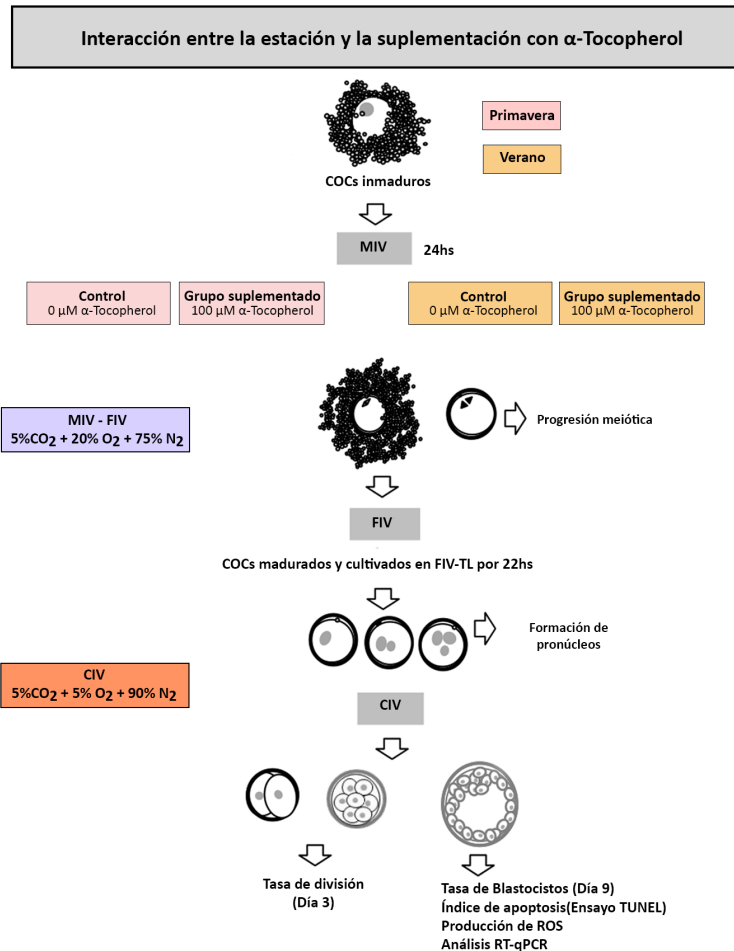


Figura 1. Representación gráfica del diseño experimental sobre la interacción entre la estación y la suplementación con α -tocoferol. MIV, maduración *in vitro*; FIV, fecundación *in vitro*; CIV, cultivo *in vitro*; RT-qPCR, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

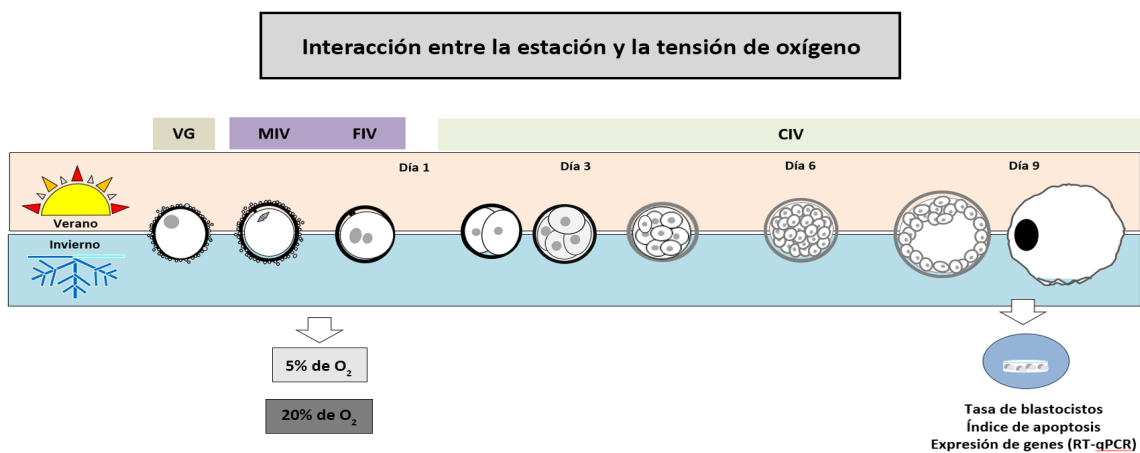


Figura 2. Representación gráfica del diseño experimental sobre la interacción entre la estación y la tensión de oxígeno. VG, ovocitos inmaduros; MIV, maduración *in vitro*; FIV, fecundación *in vitro*; CIV, cultivo *in vitro*; RT-qPCR, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

En la última actividad de estas pasantías, se estandarizó la técnica de acetilación de histonas en donde se utilizaron blastocistos expandidos y eclosionados provenientes de diversas repeticiones de los experimentos anteriormente mencionados y, el procedimiento realizado se explica en detalle en la sección 5.10.

5.2. Obtención y búsqueda de COCs

Los ovarios utilizados fueron obtenidos de animales faenados en un frigorífico local. Los COCs se obtuvieron mediante aspiración folicular. Esta técnica consistió en el uso de una jeringa de 18G con la que se extrajo los folículos superficiales de los ovarios y se depositó el líquido extraído en un tubo de 50 mL, para luego realizar la búsqueda bajo un microscopio estereoscópico. Se seleccionaron los COCs con al menos tres capas completas de células del cumulus compacto y citoplasma homogéneo, clasificados como grado 1 y 2 en la escala descrita por Speckhart et al. (2022).

5.3. Maduración *in vitro*

Los COCs seleccionados, se cultivaron en medio de maduración TCM-199 (en grupos de 40-50), en pocillos de 500 µL durante 24 horas a 38,5 °C en una atmósfera de 5% de CO₂, 20% O₂ ó 5% de CO₂, 5% O₂ y N₂ balanceado, según lo especificado para cada experimento. El medio TCM-199 fue suplementado con piruvato sódico, gentamicina, FSH y eCG (Báez, 2021).

5.4. Fecundación *in vitro*

Para esta etapa se emplearon pajuelas de un toro de comprobada fertilidad. Los COCs MIV se lavaron dos veces en medio de fecundación y fueron puestos en placas 4 well. Las pajuelas de semen fueron descongeladas a 37°C por 1 minuto. La selección espermática se llevó a cabo mediante *swim-up*. La suspensión espermática fue despostada en el fondo de tubos de 1 mL en medio de capacitación y llevada a la incubadora a 38,5°C por una hora. Los espermatozoides que lograron llegar más cerca de la superficie fueron seleccionados y centrifugados a 350 xg. Luego de cumplido este proceso, se realizó el recuento espermático con una cámara Thoma de recuento celular. La concentración espermática requerida para la fecundación es de 1x10⁶ espermatozoides/mL, por lo que se ajustó la concentración

añadiendo medio de fecundación necesario para cada caso. Los ovocitos fueron cultivados durante 22 hs, a 38,5°C en una atmósfera con 20% O₂, 5%CO₂ ó 5% O₂, 5%CO₂ y N₂ balanceado, según lo especificado para cada experimento.

5.5. Cultivo *in vitro*

Transcurridas 22 hs, los cigotos fueron denudados mediante pipeteo. Luego se transfirieron a microgotas de medio mSOFaa, donde se los mantuvo durante 9 días a 38,5°C, 5% de CO₂, 5% O₂ y 90% N₂ (Báez, 2021). Los días 3 y 6 el medio de cultivo fué repuesto en un 50% con medio nuevo. El porcentaje de divididos y proporción de blastocistos fue determinado el día 3 y 8 ó 9, respectivamente.

5.6. Evaluación de la progresión meiótica y fecundación en ovocitos

Luego de la MIV, los COCs fueron denudados mediante pipeteo durante 5 min en una solución de buffer fosfato salino (PBS) suplementado con 200 µg/mL de hialuronidasa. Posteriormente, los ovocitos se fijaron en paraformaldehído diluído en PBS al 2,5 % durante 25 min. Transcurrido ese tiempo se tiñeron con Hoechst 33342 a una concentración de 1 µg/mL durante 5 min. Los ovocitos se colocaron en un portaobjetos y se observaron con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 50i equipado con un filtro de excitación UV a 330-385 nm y un filtro de emisión a 420 nm. Los ovocitos se clasificaron como maduros (ovocitos en metafase II + cuerpo polar), inmaduros (vesícula germinal, metafase I, anafase I-telofase I) y degenerados (cromatina difusa o degradada). Después de las 22 horas de la FIV, se tiñeron los presuntos cigotos de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. Se realizó la clasificación de los presuntos cigotos como normalmente fecundados (2 pronúcleos), anormalmente fecundados (1 ó mayor a 2 pronúcleos) o no fecundados (sin pronúcleos). Se calculó la tasa de fecundación como la relación entre el número de cigotos con 2 pronúcleos y el total de presuntos cigotos observados.

5.7. Producción de ROS

Para la cuantificación de los niveles de ROS en embriones se prosiguió de acuerdo con el método descrito por Morado et al. (2009). Este método utiliza el compuesto fluorescente H₂DCFDA para marcar las ROS. Se preparó una solución stock de H₂DCFDA en

dimetilsulfóxido (DMSO), que se diluyó nuevamente en PBS hasta lograr una concentración de 10 μ M. Posteriormente se incubaron blastocistos expandidos en pocillos de 500 μ L en medio SOF a 38,5 °C, a una atmósfera de 5% de CO₂, por 30 min. Transcurrido ese tiempo se lavaron las muestras a evaluar dos veces en PBS por 5 minutos y se montaron en portaobjetos. Mediante el uso de un microscopio de fluorescencia se observaron y fotografiaron las muestras. La intensidad de ROS fue cuantificada mediante el software ImageJ.

5.8. Tinción de apoptosis

El índice de apoptosis fue determinado mediante el uso del kit “*Terminal deoxynucleotidyl transferase fluorescein-dUTP nick-end labelling*” (TUNEL), descrito en detalle por Rodrigues et al. (2016). Los blastocistos fueron lavados en buffer fosfato salino (PBS), fijados en 2,5 % de paraformaldehído por 30 minutos, y permeabilizados con Tritón X-100 a 0,5% durante 40 minutos. Luego, los blastocistos fueron incubados en gotas de la mezcla de reacción de TUNEL con isotiocianato de fluoresceína unido a dUTP (FITC-dUTP) y la enzima enzima transferasa desoxinucleotidil terminal por 1 hora a 37 °C en cámara húmeda y en oscuridad. Para la tinción de blastómeras apoptóticas y no apoptóticas, los blastocistos fueron teñidos con 1 μ g/mL de Hoechst 33342 por 5 minutos en oscuridad. Posteriormente, los blastocistos se lavaron dos veces en PBS. Para el control positivo los blastocistos fueron incubados con DNasa 0,01 μ g/mL; mientras que los del control negativo fueron incubados en la solución de tinción en ausencia de la enzima transferasa desoxinucleotidil terminal (TdT). La evaluación de TUNEL y el conteo de células se realizó en un microscopio de fluorescencia equipado con filtro de 450-490 nm de excitación, una barrera de 520 nm de emisión filtro, usando objetivo de 40x y 100X. La apoptosis se observó de color verde; mientras que los núcleos normales presentaron color azul. Todas las células de la muestra fueron contadas y analizadas usando el software Fiji/ImageJ (Schindelin et al., 2012). El índice de apoptosis fue calculado como un porcentaje de células positivas a FITC dentro de todas las células positivas a Hoechst.

5.9. Expresión de genes

Un pool, de al menos 3 blastocistos, de cada grupo experimental fue lavado en PBS y

congelado en nitrógeno líquido. El RNA total se extrajo con kit comercial Single Cell RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Canadá), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, la cantidad y calidad se cuantificó con un espectrofotómetro Nanodrop (Drawell, K5500Plus, China). El ADN complementario fue sintetizado a partir de 15 ng de ARN total por muestra con SuperScript III transcriptasa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) se realizó con un termociclador Mic-qPCR (Bio Molecular System, Australia), SYBR Green master mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y los cebadores que se presentan en la Tabla 1. Las condiciones estándar de amplificación fueron 95°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 58°C durante 40 seg. y 72°C durante 20 seg. La expresión relativa se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001) y se normalizó con respecto a los genes de referencia *ACTB* y *GAPDH*. Los datos se obtuvieron a partir de tres réplicas independientes de cada gen. Para el primer experimento se realizó el análisis de expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo (*CAT*), calórico (*HSP1A1*), transporte de membrana (*AQP3*), reconocimiento materno-fetal (*IFNT2*), potencial de desarrollo (*OCT4*) y apoptosis (*BAX*). Para el segundo experimento se realizó el análisis de expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo (*SOD2*, *CAT*) y apoptosis (*BAX*, *BCL2*). En ambos análisis se emplearon los mismos genes de referencia (*GAPDH* y *ACTB*).

5.10. Acetilación de histona H3 (H3K9)

La metodología aplicada se desarrolló en base a los experimentos descritos por Zuo et al. (2020) e Ispada et al. (2021), con ligeras modificaciones. Los embriones seleccionados fueron fijados en paraformaldehído al 2,5% durante 24 horas a 4°C. Luego fueron permeabilizados con Tritón X-100 a 0,5% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los blastocistos se incubaron en solución de bloqueo (0,05% de Tritón X-100 y 2% de BSA (albúmina sérica bovina) diluidos en PBS) durante tres horas a 4°C. Transcurrido este tiempo, se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-acetilación de H3K9 (H0913, Sigma) diluido en solución de bloqueo (1:800).

Los embriones se lavaron con PBS durante 5 minutos, seguido de una incubación con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (1:200) (F2883, Sigma) a temperatura ambiente

por 1 hora. Los embriones se lavaron dos veces con PBS durante 10 minutos y se tiñeron con Hoechst 33342 durante 5 minutos. Se realizó un último lavado con PBS y se montaron los embriones en portaobjetos. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio Nikon Eclipse 50i con cámara incorporada (Nikon, Tokio, Japón) y fueron manipuladas usando el software ImageJ.

Tabla 1. Cebadores de oligonucleótidos para análisis RT-qPCR.

Gen	Secuencia del Cebador (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)	Número de acceso a GenBank
<i>AQP3</i>	F: ACCGATCTAGCCCCTCATCT R: CCAACTCCACCGACAGAATC	136	NM_001079794
<i>BAX</i>	F: TTTGCTTCAGGGTTTCATCCA R: CCGATGCGCTTCAGACACT	126	NM_173894.1
<i>BCL2</i>	F: GAGTCGGATCGCAACTTGGA R: CTCTCGGCTGCTGCATTGT	120	NM_001077486.2
<i>CAT</i>	F: GTTCGCTTCTCCACTGTT R: GGCCATAGTCAGGATCTT	454	NM_001035386.2
<i>HSP1A1</i>	F: CTTCAACATGAAGAGCGCCG R: TGATGGGGTTACACACCTGC	182	NM_203322.3
<i>IFNT2</i>	F: TCTGAGGACCACATGCTAGG R: GATCCTTCTGGAGCTGGTTG	145	NM_001015511.3
<i>OCT4</i>	F: AGTGAGAGGCAACCTGAAGA R: ACACTCGGACCACGTCTTTC	110	NM_174580.2
<i>SOD2</i>	F: CCCATGAAGCCTTTCTAATCCTG R: TTCAGAGGCGCTACTATTTCTTTC	307	NM_201527.2
<i>ACTB</i>	F: GACATCCGCAAGGACCTCTA R: ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	205	NM_173979
<i>GAPDH</i>	F: GATTGTCAGCAATGCCTCCT R: GGTCAATAAGTCCCTCCACGA	94	NM_001034034.2

Abreviaciones: F: forward; R: reverse.

5.11. Análisis estadístico

La proporción de metafase II, tasa de fecundación, tasa de división, tasa de blastocistos, e índice de apoptosis se expresan como la media $\pm$ desviación estándar. Los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza de dos vías y se realizó la prueba de medias con el test de Tukey del procedimiento PROC GLM de SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). El mismo modelo fue aplicado para la segunda experimental con las variables: número de

células, índice de apoptosis y expresión relativa de genes. En todos los casos el nivel de significancia fue de 5% ($P<0,05$).

6. Resultados

6.1. Efectos del α -tocoferol sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos

La maduración y la fecundación no difirieron en los ovocitos de primavera después de la suplementación con α -tocoferol. Sin embargo, en los ovocitos de verano se observaron diferencias significativas ($P<0,05$) entre los grupos de control y α -100, y estos últimos mostraron valores similares a los de los ovocitos de primavera. Los ovocitos del grupo control de verano también produjeron las tasas de embriones más bajas ($P<0,05$), como se muestra en la Tabla 2. Sin embargo, no se detectaron diferencias en el número total de células embrionarias entre los grupos.

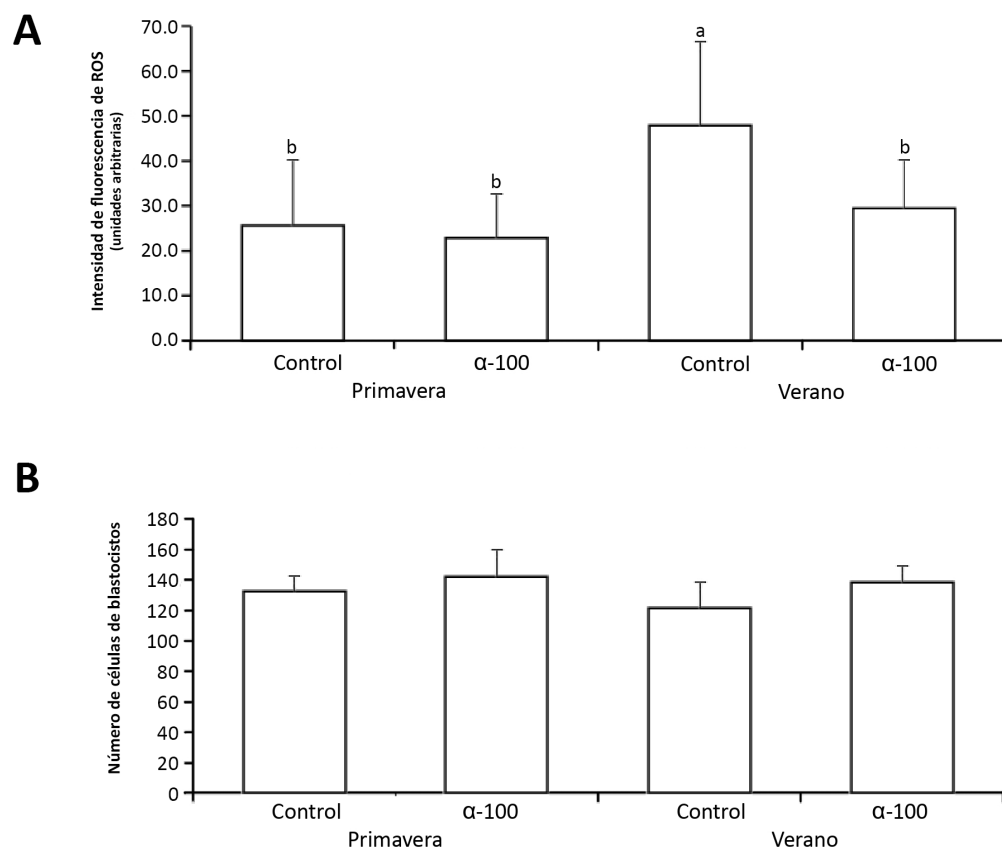
La interacción entre la estación y el antioxidante afectó significativamente el índice apoptótico ($P<0,01$) y los niveles de expresión de *BAX* ($P<0,03$). Como se muestra en la Figura 3, los niveles más altos de producción de ROS ($P<0,05$) e índice de apoptosis ($P<0,01$) se encontraron en blastocistos derivados de ovocitos del grupo control de verano.

Las diferencias en la abundancia de transcripción en blastocistos expandidos se detectaron sólo para los genes *BAX* y *CAT* (Figura 4). La abundancia de transcripción de *BAX* fue significativamente mayor en los blastocistos de control de verano ($P<0,05$), sin diferencias entre los otros grupos. Por el contrario, los niveles de transcripción de *CAT* fueron los más bajos en los blastocistos de control de verano ($P<0,05$).

Tabla 2. Tasas de maduración (metafase II), fecundación, división y blastocistos (porcentaje, % $\pm$ D.E.) en ovocitos bovinos colectados durante la primavera y verano y madurados *in vitro* sin (control) o con 100 α -tocopherol (α -100). El índice de temperatura-humedad (ITH) fue calculado durante la primavera tardía austral (entre el 10 de noviembre y el 15 de diciembre de 2023) y el verano (entre el 16 de enero y el 22 de febrero de 2024).

Variable	Primavera (THI: 68,7 $\pm$ 3)		Verano (THI: 73 $\pm$ 3)		Interacción Estación x Antioxidante
	Control	α -100	Control	α -100	
Metafase II (%)	83 $\pm$ 3% ^a	81,4 $\pm$ 1% ^a	75 $\pm$ 1% ^b	83,5 $\pm$ 0,8% ^a	**
Tasa de fecundación (%)	74,5 $\pm$ 2% ^{a,b}	76,2 $\pm$ 2,5% ^a	68,5 $\pm$ 1% ^b	77,6 $\pm$ 2% ^a	NS
Tasa de división (Día 3)	73,8 $\pm$ 1% ^{a,b}	75,5 $\pm$ 2% ^a	70,7 $\pm$ 1% ^b	78 $\pm$ 2,5% ^a	*
Tasa de blastocistos (Día 9)	27,2 $\pm$ 1% ^a	28,8 $\pm$ 1% ^a	19,8 $\pm$ 4% ^b	27 $\pm$ 5% ^a	NS

Letras diferentes (a, b) dentro de las filas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$). NS= no significativo; * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$.



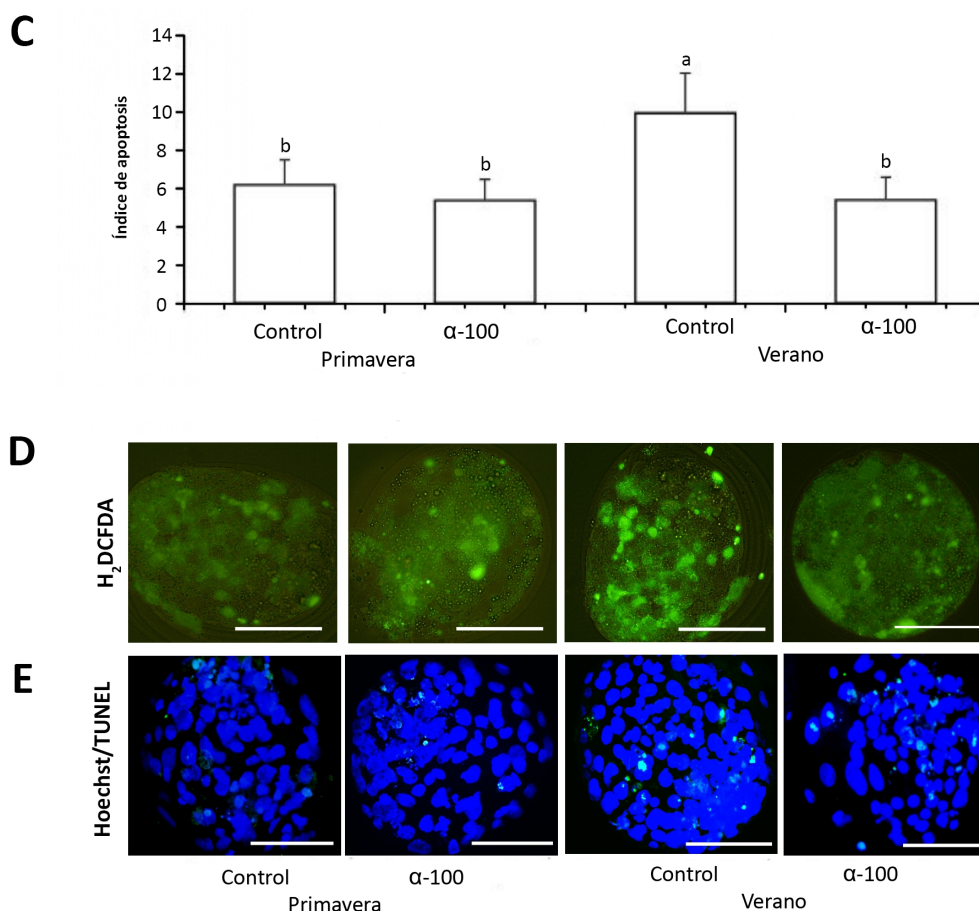


Figura 3. Efecto de la suplementación con 100 μ M de α -tocoferol durante la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos durante la primavera y el verano sobre (A) la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), (B) el número de células de los blastocistos y (C) el índice apoptótico de los blastocistos expandidos. D) Imágenes de fluorescencia de blastocistos expandidos del día 9 tratados con diacetato de 2'7'-diclororohidro-fluoresceína (H₂DCFDA) para evaluar la producción de ROS. (E) Imágenes compuestas de blastocistos expandidos el día 9 teñidos con Hoechst 33342 (núcleos azules) y TUNEL (verde) para evaluar la fragmentación del ADN. La barra blanca representa el rango de 100 μ m. La ausencia de letras en cada barra representa que no hay diferencias significativas. Letras diferentes en cada barra representan diferencias significativas ($P < 0,05$).

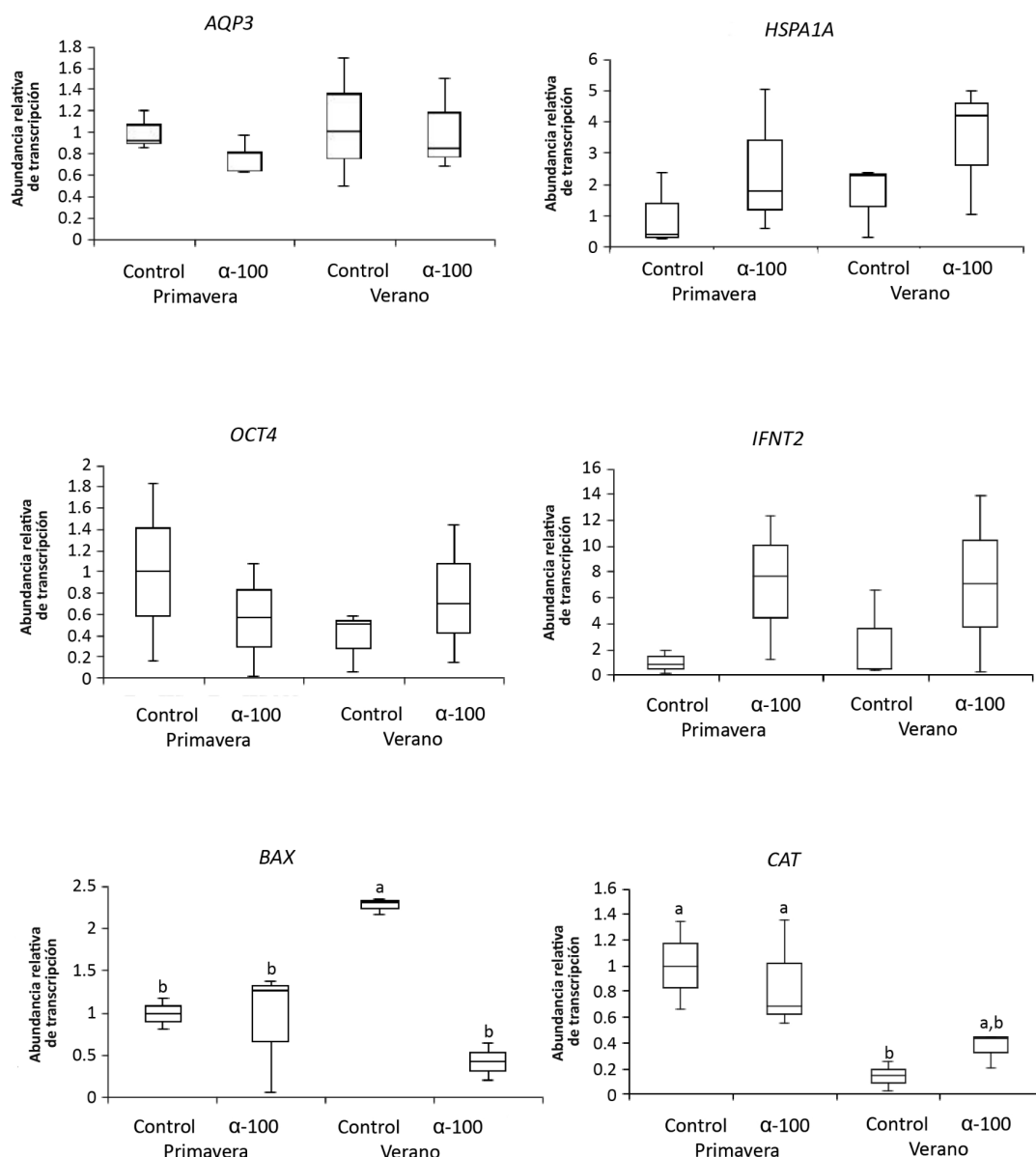


Figura 4. Efecto de la suplementación con 100 μ M de α -tocoferol durante la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos en primavera y verano sobre la abundancia relativa de ARNm de los genes *AQP3*, *HSPA1A*, *OCT4*, *IFNT2*, *BAX* y *CAT* para blastocistos expandidos producidos *in vitro*. La ausencia de letras en cada barra representa que no hay diferencias significativas. Letras diferentes (a, b) en cada recuadro indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$).

6.2. Efecto de estación y la tensión de oxígeno sobre capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos

Los blastocistos del grupo MIV-FIV a 20% de O_2 y provenientes del verano presentaron el índice de apoptosis más alto ($P < 0,05$; Figura 5), pero sin observar diferencias en el número total de blastómeras. La Figura 6 ilustra que la expresión de la relación

BAX/BCL2 fue significativamente mayor ($P<0,05$) en el grupo de blastocistos del verano y cultivados a 20% de O_2 en comparación con los grupos cultivados durante el invierno a 5% de O_2 . La interacción de la tensión de O_2 y la estación afectó sólo la abundancia de transcripción de *BCL2* en blastocistos producidos *in vitro* (Tabla 3).

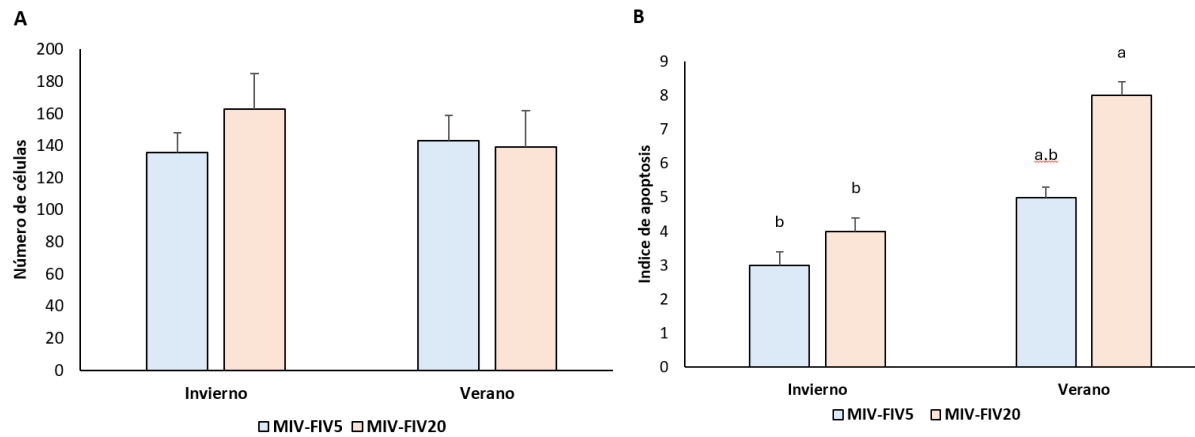


Figura 5. Representación gráfica del número de blastómeras (A) e índice de apoptosis (B) de blastocistos producidos *in vitro* en baja (5%) y alta (20%) tensión de oxígeno durante el verano e invierno del año 2023. Letras diferentes (a,b) sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P<0,05$).

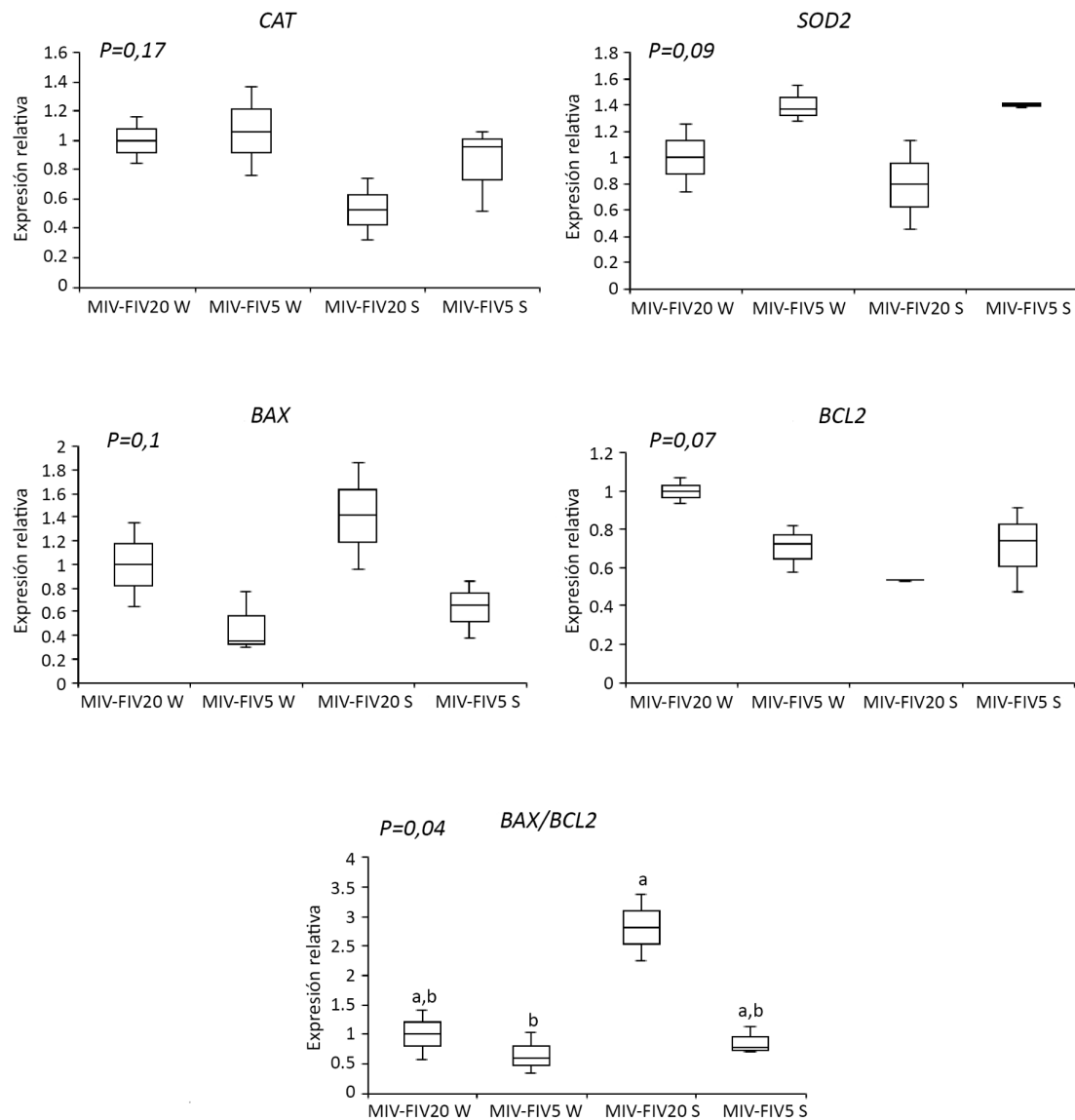


Figura 6. Efecto de la tensión de oxígeno sobre la expresión relativa de los genes *CAT*, *SOD2*, *BAX*, *BCL2* y la relación *BAX/BCL2* en blastocistos bovinos producidos *in vitro* durante el invierno (W) y verano (S) del año 2023. La ausencia de letras en cada barra representa que no hay diferencias significativas. Letras diferentes (a, b) en cada recuadro indican diferencias significativas entre tratamientos.

Tabla 3. Efectos de la baja (5%) y alta (20%) tensión de oxígeno en el número de blastómeras, el índice de apoptosis, la expresión de los genes *CAT*, *SOD2*, *BAX*, *BCL2* y la relación *BAX/BCL2* en blastocistos bovinos producidos *in vitro* durante el invierno y verano del año 2023.

Variable	Estación	Tensión de O ₂	Interacción Estación x Tensión O ₂
Número de blastómeras	NS	NS	T
Índice de apoptosis	NS	**	T
<i>CAT</i>	NS	NS	NS
<i>SOD2</i>	NS	*	NS
<i>BAX</i>	NS	*	NS
<i>BCL2</i>	NS	NS	*
<i>BAX/BCL2</i>	T	*	NS

NS: No significativa; T: Tendencia $P>0,05$ y $<0,1$; * $P<0,05$; ** $P<0,01$.

6.3. Acetilación de histona H3 (H3K9)

En la Figura 7 se observan las micrografías de fluorescencia obtenidas después de la estandarización del protocolo de tinción de acetilación de histonas H3K9.

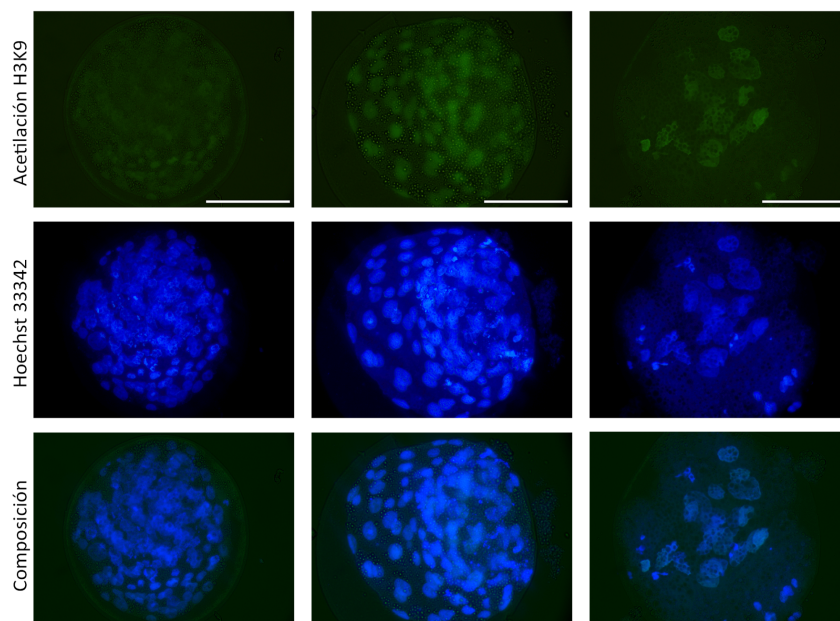


Figura 7. Imágenes de fluorescencia de blastocistos PIV y

teñidos con Hoechst 33342 (núcleos azules), marcados con anticuerpos para valorar la acetilación de histona H3K9 (verde) y la composición o merge de ambas imágenes. Aumento 40x. La barra de escala equivale a 100 micras.

7. Discusión

7.1. Suplementación con α -tocoferol

La hipótesis que α -tocoferol reduce la producción de ROS y el índice apoptótico en blastocistos producidos en ambas estaciones fue parcialmente confirmada. Nuestros resultados demuestran que α -tocoferol impacta positivamente el potencial de desarrollo de los ovocitos colectados durante el verano, exhibiendo un efecto estación-específico en la maduración, fecundación y posterior calidad y número de embriones. En cambio, los ovocitos colectados durante la primavera mostraron una respuesta no significativa a la suplementación, lo que sugiere que los beneficios específicos de α -tocoferol se limitan a las condiciones estacionales estresantes. En concordancia con estos descubrimientos, estudios previos han demostrado que ovocitos colectados de mataderos durante el verano, muestran la menor tasa de blastocistos (Yaacobi-Artzi et al., 2022). Por su parte, Maddahi et al. (2024) informaron tasas más altas de maduración y desarrollo embrionario en ovocitos de vacas lecheras sometidos a estrés térmico suplementados con 100 μ M de α -tocoferol. Además, Natarajan et al. (2010) estudiaron la suplementación de 200 μ M de α -tocoferol durante el cultivo *in vitro* de embriones ovinos bajo dos condiciones, baja (5%) y alta (20%) tensión de O₂ y encontraron una mejora significativa en la proporción y calidad de los blastocistos al 20% de O₂, donde se espera una mayor producción de ROS (Guérin et al., 2001).

Los resultados presentados sugieren que el α -tocoferol ejerce su efecto antioxidante en condiciones de alto estrés, como lo demuestra la producción reducida de ROS y la expresión reducida del gen *BAX* en ovocitos colectados en verano. Cabe destacar que los ovocitos de primavera mostraron un bajo índice de apoptosis y una baja expresión de *BAX*, incluso sin suplementación, lo que indica su competencia intrínseca y una menor necesidad de compensación antioxidante. En conjunto, estos resultados respaldan la idea de que el α -tocoferol beneficia a los gametos y a los embriones preimplantacionales bajo un mayor estrés oxidativo, ya que reduce las ROS y mitiga la expresión de genes relacionados con la apoptosis. Los cambios en la abundancia de transcripción de genes como *SOD1* (Tripathi et

al., 2023), *SOD2* (Báez et al., 2021) y *CAT* (Arias-Álvarez et al., 2018), provocados por el α -tocoferol, que representa respuestas antioxidantes, están relacionados con la disminución de los niveles de ROS. El gen *CAT* desempeña un papel crucial al convertir H_2O_2 en oxígeno y agua y mitigar la apoptosis a través de la regulación negativa de *BAX* y Caspasa-3 (Khan et al., 2020). En conjunto, estos datos subrayan el potencial del α -tocoferol como agente protector en condiciones estacionales estresantes y, destacan el potencial de α -tocoferol como una intervención dirigida para mejorar la calidad ovocitaria y embrionaria bajo condiciones de estrés calórico.

7.2. Efecto de la tensión de oxígeno

Los resultados obtenidos indican que los ovocitos que son MIV-FIV en alta tensión de oxígeno (20%) colectados durante el verano presentan un mayor índice de apoptosis y un aumento en la relación de la expresión de los genes *BAX/BCL2*, lo que representa una menor calidad embrionaria. He et al. (2020), evaluando diferentes tensiones de oxígeno durante los procesos de MIV-FIV en ovocitos de Yak, reportaron hallazgos que son consistentes con los del presente trabajo. Ellos evidenciaron que una concentración del 20% de O_2 se asocia con un incremento en el índice de apoptosis y, en contraste, condiciones de baja tensión de oxígeno (5%) favorecen la obtención de embriones con niveles de apoptosis más bajos.

Diversos estudios han demostrado que la relación entre los genes *BAX/BCL2* es un indicador útil para medir la calidad de ovocitos y embriones bovinos producidos *in vitro* (Yang y Rajamahendran, 2002; He et al., 2020). Por un lado, el gen *BAX*, perteneciente a la vía intrínseca de la apoptosis, promueve la activación de la cascada de caspasas que culmina en la muerte celular y su sobreexpresión se asocia con embriones bovinos con morfología pobre. En cambio, el gen *BCL2* inhibe la acción de *BAX*, bloqueando así el avance de esta vía apoptótica y altos niveles del mismo indican una mayor calidad embrionaria (revisado por Ramos-Ibeas et al., 2020). Por lo tanto, la relación entre el gen *BAX* pro-apoptótico y el gen *BCL2* anti-apoptótico es un marcador útil para determinar la calidad del embrión y demuestra la tendencia de dichas células hacia la supervivencia o la muerte celular (Yang y Rajamahendran, 2002; He et al., 2020, Ramos-Ibeas et al., 2020). Aunque la alta tensión de oxígeno afectó la relación *BAX/BCL2*, la interacción entre la estación y la tensión de oxígeno provocó diferencias significativas observables solamente en la expresión de *BCL2*.

Por otro lado, la alta tensión de oxígeno tendió a una menor expresión del gen *SOD2* en ambas estaciones. Este gen codifica la enzima mitocondrial involucrada en la primera vía enzimática que posee la célula para deshacerse de las ROS y transformar los nocivos radicales superóxidos en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que luego es eliminado de la célula por enzimas como la catalasa y la glutatión peroxidasa (Corrêa et al., 2008; Khan et al., 2020). Por lo tanto, bajos niveles de *SOD2* en blastocistos podrían indicar una menor actividad mitocondrial y por consiguiente una baja calidad embrionaria (Báez et al., 2024).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la alta tensión de oxígeno propicia un estado que conduce a la apoptosis, el estrés oxidativo generado por el ambiente hiperóxico sumado al estrés calórico sufrido por las altas temperaturas incapacita a la célula a contrarrestar los daños sufridos y por lo tanto recurre a la muerte celular por la vía de apoptosis (Ramos-Ibeas et al., 2020; Yousefian et al., 2021).

Aunque lo reportado es consistente con los hallazgos en experimentales de otros autores que también evalúan el efecto de la tensión de oxígeno en procesos *in vitro*, debido al número reducido de genes en estudio y las limitadas diferencias encontradas, los resultados obtenidos podrían considerarse una aproximación inicial al entendimiento del efecto de la tensión de oxígeno en ovocitos expuestos o no al estrés calórico y, realizar en un futuro un estudio más amplio, permitiría desentrañar los mecanismos celulares involucrados.

7.3. Acetilación de histona H3 (H3K9)

Los procedimientos detallados permitieron el desarrollo de la tinción que identifica la acetilación de histona H3K9. Esto constituye un método de evaluación rápida y precisa de fenómenos que ocurren a nivel celular en los embriones y reflejan aspectos claves en la transcripción de genes. La cuantificación de la acetilación permite establecer comparaciones sólidas y generar datos complementarios de gran utilidad para estudios de expresión génica (Zuo et al., 2020).

El desarrollo y aplicación exitosa de la técnica, representa un avance importante en el repertorio de técnicas de evaluación del potencial de desarrollo y calidad embrionaria del laboratorio de Producción *In Vitro*. De esta manera, será posible evaluar los efectos de distintos agentes o condiciones ambientales en futuros estudios.

8. Conclusiones

1. La revisión bibliográfica y la aplicación de técnicas de PIV de embriones revelan cómo la manipulación de diversos compuestos y parámetros puede mejorar significativamente la eficiencia en la obtención de embriones saludables. Adicionalmente, se resalta el papel de ciertos compuestos, en este caso antioxidantes, que contrarrestan los efectos negativos del estrés calórico, lo que contribuye a mejorar la calidad de los embriones y por consiguiente aumentan el número de embriones resultantes del proceso.
2. Los hallazgos reportados en la primera experimental indican que la suplementación con α -tocoferol durante la MIV mejora significativamente la calidad y el rendimiento de los blastocistos de los ovocitos colectados durante el verano, y ejerce su efecto protector contra el daño oxidativo al reducir los niveles de ROS y la apoptosis. Por el contrario, no se observaron efectos significativos en los ovocitos de primavera, lo que sugiere que los beneficios de la suplementación con α -tocoferol durante la MIV son más evidentes en los ovocitos en condiciones estacionales estresantes, como las que se experimentan en verano.
3. Los resultados del segundo experimento demuestran que una alta tensión de oxígeno puede afectar la calidad de los embriones producidos *in vitro*, exacerbando especialmente los efectos negativos que tiene sobre ellos el estrés calórico experimentado en la estación de verano y, el uso de una baja tensión podría ser un método viable para obtener embriones de mejor calidad.
4. La identificación de procesos de acetilación permite evaluar la calidad de los embriones ya que tienen correlación directa con la accesibilidad de los mecanismos intracelulares para la transcripción de genes. Estos procedimientos son de utilidad para hacer estudios comparativos de los efectos en el desarrollo embrionario de diferentes condiciones en todas las etapas de PIVE. De acuerdo con lo establecido, se espera incorporar esta técnica como procedimiento disponible en futuros trabajos a realizar en el laboratorio.
5. En definitiva, lo desarrollado en el presente trabajo contribuye significativamente a los debates en curso sobre estrategias para mejorar la eficiencia de la producción de embriones en condiciones climáticas adversas.

9. Referencias bibliográficas

- Ambrogi, M., Dall'Acqua, P. C., Rocha-Frigoni, N. A. S., Leão, B. C. S., Mingoti, G. Z. (2017). Transporting bovine oocytes in a medium supplemented with different macromolecules and antioxidants: Effects on nuclear and cytoplasmic maturation and embryonic development *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(3), 409-421. <https://doi.org/10.1111/rda.12923>
- Annes, K., de Lima, C. B., Ispada, J., dos Santos, É. C., Fontes, P. K., Nichi, M., Nogueira, M. F. G., Sudano, M. J., Milazzotto, M. P. (2023). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) selectively modulates the metabolic and lipid profile of bovine embryos according to their kinetics of development. *Theriogenology*, 204, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.03.020>
- Arias ME, Felmer R. (2009). Biología de las células madre embrionarias (ES cells) en distintas especies: potenciales aplicaciones en biomedicina. *Archivos de medicina veterinaria*, 41(3), 185-195. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA-Carillanca, Temuco, Chile.
- Arias-Álvarez, M., Garcíá-García, R. M., López-Tello, J., Rebollar, P. G., Gutiérrez-Adán, A., Lorenzo, P. L. (2018). α -Tocopherol modifies the expression of genes related to oxidative stress and apoptosis during *in vitro* maturation and enhances the developmental competence of rabbit oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(12), 1728-1738. <https://doi.org/10.1071/RD17525>
- Ascari, I. J., Alves, N. G., Jasmin, J., Lima, R. R., Quintão, C. C. R., Oberlender, G., Moraes, E. A., Camargo, L. S. A. (2017). Addition of insulin-like growth factor I to the maturation medium of bovine oocytes subjected to heat shock: effects on the production of reactive oxygen species, mitochondrial activity and oocyte competence. *Domestic Animal Endocrinology*, 60, 50-60. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2017.03.003>
- Báez, F., de Brun, V., Rodríguez-Osorio, N., Viñoles, C. (2024). Low oxygen tension during *in vitro* embryo production improves the yield, quality, and cryotolerance of bovine blastocysts. *Animal Science Journal*, 95(1). <https://doi.org/10.1111/asj.13941>
- 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(3), 2253-2265. <https://doi.org/10.3390/cimb43030158>
- Báez, F., López Darriulat, R., Rodríguez-Osorio, N., Viñoles, C. (2022). Effect of season on germinal vesicle stage, quality, and subsequent *in vitro* developmental competence in bovine cumulus-oocyte complexes. *Journal of Thermal Biology*, 103, 103171. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103171>
- Barrera, S. S., Naranjo-Gomez, J. S., Rondón-Barragán, I. S. (2023). Thermoprotective molecules: Effect of insulin-like growth factor type I (IGF-1) in cattle oocytes exposed to high temperatures. *Heliyon*, 9(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14375>
- Baruselli, P. S., Ferreira, R. M., Vieira, L. M., Souza, A. H., Bó, G. A., Rodrigues, C. A. (2020). Use of embryo transfer to alleviate infertility caused by heat stress. *Theriogenology*, 155, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.028>
- Bazzano J., Perna A., Albornoz H., Gambogi R. (2017) Técnicas de Reproducción Humana Asistida de Alta Complejidad financiadas por el Fondo Nacional de Recursos. Reporte de Resultados. *Unidad de Evaluación Fondo Nacional de Recursos*.

- Beca J.P., Lecaros A., González P., Sanhueza P., Mandakovic B. (2014). Aspectos médicos, éticos y legales de la criopreservación de embriones humanos. *Revista médica de Chile*, 142, 903-908. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872014000700011>
- Brooker, R. (2012) Gene Regulation In Eukaryotes. En *Concepts of Genetics* (pp. 379-396). McGraw-Hill.
- Cabella, W., Soto, M. F., Pardo, I., Pedetti, G. (2024). The big decline: Lowest-low fertility in Uruguay (2016–2021). *Demographic Research*, 50, 443-456. <https://doi.org/10.4054/DemRes.2024.50.16>
- Caínzos Cagiao, J. M. (2012). Diseño de un medio definido para la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos en baja tensión de oxígeno. Universidade de Santiago de Compostela, España. URI: <http://hdl.handle.net/10347/6248>
- Chauhan, S. S., Rashamol, V. P., Bagath, M., Sejian, V., Dunshea, F. R. (2021). Impacts of heat stress on immune responses and oxidative stress in farm animals and nutritional strategies for amelioration. *International Journal of Biometeorology*, 65(7), 1231-1244. <https://doi.org/10.1007/s00484-021-02083-3>
- Corrêa, G. A., Rumpf, R., Mundim, T. C. D., Franco, M. M., Dode, M. A. N. (2008). Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Animal Reproduction Science*, 104(2-4), 132-142. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.02.002>
- Crean A.J., Immler S. (2021). Evolutionary consequences of environmental effects on gamete performance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 376. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0122>
- de Castro e Paula, L. A., Hansen, P. J. (2007). Interactions between oxygen tension and glucose concentration that modulate actions of heat shock on bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Theriogenology*, 68(5), 763-770. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.005>
- de Vasconcelos Franco, 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(4), 957-962. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.019>
- Dovolou, E., Giannoulis, T., Nanas, I., Amiridis, G. S. (2023). Heat Stress: A Serious Disruptor of the Reproductive Physiology of Dairy Cows. *Animals*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/ani13111846>
- Fedrigio, J. K., Báez, F., Cruz, R. S., Viñoles, C. (2021). Heat tolerance in cows of British breeds and their crosses with bonsmara under grazing conditions. *Journal of Thermal Biology*, 102, 2019–22. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103118>
- Feng, X., Li, C., Zhang, H., Zhang, P., Shahzad, M., Du, W., Zhao, X. (2024). Heat-Stress Impacts on Developing Bovine Oocytes: Unraveling Epigenetic Changes, Oxidative Stress, and Developmental Resilience. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(9). <https://doi.org/10.3390/ijms25094808>
- Fernández R. (2021). Efecto a largo plazo de las Técnicas de Reproducción Asistida en el modelo murino. Universidad Autónoma de Madrid, España. URI: <http://hdl.handle.net/10486/700180>
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods.

Animal, 14(5), 991-1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>

Gendelman, M., Aroyo, A., Yavin, S., Roth, Z. (2010). Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*, 140(1), 73-82. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0055>

Gendelman, M., Roth, Z. (2012). In vivo vs. *in vitro* models for studying the effects of elevated temperature on the GV-stage oocyte, subsequent developmental competence and gene expression. *Animal Reproduction Science*, 134(3-4), 125-134. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.07.009>

Gendelman, M., Roth, Z. (2012). Seasonal effect on germinal vesicle-stage bovine oocytes is further expressed by alterations in transcript levels in the developing embryos associated with reduced developmental competence. *Biology of Reproduction*, 86(1). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.092882>

Gilchrist, R. B., Thompson, J. G. (2007). Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. *Theriogenology*, 67(1), 6-15. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.027>

Gonella Diaza, Ángela M., Atuesta Bustos, J. E., Bernal Ulloa, S. M., Chacón Jaramillo, L. (2013). Generalidades de la producción de embriones bovinos *in vitro*. *Revista De Investigación Agraria Y Ambiental*, 4(1), 65-80. <https://doi.org/10.22490/21456453.1967>

Guérin, P., Mouatassim, S. El, Me, Y., Âzo, Â. (2001). *Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings*. Human Reproduction Update, 7(2), 175–89. <https://doi.org/10.1093/humupd/7.2.175>.

Harvey, A. J. (2007). The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Animal Reproduction Science*, 98(1-2), 113-128. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.008>

Hashimoto, S., Minami, N., Takakura, R., Yamada, M., Imai, H., & Kashima, N. (2000). Low oxygen tension during *in vitro* maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Molecular reproduction and development*, 57(4), 353–360. [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200012\)57:4<353::AID-MRD7>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200012)57:4<353::AID-MRD7>3.0.CO;2-R)

Hasler, J. F. (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, 81(1), 152-169. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.010>

He, H., Zhang, H., Li, Q., Fan, J., Pan, Y., Zhang, T., Robert, N., Zhao, L., Hu, X., Han, X., Yang, S., Cui, Y., Yu, S. (2020). Low oxygen concentrations improve yak oocyte maturation and enhance the developmental competence of preimplantation embryos. *Theriogenology*, 156, 46-58. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.022>

Hernández, P., Dorticós, E. (2004). Medicina regenerativa: Células madre embrionarias y adultas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 20(3). URL: <https://rb.gy/wklk8p>

Holm, P., Booth, P. J., Schmidt, M. H., Greve, T., Callesen, H. (1999). High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, 52(4), 683–700. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00162-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00162-4)

Ispada, J., da Fonseca Junior, A. M., Santos, O. L. R., Bruna de Lima, C., Dos Santos, E. C., da Silva, V. L., Almeida, F. N., de Castro Leite, S., Juan Ross, P., & Milazzotto, M. P. (2021). Metabolism-driven post-translational modifications of H3K9 in early bovine embryos. *Reproduction*, 162(3), 181–191. <https://doi.org/10.1530/REP-21-0134>

Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*, 293(5532), 1074–1080. <https://doi.org/10.1126/science.1063127>

Khan, A., Khan, M. Z., Dou, J., Umer, S., Xu, H., Sammad, A., Zhu, H. Bin, Wang, Y. (2020). Rnai-mediated silencing of catalase gene promotes apoptosis and impairs proliferation of bovine granulosa cells under heat stress. *Animals*, 10(6), 1-17. <https://doi.org/10.3390/ani10061060>

Leite da Silva, W. A., Poehland, R., Carvalho de Oliveira, C., Ribeiro Ferreira, M. G. C., Garcia de Almeida, R., Cáceres, M. B. S., Macedo, G. G., da Costa e Silva, E. V., Alves, F. V., Nogueira, E., de Andrade Melo-Sterza, F. (2020). Shading effect on physiological parameters and *in vitro* embryo production of tropical adapted Nellore heifers in integrated crop-livestock-forest systems. *Tropical Animal Health and Production*, 52(5), 2273-2281. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02244-3>

Li, G., Yu, X., Portela Fontoura, A. B., Javaid, A., de la Maza-Escolà, V. S., Salandy, N. S., Fubini, S. L., Grilli, E., McFadden, J. W., Duan, J. E. (2023). Transcriptomic regulations of heat stress response in the liver of lactating dairy cows. *BMC Genomics*, 24(1), 410. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09484-1>

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Llamas Luceño, N., de Souza Ramos Angrimani, D., de Cássia Bicudo, L., Szymańska, K. J., Van Poucke, M., Demeyere, K., Meyer, E., Peelman, L., Mullaart, E., Broekhuijse, M. L. W. J., Van Soom, A. (2020). Exposing dairy bulls to high temperature-humidity index during spermatogenesis compromises subsequent embryo development *in vitro*. *Theriogenology*, 141, 16-25. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.08.034>

Maddahi, A., Saberivand, A., Hamali, H., Jafarpour, F., Saberivand, M. (2024). Exploring the impact of heat stress on oocyte maturation and embryo development in dairy cattle using a culture medium supplemented with vitamins E, C, and coenzyme Q10. *Journal of Thermal Biology*, 119, 103759. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2023.103759>

Menchaca A., Souza Neves M. (2020). Chapter 4b. SOP for Small Ruminant Embryo Technology. Part 2: *In Vitro* Embryo Production. *Manual of the International Embryo Technology Society, 5th Edition*.

Morado, S. A., Cetica, P. D., Beconi, M. T., Dalvit, G. C. (2009). Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(4), 608-614. <https://doi.org/10.1071/RD08198>

Morrell, J. M. (2020). Heat stress and bull fertility. *Theriogenology*, 153, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.014>

Nandi, S., Tripathi, S. K., Gupta, P. S. P., Mondal, S. (2018). Nutritional and metabolic stressors on ovine oocyte development and granulosa cell functions *in vitro*. *Cell Stress and Chaperones*, 23(3), 357-371. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0846-1>

Palma A. (2018). Producción *in vitro* de embriones bovinos. *Biotecnología de la Reproducción*, 2, 225-294.

https://www.researchgate.net/publication/329567703_Produccion_in_vitro_de_embryones_bovinos

Payne, D., Flaherty, S. P., Barry, M. F., & Matthews, C. D. (1997). Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Human reproduction*, 12(3), 532–541. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.3.532>

Plachot M. (2000). Fertilization. *Human Reproduction*, 15(suppl 4), 19–30. https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_4.19

Rahman, M. B., Schellander, K., Luceño, N. L., Van Soom, A. (2018). Heat stress responses in spermatozoa: Mechanisms and consequences for cattle fertility. *Theriogenology*, 113, 102-112). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.02.012>

Ramos-Ibeas, P., Gimeno, I., Cañón-Beltrán, K., Gutiérrez-Adán, A., Rizo, D., Gómez, E. (2020). Senescence and Apoptosis During *in vitro* Embryo Development in a Bovine Model. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 619902. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.619902>

Rodrigues, T. A., Ispada, J., Risolia, P. H. B., Rodrigues, M. T., Lima, R. S., Assumpção, M. E. O. A., Visintin, J. A., Paula-Lopes, F. F. (2016). Thermoprotective effect of insulin-like growth factor 1 on *in vitro* matured bovine oocyte exposed to heat shock. *Theriogenology*, 86(8), 2028-2039. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.06.023>

Rodríguez A., Arburuas I., de Brun V., Rodríguez-Osorio N., Viñoles C., Báez F. (2023). 97 Effect of season and oxygen tension on developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 35, 175-175. <https://doi.org/10.1071/RDv35n2Ab97>

Rodríguez Machado, A., Arburúas Bell, I. (2023). Efecto de la estación del año y la tensión de oxígeno sobre la capacidad de desarrollo *in vitro* en ovocitos bovinos. Tesis de grado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Veterinaria. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/39943/1/FV-35785.pdf>

Roelen, B. A. J. (2019). Bovine oocyte maturation: Acquisition of developmental competence. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(2), 98-103. <https://doi.org/10.1071/RD19255>

Roth, Z. (2008). Heat Stress, the Follicle, and Its Enclosed Oocyte: Mechanisms and Potential Strategies to Improve Fertility in Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(suppl.2), 238-244. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01168.x>

Roth, Z. (2021). Heat stress reduces maturation and developmental capacity in bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 33(2), 66-75. <https://doi.org/10.1071/RD20213>

Santa Cruz, R., da Silva, A., Fedrigo J.K., Benítez V., Viñoles C. (2019). El creep feeding y el ambiente atmosférico afectan el momento de concepción en vacas para carne en pastoreo. *XLVII Jornadas de Buiatría*, 211-214.

Santos, R. R., Schoevers, E. J., Roelen, B. A. (2014). Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 12:117. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-117>

Saraiva, N. Z., Oliveira, C. S., Almeida, N. N. C., Figueiró, M. R., Quintão, C. C. R., Garcia, J. M. (2022). Epigenetic modifiers during *in vitro* maturation as a strategy to increase oocyte competence in bovine. *Theriogenology*, 187, 95-101. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.04.014>

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

Schüller, L. K., Burfeind, O., Heuwieser, W. (2014). Impact of heat stress on conception rate of dairy cows in the moderate climate considering different temperature-humidity index thresholds, periods relative to breeding, and heat load indices. *Theriogenology*, 81(8), 1050-1057. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.029>

Shahzad, Q., Pu, L., Wadood, A. A., Waqas, M., Xie, L., Pareek, C. S., Xu, H., Liang, X., Lu, Y. (2020). Proteomics analysis reveals that warburg effect along with modification in lipid metabolism improves *in vitro* embryo development under low oxygen. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6). <https://doi.org/10.3390/ijms21061996>

Souza Neves, M. (2019). Producción *in vitro* de embriones ovinos: manual de procedimientos. Tesis de grado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Veterinaria. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/25797/1/FV-34004.pdf>

Speckhart, S. L., Wooldridge, L. K., Ealy, A. D. (2023). An updated protocol for *in vitro* bovine embryo production. *STAR Protocols*, 4(1), 101924. <https://doi.org/10.1016/J.XPRO.2022.101924>

Torres-Júnior, J. R. de S., Pires, M. de F. A., de Sá, W. F., Ferreira, A. de M., Viana, J. H. M., Camargo, L. S. A., Ramos, A. A., Folhadella, I. M., Polisseni, J., de Freitas, C., Clemente, C. A. A., de Sá Filho, M. F., Paula-Lopes, F. F., Baruselli, P. S. (2008). Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 69(2), 155-166. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.023>

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>

Valente, R. S., Marsico, T. V., Sudano, M. J. (2022). Basic and applied features in the cryopreservation progress of bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 239, 106970. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.106970>

Wolfenson, D., Roth, Z., Meidan, R. (2000). Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 535-547. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00102-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00102-0)

Yaacobi-Artzi, S., Kalo, D., Roth, Z. (2022). Seasonal variation in the morphokinetics of in-vitro-derived bovine embryos is associated with the blastocyst developmental competence and gene expression. *Frontiers in Reproductive Health*, 4, 1030949. <https://doi.org/10.3389/frph.2022.1030949>

Yaacobi-Artzi, S., Shimoni, C., Kalo, D., Hansen, P. J., Roth, Z. (2020). Melatonin slightly alleviates the effect of heat shock on bovine oocytes and resulting blastocysts. *Theriogenology*, 158, 477-489. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.09.039>

Yang, M. Y., Rajamahendran, R. (2002). Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Animal reproduction science*, 70(3-4), 159–169. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(01\)00186-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(01)00186-5)

Yashiro, I., Tagiri, M., Ogawa, H., Tashima, K., Takashima, S., Hara, H., Hirabayashi, M., Hochi, S. (2015).

High revivability of vitrified-warmed bovine mature oocytes after recovery culture with α -tocopherol. *Reproduction*, 149(4), 347-355. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0594>

Yousefian, I., Zare-Shahneh, A., Goodarzi, A., Baghshahi, H., Fouladi-Nashta, A. A. (2021). The effect of Tempo and MitoTEMPO on oocyte maturation and subsequent embryo development in bovine model. *Theriogenology*, 176, 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.09.016>

Zabihi, A., Shabankareh, H. K., Hajarian, H., Foroutanifar, S. (2021). *In vitro* maturation medium supplementation with resveratrol improves cumulus cell expansion and developmental competence of Sanjabi sheep oocytes. *Livestock Science*, 243. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104378>

Zuo, Z., Niu, Z., Liu, Z., Ma, J., Qu, P., Qiao, F., Su, J., Zhang, Y., Wang, Y. (2020). The effects of glycine-glutamine dipeptide replaced L-glutamine on bovine parthenogenetic and IVF embryo development. *Theriogenology*, 141, 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.005>