

ARTÍCULO DE REVISIÓN

## La cisteamina y sus aplicaciones en la producción *in vitro* de embriones

### Cysteamine and its applications in the *in vitro* production of embryos

Ruth Ortega Rojas<sup>1,2,5,6</sup>, Gustavo Palma<sup>3</sup>, Wilmer Vacacela Ajila<sup>4</sup>,  
Rubén Carrera Durazno<sup>1</sup>

#### RESUMEN

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) es una biotecnología aplicada a diferentes especies de mamíferos domésticos y silvestres, además del humano. La PIVE comprende la maduración *in vitro* de ovocitos (MIV), fecundación *in vitro* de ovocitos madurados (FIV) y el cultivo *in vitro* de ovocitos fertilizados (CIV). En los procesos de la MIV y CIV se tiene un incremento de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) que generan mayores niveles de estrés oxidativo, que ante junto a un deficiente sistema antioxidante en condiciones *in vitro* se pueden afectar estos procesos. Ante esta situación, los medios de maduración se suplementan con compuestos antioxidantes como la cisteamina (CYS) que es un amino tiol ( $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ) de bajo peso molecular (77.1 g/mol), tiene actividad antioxidante propia, promueve el transporte de cisteína al interior de la célula y favorece la síntesis de glutatión (GSH). Investigaciones sobre el uso de la CYS

<sup>1</sup> Universidad Técnica Particular de Loja, Departamento de Ciencias Biológicas, San Cayetano, Loja, Ecuador

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Loja, Unidad de Educación a Distancia, La Argelia, Loja, Ecuador

<sup>3</sup> Universidad Nacional de Santiago del Estero, Departamento de Reproducción, Argentina

<sup>4</sup> Universidad Nacional de Loja, Facultad Agropecuaria de Recursos Naturales Renovables, La Argelia, Loja, Ecuador

<sup>5</sup> E-mail: rcortega@utpl.edu.ec

<sup>6</sup> E-mail: ruth.ortega@unl.edu.ec

Recibido: 12 de abril de 2021

Aceptado para publicación: 16 de noviembre de 2021

Publicado: 25 de febrero de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

en la PIVE indican que se estimula la producción de GSH, la maduración ovocitaria y favorece el proceso de segmentación y blastulación; asimismo, tiene efectos sinérgicos con otros antioxidantes o con factores de crecimiento, de manera que el interés sobre esta molécula y sus efectos en la PIVE ha ido aumentando a través de los años. Este artículo de revisión presenta las propiedades y efectos de la cisteamina en el sistema de producción *in vitro* de embriones en rumiantes.

**Palabras clave:** rumiantes, producción *in vitro*, embriones, antioxidantes, cisteamina

## ABSTRACT

*In vitro* embryo production (IVP) is a biotechnology applied to different species of domestic and wild mammals, in addition to humans. IVP includes the *in vitro* maturation of oocytes (IVM), *in vitro* fertilization of matured oocytes (IVF) and the *in vitro* culture of fertilized oocytes (IVC). In the IVM and IVC processes there is an increase in levels of reactive oxygen species (ROS) that generate higher levels of oxidative stress, which together with a deficient antioxidant system in *in vitro* conditions can affect these processes. Faced with this situation, the maturation media are supplemented with antioxidant compounds such as cysteamine (CYS), which is an amino thiol (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH) of low molecular weight (77.1 g/mol), has its own antioxidant activity, promotes the transport of cysteine to the interior of the cell and favours the synthesis of glutathione (GSH). Research on the use of CYS in IVP indicates that it stimulates GSH production, oocyte maturation and favours the segmentation and blastulation process. In addition, it has synergistic effects with other antioxidants or with growth factors, so the interest in this molecule and its effects on IVP has increased over the years. This review article presents the properties and effects of cysteamine in the *in vitro* production system of embryos in ruminants.

**Keywords:** ruminants, *in vitro* production, embryos, antioxidants, cysteamine

## INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) en las especies de interés zootécnico es una biotecnología reproductiva utilizada para mejorar el desempeño productivo de los rebaños mediante la producción de animales genéticamente superiores o de elevado mérito económico (Camargo *et al.*, 2006). La PIVE comprende un proceso secuencial de tres eventos en el laboratorio: maduración *in vitro* de ovocitos (MIV), fecundación *in vitro* de ovocitos madurados (FIV) y el cultivo *in vitro* de ovocitos fertilizados (CIV) hasta el

estado de blastocisto en el día 7 en el caso del bovino (Silva *et al.*, 2010; Quispe *et al.*, 2018). A través de la MIV el ovocito bovino avanza desde la etapa de diploteno de la profase I, cuando el núcleo del ovocito está en un estado de vesícula germinal, a la metafase II, lo cual implica también un proceso de maduración citoplasmática (Rocha-Frigoni *et al.*, 2016), selección y capacitación de los espermatozoides, y el cultivo posterior de los embriones (Wrenzycki, 2016). Varios factores inherentes al ovocito, al ambiente fisiológico de la hembra en el momento de ser colectado, al ambiente propio del cultivo celular, como los instrumentos y equi-

pos, los químicos (tipo y composición de los medios de cultivo), microambientales (concentración de gases y temperatura en incubadoras), así como el número de estructuras cultivadas en cada gota y de la experticia de los operadores pueden influir en la eficiencia de la PIVE y contribuir a las diferencias existentes entre embriones producidos *in vivo* e *in vitro* (Camargo *et al.*, 2006).

La eficiencia de la PIVE varía entre el 30 y 40% de producción de blastocitos (Ranjbar *et al.*, 2019) y está relacionada con los medios de cultivo que se utilizan (Díaz, 2017). La eficiencia se refleja en la obtención de embriones sin alteraciones morfológicas; y en la expresión génica, porque las condiciones en las que se desarrollan los embriones *in vitro* no pueden imitar completamente a las *in vivo* (Camargo *et al.*, 2006). Las condiciones estándar de CIV de embriones aumentan las especies reactivas del oxígeno (ROS), y constituye una de las principales causas del reducido desarrollo embrionario (Rocha-Frigoni *et al.*, 2016). La producción de ROS es un proceso normal que ocurre en la cadena respiratoria mitocondrial de la célula (Rocha-Frigoni *et al.*, 2016). Los organismos vivos poseen factores protectores naturales que contrarrestan los efectos negativos de las ROS, llamados antioxidantes (Mahmoud *et al.*, 2016).

En condiciones fisiológicas normales las ROS y los antioxidantes celulares se encuentran en equilibrio. Las células poseen mecanismos fisiológicos para obstaculizar la formación excesiva de radicales libres ( $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $OH\cdot$ , etc.) incluidas las enzimas específicas que controlan los niveles intracelulares (Sovernigo *et al.*, 2017). Los captadores de oxígeno presentes en fluidos foliculares y oviductales protegen el estrés oxidativo de ovocitos y los embriones *in vivo*, eliminando o reduciendo el efecto de ROS, además de varias enzimas, tales como Cu-Zn superóxido dismutasa (Cu-Zn/SOD), Mn/SOD, catalasas, glutatión-peroxidasa (GSH-Px) y ceruloplasmina, además de las vitaminas A,

C y E (García-Díaz *et al.*, 2013). Sin embargo, en condiciones *in vitro* los niveles de antioxidantes son más bajos que *in vivo*, porque los ovocitos y embriones no se benefician del sistema de protección antioxidante materna. Las especies reactivas de oxígeno pueden atravesar fácilmente las membranas celulares, alterando la mayoría de las moléculas orgánicas y afectando el desarrollo temprano de los embriones (Khazaei y Aghaz, 2017).

Durante la PIVE los niveles altos de ROS inducen el estrés oxidativo (ES), lo que conlleva al desarrollo embrionario deficiente (Rocha-Frigoni *et al.*, 2016), si no se implementan medidas para reducirlo. El ES es producto del desbalance entre la producción de ROS y el efecto protector del sistema antioxidante, responsable de su neutralización y/o remoción (Tsantarliotou y Sapanidou, 2018). Si en condiciones de cultivo *in vitro* este sistema es insuficiente para neutralizar las ROS, entonces los efectos perjudiciales sobre la calidad de los gametos y de los embriones es considerablemente mayor (Ranjbar *et al.*, 2019). Esto ocurre porque altera y minimiza la función y supervivencia celular, daña las proteínas, lípidos, DNA y acelera la apoptosis celular (Tsantarliotou y Sapanidou, 2018). Asimismo, los niveles de ROS superiores a los fisiológicos reducen la transferencia de nutrientes y afecta los factores de supervivencia de los ovocitos, desencadenando la apoptosis de las células de la granulosa (Khazaei y Aghaz, 2017). Los embriones de mamíferos producen ROS principalmente a través de la fosforilación oxidativa, lo que implica un aumento gradual en la producción de ROS desde el embrión bovino de dos células hasta la etapa de mórula tardía. Esto puede atribuirse al consumo de oxígeno, glucosa y captación de piruvato durante el desarrollo del embrión, que luego empieza a disminuir en la etapa de blastocisto debido a la contribución de la glucólisis a la suplementación con ATP y a la inducción de defensa antioxidante (Tsantarliotou y Sapanidou, 2018).

El equilibrio entre las ROS y los mecanismos antioxidantes de defensa celular son esenciales para crear las condiciones favorables para la PIVE (Rocha-Frigoni *et al.*, 2016). Los antioxidantes pueden influenciar en la maduración *in vitro* de los ovocitos y el consiguiente desarrollo embrionario al ser adicionados al medio de cultivo (Mahmoud *et al.*, 2016). El glutatión (GSH) es un antioxidante que protege a las células contra los efectos nocivos del estrés oxidativo al reducir o eliminar las ROS (Sandal, 2018). El GSH es sintetizado a partir de tres aminoácidos constitutivos: la cisteína, glicina y glutamato (Anchordoquy *et al.*, 2019). El GSH es uno de los sulfhidrilos no proteicos compuestos, un tiol libre que protege el cigoto cultivado de estrés oxidativo (Goel *et al.*, 2017). El GSH juega un rol importante en la maduración de los ovocitos, la fertilización y desarrollo embrionario temprano, pero en general, ha sido poco estudiado durante la PIVE. La adición de antioxidantes (AO) durante la MIV reduce los niveles de especies reactivas de oxígeno en el sistema de cultivo al aumentar el contenido intracelular de GSH (Nikoloff *et al.*, 2020). Los AO pueden reducir el estrés oxidativo durante la MIV disminuyendo los niveles de ROS directamente o aumentando los niveles de GSH en los ovocitos, dependiendo del tipo de AO usado (Mukherjee *et al.*, 2014; Sovernigo *et al.*, 2017). Asimismo, el GSH mejora el desarrollo del embrión bovino cuando se encuentra en altas concentraciones durante la maduración *in vitro* (Anchordoquy *et al.*, 2019).

Se ha comprobado que los compuestos tiol de bajo peso molecular, como la cisteamina (CYS), pueden aumentar el contenido de GSH y la absorción de cisteína por los ovocitos durante la MIV (Sovernigo *et al.*, 2017). La CYS actúa dentro del embrión aumentando la síntesis de glutatión, otro potente AO (Silva *et al.*, 2018). La CYS es un pequeño amino tiol derivado de la degradación de la coenzima A (Gallego-Villar *et al.*, 2017) que actúa como precursor de GSH. Aunque no tiene un efecto directo sobre ROS,

contribuye a aumentar los niveles de GSH (Sovernigo *et al.*, 2017) reduciendo la cistina a cisteína y mejorando la síntesis de glutatión (Swami *et al.*, 2017). La cisteamina se agrega a los medios de MIV para mejorar la competencia de desarrollo de los ovocitos (Mahmoud *et al.*, 2016) y promueve el desarrollo temprano de embriones al facilitar la maduración citoplasmática de los ovocitos (Ranjbar *et al.*, 2019). Los compuestos de tiol como la cisteamina tienen diferentes efectos cuando se agregan al medio de cultivo de embriones y depende de la concentración utilizada, la especie y el tipo de ovocito (Mahmoud *et al.*, 2016). Dada la abundante cantidad de información publicada sobre el uso de la cisteamina como antioxidante en la PIVE de embriones en rumiantes, esta revisión de literatura tiene como objetivo hacer una actualización detallada de los conocimientos sobre este interesante tema biotecnológico.

### **Importancia de la Producción *in vitro* de Embriones**

La producción de embriones *in vitro* es una biotecnología desarrollada para obtener crías de animales de producción de alto valor genético (Quispe *et al.*, 2018), habiendo contribuido grandemente en la mejora genética de los rebaños bovinos en el mundo, y a disminuir el intervalo generacional (Kasinathan *et al.*, 2015). Mientras que en condiciones normales los bovinos pueden tener máximo una cría por vaca/año, el uso de esta biotecnología ha permitido multiplicar esta cifra. A partir de mediados de la década pasada la producción *in vitro* de embriones (PIVE) reemplazó progresivamente al sistema de múltiple ovulación y la transferencia de embriones (MOET) (Viana *et al.*, 2018), y para el año 2018, del total de embriones transferibles colectados o producidos en el mundo (n=1 499 367), 31.3% fueron embriones obtenidos *in vivo* (n=469 967) y 68.7% fueron producidos *in vitro* (n=1 029 400) (IETS, Embryo Technology Newsletter, 2019).

La producción de embriones transferibles *in vitro* se debió, en primer lugar, a la implementación de la aspiración folicular guiada por ultrasonido (*Ovum pick up* – OPU) como procedimiento rutinario para la obtención de ovocitos bovinos, que permitió la recolección de ovocitos de varias vacas donadoras en una jornada de trabajo (Viana *et al.*, 2018), sin someterlas a protocolos de estimulación ovárica o superovulación. En segundo lugar, el aumento de la eficiencia en la producción de embriones *in vitro* (Watanabe *et al.*, 2017), así como su aplicación a gran escala en establecimientos comerciales bovinos (Morotti *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2019) afectó positivamente el costo de los servicios relacionados y derivados de esta actividad, convirtiéndola en un negocio rentable, tanto para las compañías prestadoras del servicio como para las empresas ganaderas que se benefician de estas tecnologías (Viana *et al.*, 2018).

La PIVE implica la recolección de ovocitos viables que son obtenidos como complejos ovocito-células del cúmulo (COC), que luego son manipulados en condiciones de laboratorio a través de tres etapas: MIV, FIV y CIV. En general, los COCs se obtienen *post mortem* de ovarios de matadero, o *in vivo*, mediante la OPU. El primer procedimiento ha sido usado como modelo experimental para estudiar diversos aspectos relacionados con las diferentes etapas de la PIVE (Álvarez *et al.*, 2006; Manjunatha *et al.*, 2008) y poner a punto la tecnología, a fin de convertirla a una escala comercial (Sánchez *et al.*, 2019). Este procedimiento implica que los ovarios deben ser transportados al laboratorio, preferiblemente en un corto periodo. Estudios donde utilizaron ovocitos aspirados de ovarios de matadero y mantenidos en tubos de poliestireno con 400 ml de TCM-199 + HEPES en el aire encontraron que los ovocitos se pueden retener hasta 12 h sin perjudicar el desarrollo embrionario. Leivas (2002) asimismo observó una mejor calidad morfológica en embriones derivados de ovocitos transportados durante 6 h en líquido folicular antes de IVM; en tanto que Rauber

*et al.* (2002) registraron un mayor rendimiento de blastocistos en ovocitos contenidos en líquido folicular bovino de folículos grandes (>8 mm) en lugar de pequeños (3-5 mm).

En el laboratorio, los tejidos que rodean el ovario son removidos, y los ovarios son lavados varias veces en solución salina fisiológica. Luego los COC son aspirados de folículos de 2 a 8 mm de diámetro (Kubota y Yang, 1998) o por cortes sucesivos de la corteza ovárica o *slicing* (Gordon, 2003). La aspiración folicular se hace usualmente con jeringas desechables o con una línea de aspiración conectada a una bomba de vacío. En el segundo caso, la OPU permite obtener ovocitos de vacas de alto valor genético, hasta dos veces por semana sin afectar la efectividad de la técnica (Kruip *et al.*, 1994), cuyos embriones producidos *in vitro* pueden ser transferidos a hembras receptoras. La presión de vacío y el calibre de la aguja usadas en el proceso puede afectar la calidad de los ovocitos obtenidos (Bols *et al.*, 1996). Estudios demuestran que aplicando 80 mmHg se obtuvo una menor proporción de COCs de categoría A y B y de ovocitos maduros comparado con 65 y 50 mmHg (Perea *et al.*, 2017). La calidad de los ovocitos y la competencia para desarrollarse como embriones se afecta cuando la aspiración folicular se efectúa a presiones superiores a 50 mmHg (Ward *et al.*, 2000).

#### *Maduración in vitro*

La MIV es el primer paso de una serie de tres etapas que culminan con la producción de embriones transferibles. Eso implica colocar los COCs en una gota de medio de cultivo, en un ambiente a 38.5 °C, con un 5% CO<sub>2</sub> en aire y humedad de saturación, que promuevan su maduración y los prepare para la fecundación (Hernández, 2001). Durante esta fase el ovocito progresa desde un estadio de profase I (vesícula germinal) al de metafase II (MII) de la segunda división meiótica, en un lapso de 20 a 24 horas (Gordon, 2003), con la concomitante extrusión del primer corpúsculo polar. A la vez, se produ-

ce un proceso de maduración citoplasmática caracterizado por el almacenamiento de lípidos, distribución de mitocondrias y ribosomas, reducción de aparatos de Golgi y migración de los gránulos corticales (Heytell *et al.*, 1997). Por otra parte, se desarrolla un sistema de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , importante para el reinicio de la meiosis, fertilización y desarrollo del embrión (Damiani *et al.*, 1996). En condiciones adecuadas de maduración *in vitro*, 85 a 90% de los ovocitos alcanzan la MII; no obstante, la maduración citoplasmática y la adquisición de la capacidad total de desarrollo ovocitario no siempre ocurre de manera exitosa en la misma proporción (Ferré *et al.*, 2020). La calidad de los ovocitos y su capacidad de desarrollo posterior determinan la tasa de producción de blastocistos (Krisher, 2004) y la habilidad de estos para concluir en una gestación exitosa, una vez que son transferidos a hembras receptoras (Sirard *et al.*, 2006). Asimismo, las condiciones *in vitro* en las que maduran los ovocitos influyen en las etapas subsecuentes de la PIVE (Rizos *et al.*, 2001).

#### *Fecundación in vitro*

Una vez que los ovocitos han alcanzado la MII y han experimentado los cambios citoplasmáticos que los capacitan para la fecundación, se les coincuba con espermatozoides por 18-24 horas, en un ambiente a 38.5 °C, con una atmosfera con 5%  $\text{CO}_2$  en aire y humedad de máxima (Hernández, 2001). Para ello, los espermatozoides deben ser sometidos previamente a un proceso de lavado para eliminar el líquido seminal y el diluyente, además de separar los espermatozoides móviles y viables de los inmóviles y muertos (Hernández, 2001). Para esto se ha venido utilizando el método de *swim up* (Parrish y Foote, 1987) y el gradiente de Percoll (Palma, 2001), aunque en la actualidad hay productos comerciales como el Bovipure® y Puresperm® (Ruiz y Astiz, 2010).

Luego debe inducirse la capacitación espermática para que los espermatozoides puedan fecundar al ovocito (Palma, 2001). Varias sustancias han sido utilizadas para inducir la capacitación espermática *in vitro*, pero la heparina ha demostrado ser muy efectiva, y actualmente es usada en los laboratorios comerciales de fecundación *in vitro* (FIV) por su potente efecto inductor de la capacitación (Handrow *et al.*, 1982). Por otro lado, se requiere determinar la concentración espermática final por unidad de volumen, en dosis entre 1 y 5 millones de espermatozoides de acuerdo con el método, la raza, la concentración de heparina, el tiempo de cocultivo, la aptitud individual del toro (Palma, 2001) y el tipo de semen usado (convencional o sexado) (Ferré *et al.*, 2020). A las 48 horas de iniciada la FIV, la tasa de fecundación puede ser monitoreada por la proporción de estructuras clivadas, que normalmente varía entre 60 y 80% (Palma, 2001).

#### *Cultivo in vitro*

Al culminar la FIV, las células del cúmulo son removidas y los presuntos cigotos que han sido incubados por seis días, entre 20 a 40% de embriones alcanzan el estadio de blastocisto (Lonergan y Fair, 2008). Esta baja producción de blastocistos se debe en primer lugar, a la maduración citoplasmática incompleta de los ovocitos y a las condiciones de maduración *in vitro* insuficientes, que conduce a una activación alterada del genoma embrionario (Sirard *et al.*, 2006). En segundo lugar, a que los embriones necesitan una gran cantidad de sustancias como glicoproteínas, antioxidantes y factores de crecimiento, y la interacción con el epitelio oviductal y endometrio (Lonergan *et al.*, 2016); requerimientos que en condiciones *in vitro* no pueden ser alcanzados en su totalidad.

Los medios de cultivo han ido mejorando con el fin de proveer condiciones cada vez más parecidas a las del oviducto y ambiente uterino, con el propósito de favorecer

la segmentación, formación del blastocele y el desarrollo normal del embrión (Hernandez, 2001). En general, los medios de cultivo de embriones son soluciones con 99% de agua ultrapura, bufferada con el sistema  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ , con una osmolaridad entre 270 y 300 mOsm/L, y con una gran cantidad de constituyentes inorgánicos ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) y orgánicos (piruvato, lactato, glucosa, aminoácidos y otros) que emulan las condiciones del ambiente oviductal y uterino materno (Palma, 2001). Así, el análisis bioquímico del fluido oviductal de la oveja permitió el desarrollo de un medio usado intensamente en ovinos y bovinos, denominado fluido oviductal sintético (SOF) (Tervit *et al.*, 1972) y posteriormente mejorado para bovinos (Holm *et al.*, 1999). Para tratar de compensar las deficiencias de los medios de cultivo *in vitro*, en términos de constituyentes del fluido oviductal y uterino, se ha adicionado a los medios suero fetal bovino (FSC) o la albúmina sérica bovina (BSA) como fuentes proteicas.

La adición de 0.1, 0.5 o 1% (Mullaart *et al.*, 2015; Murillo *et al.*, 2017), o 2% (Leivas *et al.*, 2011) de FSC al medio de cultivo aumentó la cantidad y calidad de blastocistos producidos. Porcentajes mayores al 10% fueron asociados con efectos degenerativos y con el nacimiento de crías con el síndrome de descendencia grande, que se refiere al aumento del peso de los terneros al nacer, hidropesía del alantoides, abortos, mortalidad perinatal, terneros y placenta de gran tamaño (Farin *et al.*, 2001; Lazzari *et al.*, 2002). La adición de BSA con o sin 10% de FCS en el medio de cultivo produjo tasas de clivaje y porcentajes similares de blastocistos; sin embargo, el FSC disminuyó dramáticamente la criotolerancia de los blastocistos luego de la vitrificación (Rizos *et al.*, 2003).

### **Factores que Influyen la Producción *in vitro* de Embriones**

La producción *in vitro* de embriones en términos del número y calidad de blastocistos producidos depende de factores inherentes

al ovocito, y de los eventos que se desarrollan posteriormente una vez que los ovocitos son colectados del ovario. El primer caso hace referencia a la competencia del ovocito para madurar y desarrollarse como un embrión que alcanza el estadio de blastocisto en el día 7 luego de la FIV. La competencia ovocitaria depende a su vez de numerosos factores, algunos de los cuales son descritos a continuación. En el segundo caso, se deben a los medios de MIV, FIV, CIV usados, los aditivos agregados, las condiciones microambientales de incubación de los ovocitos y embriones, y la experticia en el manejo de las etapas del proceso *in vitro*.

### *Origen del ovocito*

El origen del ovocito (colectados de ovarios *post mortem* o mediante OPU) ha tenido resultados controvertidos. Karadjole *et al.* (2010), colectaron 469 y 250 ovocitos de ovarios de matadero y por OPU respectivamente, y obtuvieron mayor proporción de ovocitos de mayor calidad (grado 1 y 2) de los ovarios de matadero que de los colectados mediante OPU (10.8 y 5.7, respectivamente). No obstante, aunque la tasa de clivaje fue similar entre ambos grupos, una mayor proporción de embriones del grupo OPU alcanzó el estadio de blastocisto en el día 7 y 9, y tuvieron más blastómeros que los del grupo *post mortem*. En otro estudio se comparó la competencia de ovocitos de búfalas obtenidos por OPU (grupo A) y de ovarios *post mortem* (grupo B), y de ovarios de vacas *post mortem* (grupo C), obteniéndose mayor tasa de clivaje en C que en A y B; no obstante, la relación de blastocistos obtenidos y ovocitos madurados fue similar entre A y C, y superior a B (Gasparrini *et al.*, 2003). Por otro lado, Quispe *et al.* (2018) no encontraron diferencias en el desarrollo embrionario de ovocitos obtenidos de ambas fuentes.

### *Tamaño y fase de desarrollo folicular*

Lonergan *et al.* (1994) encontraron que la mayor proporción de ovocitos obtenidos de folículos >6 mm tenían más de cinco capas de células de la granulosa que los de menor

talla, y que de los primeros se obtuvo casi el doble de blastocistos que, de los obtenidos de folículos menores a 6 mm, aunque la tasa de clivaje y de eclosión de blastocistos fue similar entre ambos grupos. En otro estudio, el número de folículos pequeños (2-5 mm), medios (6-10 mm) y grandes (11-15 mm) fue mayor en la fase de crecimiento que en la de dominancia folicular. Asimismo, en las tres categorías de folículos la tasa de producción de blastocistos fue mayor en los colectados en la fase de crecimiento que en la de dominancia folicular (Machatkova *et al.*, 2004).

#### *Tamaño del ovocito*

El tamaño del ovocito parece tener relación con la competencia meiótica, capacidad desarrollo ovocitario y subsiguiente desarrollo embrionario. Fair *et al.* (1995) encontraron que el diámetro de los ovocitos aumentaba en la medida que aumentaba el diámetro de los folículos (de 98.9  $\mu\text{m}$  en los folículos <1 mm a 117  $\mu\text{m}$  en aquellos >4 mm). Observaron también que la maduración nuclear aumentaba con el incremento del diámetro ovocitario, y los ovocitos desarrollaron por completo la competencia meiótica cuando alcanzaron un diámetro de 110  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, Otoi *et al.* (1997) indicaron que la competencia meiótica se alcanzó en los ovocitos que obtuvieron un diámetro de 115  $\mu\text{m}$ , mientras que la capacidad completa de desarrollo (maduración nuclear y citoplasmática) cuando obtuvieron un diámetro no menor de 120  $\mu\text{m}$ .

#### *Tejido luteal*

Según las evidencias, la presencia de un cuerpo lúteo (CL) al momento en que se recuperan los ovocitos parece que tiene influencia en el número y calidad de los ovocitos obtenidos (Moreno *et al.*, 1993; Penitente-Filho *et al.*, 2015). Asimismo, una mayor proporción de blastocistos se desarrollaron con mayor rapidez cuando los ovocitos fueron colectados los días 14 a 16 del ciclo estral que en otros momentos del ciclo estral (Machatková *et al.*, 1995). Recientemente,

un estudio demostró que los ovocitos obtenidos de ovarios con un CL, con apariencia y características morfológicas del diestro, fueron más grandes y una mayor proporción de ellos habían culminado el crecimiento y estaban preparados para proseguir con la maduración, que los obtenidos del ovario contralateral sin un CL de la misma vaca, y de los recuperados de vacas sin CL en ambos ovarios (Argudo *et al.*, 2020). El enfoque experimental planteado en este estudio permite suponer que la influencia del tejido luteal en la competencia ovocitaria ocurrió a través de mecanismos intraováricos. Asimismo, en vacas lecheras, la concentración reducida de progesterona durante la primera onda folicular disminuyó la calidad del embrión (Rivera *et al.*, 2011) y la tasa de preñez pos-servicio (Denicol *et al.*, 2012).

#### *Otros factores*

Las condiciones del medio ambiente juegan un papel importante en la calidad de ovocitos que se recuperan y en la producción de embriones que se obtienen. En ambientes tropicales y subtropicales, y en los meses más calurosos en los climas templados, las vacas experimentan estrés calórico con mucha frecuencia. En estas condiciones la tasa de producción de blastocistos se ve considerablemente afectada (Al-Katanani *et al.*, 2002). Sin embargo, no todos los grupos genéticos bovinos responden de igual forma a los ambientes de estrés térmico. Las razas *Bos indicus* producen proporcionalmente mayor cantidad de blastocistos en condiciones de estrés calórico que las razas *Bos taurus* (Silva *et al.*, 2013; Sales *et al.*, 2015). También, algunas razas *Bos taurus* adaptadas al trópico, como las criollas y el Senepol, con pelaje de pelo corto y liso, han sido utilizadas para introducir rasgos que mejoran la termotolerancia de otras razas *Bos taurus* poco adaptadas a las regiones subtropicales y tropicales del planeta (Hansen, 2020). El efecto del estatus nutricional sobre la competencia ovocitaria y la subsecuente producción de embriones también ha sido descrito (Santos *et al.*, 2008).



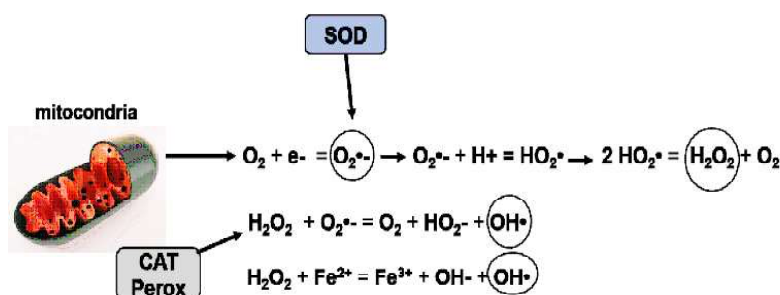


Figura 1. Formación de radicales libres y compuestos oxidantes derivados del oxígeno en la mitocondria. A través de la cadena respiratoria el oxígeno molecular es transformado en anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) al adquirir un electrón. Este al reaccionar con dos protones ( $\text{H}^+$ ) se transforma en dióxido de hidrógeno ( $\text{HO}_2$ ) y cuando reaccionan dos moléculas de este compuesto se origina el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) más oxígeno. EL peróxido de hidrogeno puede reaccionar con el anión superóxido y generar el radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) altamente tóxico. A su vez el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede reaccionar con el hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y originar más radicales hidroxilos. Enzimas como el superóxido dismutasa (SOD) y las catalasas y peroxidasas (CAT, Perox) intervienen catalizando estas reacciones. En el intermedio de estas reacciones otros radicales como el peroxil ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ), el alcoxil ( $\text{RO}^{\bullet}$ ) y el óxido nítrico ( $\text{ON}$ ) están presentes.

### Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

El metabolismo oxidativo es un proceso mediante el cual el organismo facilita la eliminación de sustancias como fármacos u otros compuestos haciéndolos solubles en agua para mejorar su eliminación a través de la orina. Por otro lado, a nivel celular la participación del oxígeno en la cadena respiratoria mitocondrial induce la producción de energía necesaria para los procesos celulares. Las alteraciones en este proceso metabólico pueden llevar a consecuencias dañinas a nivel celular en diferentes especies animales de metabolismo aeróbico (Cross *et al.*, 1987; Biller-Takahashi *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2017; Ulrich y Jacob, 2019).

Los fenómenos de oxidación y reducción están presentes en los organismos aeróbicos como indispensables en la obtención de energía. El oxígeno molecular representa uno de los oxidantes más potentes que puede inducir el estrés oxidativo. Durante el metabolismo oxidativo se producen varios radicales libres (RL) altamente oxidantes que

se conocen como especies reactivas de oxígeno (ROS) que son el resultado del metabolismo normal de la célula y que juegan también un papel importante en varias vías metabólicas. Varios componentes del ROS son esenciales para la defensa a infecciones ya que son potentes bactericidas y pueden destruir organismos patógenos (Cross *et al.*, 1987; Biller-Takahashi *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2017). La producción de ROS se localiza principalmente en la mitocondria, en los peroxisomas, en el citoplasma y en la membrana celular (Halliwell y Gutteridge, 1999). El proceso de transformar al oxígeno molecular (poco reactivo) a ROS (altamente reactivas) involucra la transferencia de un electrón o la absorción de energía por esta molécula. De esta manera se producen RL como el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), el radical hidroxilo ( $\text{HO}^{\bullet}$ ), el radical peroxil ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ), el radical alcoxil ( $\text{RO}^{\bullet}$ ) y el óxido nítrico ( $\text{ON}$ ) el cual también puede formarse del metabolismo del nitrógeno. También se producen compuestos no radicales como el peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el ácido hidrocioroso

(HClO), y compuestos unidos a metales de transición como el Cu y el Fe (Halliwell y Gutteridge, 1999; Sorg, 2004; Barreiros *et al.*, 2006; Ulrich y Jacob, 2019) (Figura 1).

Entre los ROS, el radical hidroxilo (HO•) es el más dañino, porque hay una gran dificultad en sacarlo de las células por su muy corta vida media. Este RL se forma en el cuerpo por reacción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con los metales de transición y por hidrólisis del agua por exposición a radiaciones ionizantes. No existe ningún antioxidante capaz de prevenir la acción del HO•, siendo solo posible inhibir su formación o reparar los daños causados por este (Halliwell *et al.*, 1995; Barreiros *et al.*, 2006) (Figura 1).

El radical anión superóxido (O<sub>2</sub>•-) suele estar inactivo, y en medios acuosos produce una molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y una molécula de oxígeno por dismutación, acción inducida por la SOD. Este RL forma parte de varias reacciones químicas con importantes funciones biológicas, como la reducción de la producción de radicales HO•, al reducir los quelatos de Fe, así como el Fe<sup>2+</sup> liberado de las proteínas de almacenamiento (ferritina y aconitasa) y las sulfoproteínas de hierro, además de reaccionar con el radical HO• produciendo oxígeno atómico (estado excitado) y reaccionar con el ON produciendo peroxinitrito (ONOO•) (Babior, 1997; Halliwell, 2000; Barreiros *et al.*, 2006). El radical superóxido, a pesar de sus efectos nocivos, tiene una función importante para la defensa inmunológica, siendo usado por las células fagocitarias, los linfocitos y los fibroblastos para destruir patógenos. El O<sub>2</sub>•- producido en las células puede ser eliminado por la enzima SOD, que cataliza la dismutación de dos moléculas de O<sub>2</sub>•- en oxígeno y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; sin embargo, cuando no hay eliminación enzimática (peroxidasas y catalasa), esta última molécula puede conducir a la formación de radicales OH• (Babior, 1997; Halliwell, 2000; Barreiros *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2017).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogeno) es un compuesto no radical poco reactivo que puede difundirse fácilmente a través de las membranas celulares y, en consecuencia, promover la formación del radical OH• después de unirse con los metales de transición (Fe, Cu), que suelen estar presentes en el interior de la célula. Esta molécula se genera por la dismutación del O<sub>2</sub>•- por las enzimas oxidasas, o incluso por la oxidación de los ácidos grasos. El peróxido de hidrógeno en la matriz mitocondrial se produce en abundancia durante el proceso de reducción del O<sub>2</sub>, pero puede ser eliminado parcialmente por la catalasa, las enzimas glutatión peroxidasa y las peroxidasas unidas a la tioredoxina, o puede ser liberado más adelante en el citoplasma de la célula. En los fagocitos, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un precursor de los ácidos hipoalógenos que son fuertes oxidantes contra los patógenos, pero también actúa de manera deletérea sobre las moléculas del propio organismo (Husain *et al.*, 1987; Vogt, 1995; Halliwell, 2000).

Los radicales libres tienen diferentes tipos de media vida y grados de reactividad. En general son muy inestables y pueden inducir oxidaciones no dependientes de enzimas en varios compuestos celulares tales como proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos. (Halliwell, 2009; Buonocore *et al.*, 2010; Hamanaka y Chandel, 2010). La formación de estos RL tiene varios orígenes: 1) el metabolismo oxidativo mitocondrial, a través del transporte de electrones en la cadena respiratoria en donde ocurre la formación de las ROS (Barreiros *et al.*, 2006); 2) la «explosión oxidativa» (del inglés *oxidative burst*) que ocurre en células del sistema inmunitario (neutrófilos, monocitos/macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y T) como estrategia para combatir patógenos oxidando los compuestos de los microorganismos y llevándolos a su destrucción (Park, 2003; Cathcart, 2004; Klebanoff, 2005; Dale *et al.*, 2008; Biller-Takahashi *et al.*, 2013); y 3) factores inductores de las ROS provenientes del ambiente.

## Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo (EO) es una condición que refiere al desequilibrio entre los niveles de las ROS y sus antioxidantes. Las ROS pueden aumentar y dañar lípidos, proteínas y el ADN. El EO ha sido vinculado a una gran variedad de enfermedades; sin embargo, las moléculas de las ROS también actúan en la defensa inmunológica, así como en la señalización de las vías celulares y en el mantenimiento de las funciones fisiológicas (Wood *et al.*, 2003; Schieber y Chandel, 2014). Las propiedades químicas de las ROS y los RL les dan reactividad a diferentes objetivos biológicos, y cuando están en exceso pueden causar la peroxidación de los lípidos de la membrana, el deterioro de las proteínas en los tejidos, de las membranas, las enzimas, los carbohidratos y el ADN (Cross *et al.*, 1987; Kiley y Storz, 2004; Finkel, 2011; Dong *et al.*, 2017). Los RL son átomos o grupos de átomos altamente reactivos que tienen un electrón no apareado en su último orbital, por lo que se los define como inestables. La inestabilidad hace que puedan unirse de forma no específica con otras moléculas. Los RL pueden formarse por absorción de la radiación ultravioleta o luz visible, por redox o por catálisis enzimática (Ferreira y Matsubara, 1997).

### Estrés Oxidativo en la Producción *in vitro* de Embriones

Uno de los problemas básicos en los sistemas de PIVE es la elevada generación de ROS y el consecuente EO que experimentan los ovocitos (Soto-Heras y Paramio, 2020) que compromete su competencia para desarrollarse a blastocistos luego de la FIV (Barros *et al.*, 2019). Una razón fundamental para que esto ocurra es que la tensión de oxígeno en el oviducto de los mamíferos es entre 5 y 7 puntos porcentuales menor que la presente en el aire atmosférico, que es de alrededor de 20% (Amin *et al.*, 2014; Ng *et al.*, 2018). Los ovocitos están expuestos al aire ambiental durante la colecta, manipulación y maduración, lo cual altera la

homeostasis oxidativa (Amin *et al.*, 2014; Barros *et al.*, 2019).

La exposición de embriones bovinos de 2-16 células a 20% de oxígeno redujo en más de 10% la producción de blastocistos en el día 7, disminuyó la criotolerancia y la expresión de Rnf2 (un factor de transcripción clave que regula muchos genes antioxidantes en células de mamíferos) y aumentó la producción de ROS en comparación a los expuestos a 5% de oxígeno (Amin *et al.*, 2014). Otras fuentes potenciales de EO son los cambios de temperatura y exposición a la luz visible durante la manipulación de ovocitos en un laboratorio (Soto-Heras y Paramio, 2020). Asimismo, la remoción del ovocito del interior de folículo impide que los antioxidantes presentes el fluido folicular ejerzan su acción para conservar la homeostasis oxidativa (Soto-Heras y Paramio, 2020).

### Sistema Antioxidante Celular

El organismo, ante el desequilibrio de la producción de los RL, presenta una estrategia para inhibir su formación o promover reacciones químicas para reducir la alta reactividad de estos compuestos a través de componentes antioxidantes, como las enzimas o los cofactores, obtenidos por la propia célula (fuente endógena) o a través de la dieta (fuente exógena). Los antioxidantes son sustancias que retrasan o impiden de manera significativa la oxidación de un sustrato oxidable (Sorg, 2004; Wang *et al.*, 2013; Franco y Martínez-Pinilla, 2017). Los antioxidantes producidos por el cuerpo actúan enzimáticamente disminuyendo el exceso de RL a través de enzimas como la SOD, la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) y también de componentes no enzimáticos como el GSH, los péptidos de histidina, las proteínas ligadas al hierro (transferrina y ferritina), el ácido dihidrolipoico y la ubiquinona (CoQH<sub>2</sub>) (Biller y Takahashi, 2018). En algunos antioxidantes dietéticos como  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno (pro-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), micronutrientes (selenio) y compuestos fenólicos, como

flavonoides y poliflavonoides se ha demostrado su efectividad en la protección celular contra los elementos oxidantes (Halliwell *et al.*, 1995; Pietta, 2000; Albuquerque *et al.*, 2017).

La SOD se encuentra en el citoplasma ( $\text{Cu}^{2+}$ -SOD y  $\text{Zn}^{2+}$ -SOD) y en las mitocondrias ( $\text{Mn}^{2+}$ -SOD), y actúa sobre el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  transformándose en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , evitando la acumulación de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , que es altamente reactivo y perjudicial para la célula. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido puede ser eliminado por las catalasas, la GPx y las peroxidasas unidas a la tioredoxina, o puede ser liberado más adelante en el citoplasma de las células (Lambeth, 2004; Brand, 2010; Schieber y Chandel, 2014; Li *et al.*, 2016). La CAT (derivada de las mitocondrias y los peroxisomas) cataliza la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ , la que es producida en abundancia por los fagocitos, y mantiene el equilibrio ideal de la formación y eliminación de las ROS, esencial para el funcionamiento del sistema de defensa innato.

La modulación de la producción de CAT es importante para muchos procesos, como la proliferación, la diferenciación, la migración celular y la apoptosis (Underhill y Ozinsky, 2002; Oost *et al.*, 2003; Malhotra y Kaufman, 2007; Veal *et al.*, 2007; Zamocky *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  también puede ser neutralizado por la GPx citosólica o la mitocondrial en presencia de GSH. El GSH también contribuye a la eliminación de los componentes electrofílicos a través de la reacción con la glutatión-S-transferasa. El sistema antioxidante basado en el GSH actúa en presencia de selenio, que es un micronutriente muy importante (Kieliszek y Blazejak, 2013; Brigelius-Flohe y Maiorino, 2013). El GPx desempeña un papel importante en la prevención de la peroxidación de los lípidos, ya que elimina el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y, por consiguiente, protege las membranas del daño por peroxidación (Sies, 1986;

Gaté *et al.*, 1999; Oost *et al.*, 2003; Scandalios, 2005; Monteiro *et al.*, 2006).

El ácido ascórbico o la vitamina C normalmente aparece en el cuerpo en forma de ascorbato y es un excelente antioxidante *in vivo*, ya que puede ser oxidado por la mayoría de los RL en solución acuosa, y convertido en sustancias poco reactivas. La vitamina C actúa uniéndose a las ROS y restaurando la concentración de los RL a través de la donación de  $\text{H}^+$  (protones) en las membranas celulares actuando con la vitamina E, regenerándola después de la interacción con las ROS. La vitamina C también actúa como agente reductor, principalmente en metales de transición disminuyendo los iones de Fe y Cu que reaccionan con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  para formar el radical  $\text{OH}^{\bullet}$  (Buettner, 1993; Babior, 1997). La vitamina E, *in vivo*, es un potente inhibidor de la peroxidación lipídica. Actúa como un donador de  $\text{H}^+$  para el radical peroxil ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ), interrumpiendo la reacción en cadena de la formación de los RL. La donación del  $\text{H}^+$  lleva a la pérdida de la función de la vitamina E; sin embargo, esta puede ser regenerada con la vitamina C (Storey, 1996; Theriault *et al.*, 1999; Monteiro *et al.*, 2006). El selenio (Se) es un micronutriente esencial que forma parte integral de varias enzimas antioxidantes como la GPx, la yodotironina de yodinasas, la tioredoxina reductasa y la selenofosfato sintetasa. Las Se-enzimas están incluidas en el sistema de defensa antioxidante (Hsu y Guo, 2002; Biller-Takahashi *et al.*, 2015; Chien *et al.*, 2003).

Los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos son esenciales para mantener el equilibrio entre la producción y la eliminación de los RL. Los antioxidantes son una defensa biológica importante contra el estrés oxidativo, participan en la desintoxicación de las células, y son muy importantes para comprender los efectos deletéreos de los RL (Bainy, 1996; Doyotte *et al.*, 1997; Ahmad *et al.*, 2000; Oruc *et al.*, 2004).

## Uso de Antioxidantes en la Producción *in vitro* de Embriones

Con el fin de reducir el estrés oxidativo que experimentan ovocitos y embriones durante la maduración ovocitaria y desarrollo embrionario *in vitro* se han probado numerosos antioxidantes, entre ellos quercetina, cisteamina, carnitina, vitamina C y resveratrol. Se obtuvo reducción ( $p < 0.05$ ) en ROS en los grupos de quercetina ( $27.5 \pm 3.4$ ), vitamina C ( $27.1 \pm 3.0$ ) y resveratrol ( $28.1 \pm 4.7$ ) comparado con cisteamina ( $34.9 \pm 4.5$ ), carnitina ( $34.6 \pm 3.8$ ) y control (sin antioxidante;  $36.5 \pm 5.2$ ) (Sovernigo *et al.*, 2017). Los niveles de GSH fueron mayores ( $p < 0.05$ ) en los grupos de ovocitos tratados con cisteamina ( $63.5 \pm 5.5$ ) y carnitina ( $60.8 \pm 4.4$ ) que en quercetina ( $52.7 \pm 5.1$ ), vitamina C ( $53.0 \pm 3.8$ ), y resveratrol ( $53.1 \pm 4.4$ ). Si bien la maduración nuclear, la tasa de clivaje y la de blastocistos eclosionados no varió entre grupos, el porcentaje de blastocistos fue mayor en los grupos tratados con antioxidantes (varió entre 52.1 y 54.2%) que en el grupo control ( $47.2 \pm 2.7\%$ ,  $p < 0.05$ ) (Sovernigo *et al.*, 2017).

An Q *et al.* (2019) encontraron que la suplementación del medio de maduración de ovocitos con melatonina redujo eficazmente el estrés oxidativo, disminuyó los niveles de apoptosis temprana, recuperó la integridad de las mitocondrias, mejoró el ensamblaje del huso y la alineación cromosómica en los ovocitos, mejorando además el desarrollo posterior de embriones clonados *in vitro*.

Otra sustancia, el anetol, compuesto orgánico derivado de la planta *Croton zehntneri*, fue usado en concentraciones de 30, 300 y 2000  $\mu\text{g/ml}$  para evaluar su capacidad antioxidante durante la maduración de ovocitos bovinos, encontrando que el porcentaje de metafase II fue similar entre tratamientos, en tanto que la concentración de 300  $\mu\text{g}$  mejoró significativamente la tasa de clivaje y de producción de embriones (Sá *et al.*, 2019). Asimismo, estos autores encontraron que el anetol no redujo la producción de ROS, la concentración indicada incrementó los niveles del poder antioxidante reductor férrico

y el potencial de la membrana mitocondrial, demostrando su capacidad para regular el balance de redox y mejorar la función mitocondrial en los ovocitos y embriones.

Por otra parte, Santos *et al.* (2019) evaluaron la capacidad antioxidante del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (EOSA) en cuatro concentraciones (0, 10, 15, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) y la compararon con la cisteamina (100  $\mu\text{M}$ ) sin encontrar diferencia en la tasa de maduración ovocitaria ni en la reducción de los ROS. Sin embargo, los ovocitos tratados con 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$  de EOSA y con cisteamina tuvieron menor potencial de membrana mitocondrial que el grupo control, además de mejorar la producción de blastocistos y el número de blastómeros.

### Cisteamina (CYS)

#### a) Características químicas

La CYS es una molécula simple de aminotiol que se utiliza para tratar la cistinosis nefropática (Elmonem *et al.*, 2016). Esta molécula también es conocida como 2-aminoetanoetiol, thioetanolamina y compuesto 60-23-1, entre otros. Su peso molecular es de 77.15 g/mol y su fórmula química es  $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ . La CYS es una amina que se deriva de una etilamina y está compuesta por un esqueleto de etano sustituido por un grupo tiol en el C-1 y un grupo amino en el C-2; es decir es una amina y un tiol (Figura 2) (National Center for Biotechnology Information, 2020). La CYS se encuentra en los tejidos del músculo, bazo y páncreas en el humano, incluso se ha detectado en la orina, y a nivel de célula se le encuentra principalmente en el citoplasma participando en varias reacciones enzimáticas; es así que el ácido pantoténico y la CYS pueden biosintetizarse a partir de la panteteína mediante la acción de la enzima pantetheinasa (Cavallini *et al.*, 1963). Además, la CYS puede convertirse en hipotaurina, lo que está mediado por la enzima 2-aminoetanoetiol dioxigenasa (Emmet, 1958). En los seres humanos, la CYS participa en la vía de la biosíntesis del pantotenato y el CoA y en la

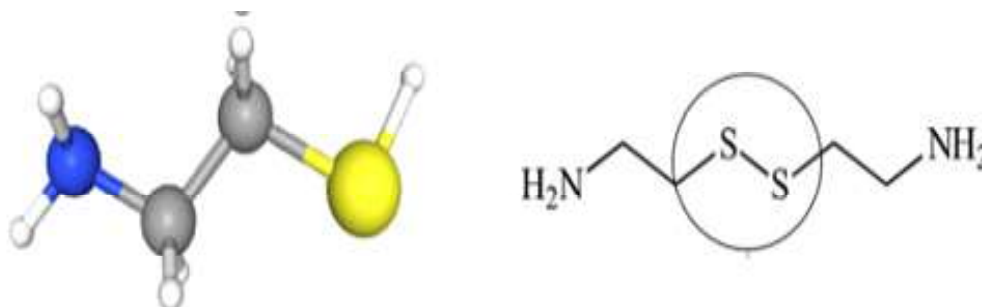


Figura 2. Estructura de la cisteamina. La fórmula química es  $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ . Es una amina que se deriva de una etilamina y está compuesta por un esqueleto de etano sustituido por un grupo tiol (círculo) en el C-1 y un grupo amino en el C-2. Fuente. National Center for Biotechnology Information (2020).

vía del metabolismo de la taurina y la hipotaurina (Emmet, 1958; Cavallini *et al.*, 1963; Hamilton *et al.*, 1979; Morakinyo *et al.*, 2012). En el Cuadro 1 se resumen las propiedades químicas de la cisteamina.

#### b) Mecanismos de acción

El efecto antioxidante de la CYS se debe al grupo tiol de la molécula. Además, la CYS promueve el transporte de cisteína al interior de las células, favoreciendo la síntesis de glutatión. A través de su grupo tiol, la CYS elimina de la célula al  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , especialmente cuando está totalmente ionizado (Ulrich y Jacobs, 2019). La eliminación del protón del grupo sulfhidrilo aumenta la reactividad del grupo tiol (Ulrich y Jacob, 2019). La oxidación de los grupos tiol de la CYS por el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  puede disminuir las defensas contra otros grupos de oxidantes y alterar el balance redox a un estado más oxidativo (Winterbourn y Metodieva, 1999). La CYS puede además inhibir la actividad de la transglutaminasa 2 (TG2) al formar un disulfuro mixto (Folk, 1980; Lorand y Conrad, 1984; Gentile y Cooper, 2004; Jeitner *et al.*, 2018).

La TG2 ha sido asociada a varias enfermedades humanas incluyendo los procesos infecciosos y el estrés oxidativo (Szondy *et al.*, 2017). La CYS también disminuye la lipoperoxidación intralisosomal relacionada con la arteriosclerosis. A este respecto, la consiguiente acumulación de cistina en los lisosomas de todas las células del cuerpo conduce a disfunción progresiva de múltiples órganos por incremento del estrés oxidativo incluyendo al endotelio vascular. El aumento de la concentración lisosomal de cistina se asocia al aumento de la apoptosis celular y del estrés oxidativo, y con alteraciones del metabolismo del glutatión y ácido araquidónico (Levtchenko *et al.*, 2005; Ariceta, 2015). La CYS reacciona con la cistina para formar el disulfuro mixto de cisteamina y cisteína, que puede salir del lisosoma a través del sistema de transporte de lisina/arginina (Jézégou *et al.*, 2012), por ende, la extracción de la cistina por la CYS constituye un efecto indirecto antioxidante. Además, por efectos directos antioxidantes CYS puede prevenir la oxidación intralisosomal de las lipoproteínas de baja densidad (Ahmad y David, 2019) (Figura 3).

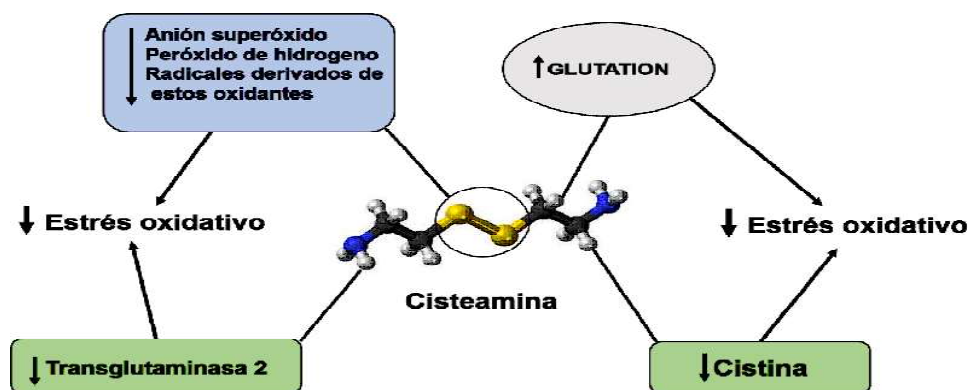


Figura 3. Mecanismos antioxidantes de la cisteamina. La cisteamina puede tener mecanismos de acción directos o indirectos para disminuir el estrés oxidativo. A través del grupo tiol (círculo) la cisteamina puede interactuar con el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno disminuyendo sus efectos oxidantes y la concentración de los radicales oxidantes que se derivan de ellos. Por otro lado, puede inducir aumento en la concentración de glutatión que es un poderoso agente antioxidante. A través de efectos indirectos la cisteamina puede disminuir el estrés oxidativo inhibiendo compuestos como la transglutaminasa 2 y la cistina que están involucrados en el estrés oxidativo. Fuente: Adaptada de Cystamine 3D ball.png. (Wikimedia Commons)

### c) Efecto en las células reproductivas

El uso de la CYS para mejorar las condiciones de las células de la reproducción de mamíferos se ha documentado. La CYS mejora la maduración *in vitro* de ovocitos por mecanismos mediados por el aumento del glutatión (GSH) intra-ovocito y disminución de ROS (Zhenwei y Xianhua, 2019). De la misma manera, la suplementación con CYS del medio de cultivo para la maduración *in vitro* de ovocitos aumentó significativamente el nivel de GSH de los ovocitos de primates *Macaca* con cúmulos intactos y redujo la incidencia de la formación de fertilización anormal, efecto que no se observó en los ovocitos desnudos (Curnow *et al.*, 2010).

También se ha demostrado que la adición de CYS en el medio de cultivo de ovocitos bovinos mejoró la fertilidad, la competencia en materia de desarrollo y la criotolerancia después de la vitrificación, probablemente debido al aumento de la síntesis de GSH durante el proceso de maduración *in vitro* (Oyamada y Fukui, 2004). Mahmoud *et al.* (2016) señalan que la CYS en el medio de maduración mejora la maduración nuclear de los ovocitos de búfalo, aunque no tuvo un efecto positivo en la criotolerancia durante la vitrificación. Estos resultados sugieren que el uso de la CYS mejora las condiciones de las células germinales de mamíferos. El mecanismo de acción sería posiblemente por su acción antioxidante al promover el incremento

Cuadro 1. Propiedades químicas de la cisteamina

Nombre	Valor
Peso molecular	77.15 g/mol
XLogP3-AA	-0.4
Suma de átomos donadores de H	2
Suma de átomos receptores de H	2
Numero de uniones con rotación libre	1
Masa exacta	77.02992 g/mol
Masa monoisotópica	77.02992 g/mol
Área de superficie polar topológica	27 Å <sup>2</sup>
Cuenta de átomos pesados	4
Carga formal	0
Complejidad	10
Cuenta de átomos isotópicos	0
Cuenta de estero-centros de átomos definidos	0
Cuenta de estero-centros de átomos no definidos	0
Cuenta de estero-centros de uniones definidas	0
Cuenta de estero-centros de uniones no definidas	0
Cuenta de unidades de unión covalentes	1

National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 6058, Cysteamine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6058>

de un potente antioxidante como el GSH. También se ha demostrado su efecto benéfico en células reproductivas de pollos, donde disminuyó la peroxidación lipídica en espermatozoides mejorando la fertilidad (Thananurak *et al.*, 2020). Por otro lado, se encontró que el tratamiento de macrófagos cultivados con CYS redujo la generación celular de las ROS (Okamura *et al.*, 2014).

#### Uso de la Cisteamina en la Producción *in vitro* de Embriones en Rumiantes

Se describen los efectos que tiene la CYS en la PIVE en bovinos, bubalinos, caprinos y ovinos. En el caso de bovinos se

tienen cinco trabajos que fueron presentados en la Conferencia Anual de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones en New Orleans, EEUU, 2019, cuyos resúmenes se publicaron en la revista *Reproduction, Fertility and Development*. Como muestra la Figura 4, el interés sobre este tema en rumiantes ha ido aumentando y desde 2015 se han publicado 19 artículos, que representan el 33.3% de los encontrados y publicados en los últimos 27 años. Es importante señalar que el primer artículo publicado sobre el efecto de la CYS en la PIVE en bovinos fue publicado por Takahashi *et al.* (1993), y sus resultados son presentados más adelante en esta revisión.



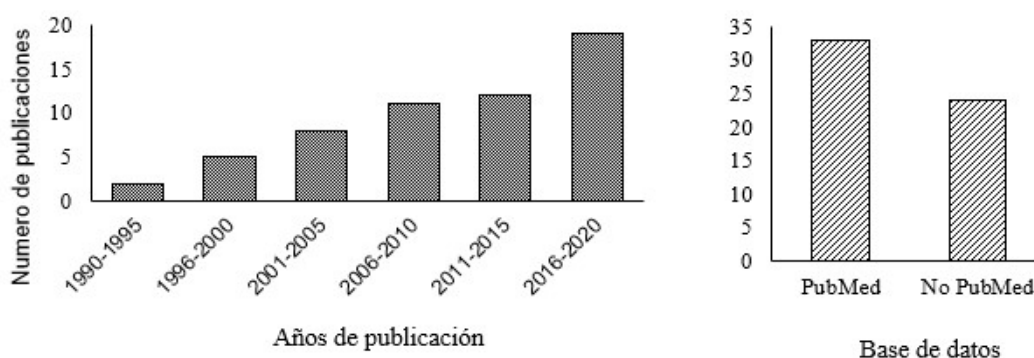


Figura 4. Artículos publicados sobre el efecto de la cisteamina en la producción *in vitro* de embriones en rumiantes. Fuente: base de datos PubMed y Google Scholar

### *Efectos de la cisteamina en la producción in vitro de embriones en bovinos*

#### *a) Adición en el medio de maduración*

Algunos de los primeros artículos que demuestra el rol antioxidante de la CYS en la PIVE fueron publicados por de Matos *et al.* (1995, 1996, 2000, 2002) usando varios enfoques experimentales. La adición de 25  $\mu\text{M}$  de CYS en la MIV fue suficiente para mejorar la producción de blastocistos, y tuvo un rendimiento de embriones similar a 50 y 100  $\mu\text{M}$ . Asimismo, se encontró que la concentración de GSH, la tasa de clivaje y de blastocistos fue menor en los ovocitos cultivados con CYS y butionina sulfoximina (BSO) que solo con CYS y que la tasa eclosión de blastocistos luego de la criopreservación no varió entre el grupo CYS y el control (de Matos *et al.*, 1996, 2002).

En otro estudio más reciente la suplementación de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de CYS mejoró la tasa de maduración de ovocitos en comparación con niveles superiores (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) o menores (0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Guo *et al.*, 2009). Asimismo, la adición de B-mercaptoethanol, cisteína y cistina al medio de maduración incrementó significativamente la producción de GSH y de blastocistos en el día 7 con res-

pecto al control, confirmando el efecto antioxidante de estos compuestos thiol (de Matos *et al.*, 2000).

La adición de 0.5, 5, 50 y 500  $\mu\text{M}$  de CYS no tuvo efecto en la tasa MIV ni de FIV, pero una concentración de 5  $\mu\text{M}$  aumentó significativamente la producción de blastocistos con respecto al control (Geshi *et al.*, 1999). Aparentemente, 500  $\mu\text{M}$  de CYS en la MIV tuvo un efecto nocivo en los ovocitos porque, aunque generó el mayor contenido ovocitario de GSH y, por lo tanto, de actividad contra el estrés oxidativo, redujo por debajo del control la tasa de desarrollo de blastocistos (Geshi *et al.* 1999). En concordancia con este hallazgo, la adición de 10 mM CYS al medio de maduración redujo cerca de 6 y 10 veces las tasas de clivaje y de blastocistos, respectivamente, en comparación a concentraciones menores (0.1, 0.5, 1 mM) (Canel *et al.*, 2015), y este efecto perjudicial se observó tanto en un ambiente bajo (5%) como alto (20%) de oxígeno (Canel *et al.*, 2018).

No obstante las evidencias del efecto beneficioso de la CYS, algunos estudios no encontraron mejoras en la tasa de fertilización y/o de clivaje (Kelly *et al.*, 2005; Karadjole *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2010;

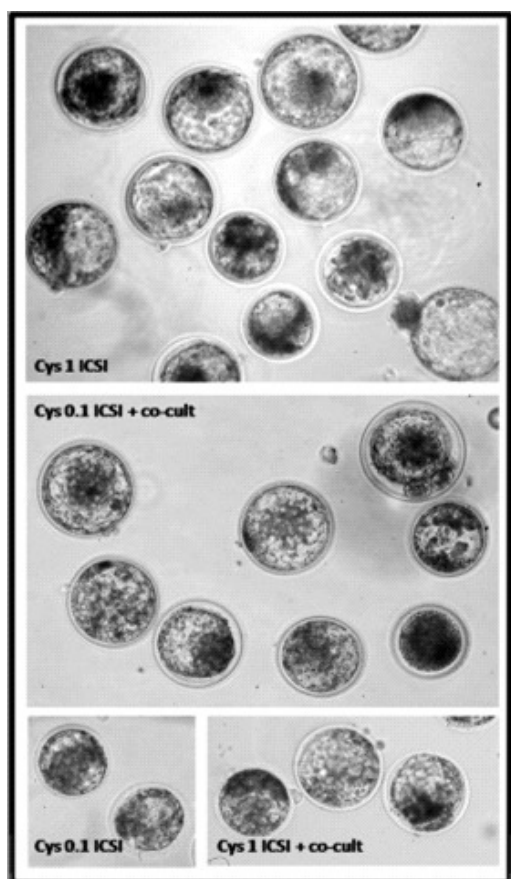


Figura 5. Blastocistos luego de la ICSI en el día 7 de cultivo *in vitro*. Cys 1 ICSI: los ovocitos fueron MIV con 1 mM Cys antes de la inyección de esperma. Cys 0.1 ICSI + co-cultivo: los ovocitos se MIV con Cys 0.1 mM y los espermatozoides se co-incubaron con COC durante 3 h antes de la inyección de esperma. Cys 0.1 ICSI: los ovocitos fueron MIV con Cys 0.1 mM antes de la inyección de esperma (control). Cys 1 ICSI + co-cultivo: los ovocitos fueron MIV con Cys 1 mM y los espermatozoides se co-incubaron con COC durante 3 h antes de la inyección de esperma. 40X (Tomado de Canel *et al.*, 2018)

Gottardi *et al.*, 2012; Merton *et al.*, 2013; Canel, 2015; Ranjbar *et al.*, 2019), aunque hubo mejoras en la tasa de producción de blastocistos o en el número total de blastómeros (Karadjole *et al.*, 2006;

Balasubramanian y Rho, 2007; Merton *et al.*, 2013; Anchordoquy *et al.*, 2015; Quintanilla *et al.*, 2015). Sin embargo, otros estudios no observaron efectos beneficiosos de la CYS en la producción de blastocistos o de blastocistos eclosionados cuando se adiciona en la MIV (Kelly *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2010; Adona *et al.*, 2011; Gottardi *et al.*, 2012; Canel *et al.*, 2015; Ranjbar *et al.*, 2019).

En otro interesante enfoque experimental, la adición de 100  $\mu$ M de CYS al medio de maduración mitigó el efecto dañino del enfriamiento por 30 min a 0 °C de embriones de dos células (30-34 h pos-fertilización) con respecto a los no enfriados, en términos de porcentajes de blastocistos y número de blastómeros por embrión (Balasubramanian y Rho, 2007). Asimismo, la adición de CYS en la MIV de ovocitos que luego fueron vitrificados/calentados, fertilizados y los presuntos embriones cultivados, aparentemente les confirió algún tipo de crioprotección dado que se obtuvo una mayor proporción en el estadio de blastocisto en el día 8, en comparación a los vitrificados no suplementados con CYS (38.5 vs 5.0%, respectivamente;  $p < 0.001$ ) (Canel *et al.*, 2015). Por el contrario, la presencia de CYS durante la maduración no mejoró la tasa de reexpansión y de eclosión de blastocistos derivados de ovocitos *post mortem* luego de la congelación y descongelación (Merton *et al.*, 2013), ni afectó la tasa de preñez de hembras receptoras transferidas con embriones *in vitro* de ovocitos obtenido por OPU (Merton *et al.*, 2013).

Merton *et al.* (2013) encontraron que si bien la tasa de clivaje de ovocitos derivados de matadero madurados con la adición de CYS fue similar al control (sin CYS), la de aquellos obtenidos mediante OPU fue significativamente mayor. Adicionalmente, la adición de CYS mejoró la producción de blastocistos en el día 7 en ambos grupos de ovocitos, con la particularidad que en los derivados de OPU se obtuvieron 1.6 veces más embriones transferibles si la CYS estuvo pre-

Cuadro 2. Efectos de la cisteamina (50  $\mu$ M) en ausencia o presencia de butionina sulfoximida (BSO; 5 mM) y cistina (0.3 mM) durante la MIV sobre el desarrollo posterior del embrión (Gasparrini *et al.*, 2003, 2006)

Tratamientos	Ovocitos (n)	Clivaje (%)	Blastocistos al día 7 (n)
Control	99	67.0 $\pm$ 8.5 <sup>a</sup>	19.5 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>
Control + BSO	100	46.6 $\pm$ 7.5 <sup>b</sup>	3.1 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>
Control CYS - cistina	286	55.0 $\pm$ 14.1 <sup>a</sup>	11.8 $\pm$ 4.3 <sup>a</sup>
Cisteamina	101	66.7 $\pm$ 5.7 <sup>a</sup>	30.1 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>
Cisteamina + BSO	105	51.3 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>	4.8 $\pm$ 1.7 <sup>c</sup>
Cisteamina	285	66.1 $\pm$ 10.6 <sup>b</sup>	22.7 $\pm$ 6.6 <sup>b</sup>
Cistina	231	73.5 $\pm$ 10.6 <sup>b,c</sup>	26.9 $\pm$ 6.8 <sup>b</sup>
Cistina + cisteamina	309	78.4 $\pm$ 5.3 <sup>c</sup>	25.4 $\pm$ 4.5 <sup>b</sup>

Valores con diferente letra (a,b,c) dentro de cada columna son significativamente diferentes (p<0.05)

Cuadro 3. Efecto de dos antioxidantes en combinación con cisteamina (CYS) en la tasa de clivaje y producción de blastocistos (Fuente: <sup>1</sup> El Shima *et al.*, 2017 y <sup>2</sup> El Sokary *et al.*, 2017)

Grupos	Tasa de clivaje (%)	Embriones (n)	Blastocistos (%)
Ácido ascórbico <sup>1</sup>	56.8 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	92 <sup>a</sup>	7.2 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>
Ácido ascórbico + CYS	65.2 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	80 <sup>b</sup>	12.3 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>
Control <sup>2</sup>	60.2 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup>	-	7.4 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>
CYS	66.1 $\pm$ 1.9 <sup>bc</sup>	-	9.1 $\pm$ 1.2 <sup>bc</sup>
Melatonina	70.5 $\pm$ 0.9 <sup>cd</sup>	-	12.8 $\pm$ 1.0 <sup>cd</sup>
Melatonina + CYS	74.0 $\pm$ 1.7 <sup>d</sup>	-	14.8 $\pm$ 0.6 <sup>d</sup>

Valores con diferente letra (a,b,c,d) dentro de cada columna difieren significativamente (p<0.05)

sente en la MIV. Por otro lado, aunque no se observaron efectos de la adición de CYS en MIV de ovocitos que fueron fecundados *in vitro* de forma convencional, los que maduraron con 1 mM de CYS y que fueron sujetos a inyección intracitoplasmática de

espermatozoides (ICSI), previamente coincubados con COC por 3 h lograron desarrollarse a blastocisto en una proporción mayor que los no incubados con COC o que maduraron con mayores concentraciones de CYS (Canel *et al.*, 2015, 2018; Figura 5).

Cuadro 4. Efecto de la suplementación de cisteamina en el medio de maduración (100  $\mu$ M) y de cultivo (200  $\mu$ M) sobre la tasa de clivaje y subsecuente desarrollo embrionario (Modificado de De *et al.*, 2011)

Grupo	Control	Cisteamina
Ovocitos (n)	190	215
Clivaje (%)	129 (67.9) <sup>a</sup>	182 (84.6) <sup>b</sup>
Embriones (%)	47 (24.7) <sup>a</sup>	99 (46.0) <sup>b</sup>
Blastocistos (%)		
día 7 BE	7 (3.7) <sup>a</sup>	13 (6.0) <sup>b</sup>
día 8 BE	15 (7.9) <sup>a</sup>	37 (17.2) <sup>b</sup>
día 9 B	17 (8.9) <sup>a</sup>	29 (13.5) <sup>b</sup>
día 9 BE	8 (4.2) <sup>a</sup>	20 (9.3) <sup>b</sup>

Valores en la misma fila con letras diferentes difieren ( $p < 0.05$ )

B: blastocistos; BE: blastocistos expandidos

Recientemente, Chowdhury *et al.* (2020) incubaron COCs por 22 h con ARN secuenciador en presencia y ausencia de CYS, observando que 59 genes se expresaron diferencialmente en ambos grupos de ovocitos, donde el grupo tratado con CYS tenía 36 genes sobrerregulados y 23 subregulados. El primer grupo de genes favorece un mayor desarrollo embrionario, mientras que los genes que se subregularon parecían afectarlo.

#### b) Adición en el medio de fecundación o de cultivo *in vitro*

Takahashi *et al.* (1993) compararon el efecto de dos compuestos tiol, CYS y B-mercaptoethanol (B-ME), los cuales fueron agregados al medio de cultivo en dos concentraciones (10 y 50  $\mu$ M en ambos casos) luego que los embriones alcanzaron el estadio de 6-8 células, encontrando que las dos concentraciones de antioxidantes produjeron proporcionalmente más blastocistos y

blastocistos expandidos que el grupo control. Asimismo, la concentración de 50  $\mu$ M resultó en un mayor incremento de GSH en CYS que en B-ME y en el grupo control ( $p < 0.01$ ).

La adición de 100  $\mu$ M de CYS al medio MIV y luego 0 (0/0; 100/0), 25 (100/25), 50 (100/50) y 100 (100/100)  $\mu$ M de CYS al medio CIV resultó en una tasa de desarrollo de blastocistos similar entre tratamientos, que luego mejoró significativamente en la tasa de eclosión de blastocistos en el grupo CYS 100/50 con respecto al control (0/0;  $p < 0.005$ ) (de Matos *et al.*, 2002). La adición de CYS al medio de cultivo de embriones no incrementó el porcentaje de blastocistos expandidos con respecto a adicionarlo únicamente en el medio de maduración (83.3 vs 72.7%;  $p > 0.05$ ) (de Matos *et al.*, 2002), hallazgo que también fue observado por Merton *et al.* (2013). Por el contrario, Silva *et al.* (2010) observaron que la suplementación de 150  $\mu$ M de CYS al medio FIV y CIV mejoró significativamente los porcentajes de blastocistos en el día 7 y de blastocistos eclosionados en el día 9, con respecto al control (no CYS) o a los COC madurados en presencia de CYS.

#### Efectos de la cisteamina en la producción *in vitro* de embriones en bubalinos

##### a) Adición en el medio de maduración

Gasparrini *et al.* (2000, 2003, 2006) demostraron beneficio de adicionar CYS en la MIV de ovocitos de búfala. En un trabajo inicial probaron cuatro concentraciones de CYS (0, 50, 100 y 200  $\mu$ M/l) sin encontrar mejoras en el porcentaje de clivaje con respecto al control, aunque la suplementación con 50  $\mu$ M/l incrementó la proporción de mórulas compactas y blastocistos, y de blastocistos transferibles (Gasparrini *et al.*, 2000). Luego, en ovocitos suplementados con CYS, BSO o CYS+BSO demostró que la presencia de CYS incrementó significativamente la concentración de GSH por ovocito con relación a los ovocitos inmaduros

y a los madurados en comparación con los otros grupos (Gasparrini *et al.*, 2003). Asimismo, al igual que en el estudio anterior, la adición de CYS al medio MIV no mejoró la tasa de clivaje, pero aumentó 1.5 veces el porcentaje de blastocistos en el día 7 ( $p < 0.01$ ; Gasparrini *et al.*, 2003). Sin embargo, en un reporte posterior la CYS incrementó significativamente el porcentaje de clivaje con respecto al control, y la combinación de CYS y cistina potenció el efecto beneficioso sobre este parámetro, aunque no hubo diferencia significativa en la producción de blastocistos (Gasparrini *et al.*, 2006; Cuadro 2).

La suplementación del medio de MIV con IGF-1 + CYS, IGF-1 + B-ME, EGF + CYS, EGF + B-ME no modificó la tasa de maduración con respecto al control (sin factores de crecimiento y antioxidantes); sin embargo, IGF-1 + CYS incrementó la tasa de clivaje (71.9%) con respecto a los demás tratamientos (IGF-1 + B-ME: 45.2%; EGF + B-ME: 46.4%), pero no respecto al control (63.8%) y EGF + CYS (60.7%); asimismo, la tasa de blastocistos fue significativamente superior en los grupos tratados con IGF-1 + CYS o IGF-1 + B-ME que en los demás grupos (Singhal *et al.*, 2009).

La incubación de ovocitos con 0 o 50 mM de CYS y posteriormente vitrificados/calentados mostró que los que fueron madurados con CYS experimentaron una tasa de maduración mayor que los no expuestos al antioxidante, aunque esta diferencia se desvaneció luego de la criopreservación y ambos grupos tuvieron igual proporción de ovocitos viables (Mahmoud *et al.*, 2016). La misma concentración de CYS en el medio de MIV resultó en una mayor tasa de formación de GSH, de maduración, de penetración de espermatozoides y de formación de pronúcleos masculinos con respecto al grupo control, así como también formación de más mórulas compactas y de blastocistos (Ocampo y Ocampo, 2015).

El Cuadro 3 resume los resultados de dos publicaciones en las que se usan antioxidantes en la maduración de ovocitos

bubalinos, donde la CYS potencia el efecto antioxidante de los otros compuestos (El Shima *et al.*, 2017; El Sokary *et al.*, 2017).

#### *b) Adición en el medio de fecundación o de cultivo in vitro*

La adición de CYS al medio de MIV (50  $\mu$ M) y de CIV (100  $\mu$ M) fue usada como estrategia experimental para evaluar su efecto sobre el daño en el ADN, y sobre la tasa de clivaje y de producción de blastocitos (Mukherjee *et al.*, 2010). En comparación a los controles, la suplementación con CYS aumentó ( $p < 0.01$ ) la tasa de clivaje y la proporción de ovocitos que se desarrollaron hasta el estadio de 8-16 células. El daño de ADN fue menor de menor magnitud en el grupo CYS que en los controles de 8 a 16 ( $19.3 \pm 4.24$  vs  $72.0 \pm 5.22\%$ ), pero no en los embriones en estadio de dos células ( $11.7 \pm 5.63$  vs  $20.8 \pm 5.49\%$ ), ni en los ovocitos maduros ( $5.3 \pm 3.43$  vs  $10.3 \pm 4.73\%$ ).

En otro estudio se suplementaron los medios MIV o CIV con 0, 50, 100 o 200  $\mu$ M de CYS. La adición de 50  $\mu$ M de cisteamina en el medio MIV aumentó significativamente el porcentaje y la tasa de eclosión de blastocistos, pero no afectó la de clivaje ni el número de células por embrión (Anand *et al.*, 2008). No obstante, una concentración de 200  $\mu$ M redujo significativamente el rendimiento de los blastocistos, pero no en el número de células por embrión, tal como se observó en ovocitos bovinos tratados con altas concentraciones de CYS (Geshi *et al.*, 1999; Canel *et al.*, 2015). Por otro lado, la suplementación de medio MIV con 50  $\mu$ M y de medio CIV con 100  $\mu$ M de cisteamina aumentó al doble el porcentaje de blastocistos y de blastocisto que eclosionaron ( $p < 0,01$ ), pero no tuvieron efecto sobre la tasa de clivaje o el número de células por embrión (Anand *et al.*, 2008). El efecto antioxidante de la CYS adicionada en el medio de MIV (50  $\mu$ M) y CIV (100  $\mu$ M) se confirmó mejorando la tasa de blastocistos y, además, porque incrementó la expresión de genes anti-apoptosis y disminuyó los que la promueven (Elamaram *et al.*, 2012).

### *Efectos de la cisteamina en la producción in vitro de embriones en caprinos*

#### *a) Adición en el medio de maduración*

Urdaneta *et al.* (2004), utilizando 400 mM de CYS en el medio de MIV y 1 nM de GSH en el medio de FIV observaron un incremento en el porcentaje de ovocitos que alcanzaron la MII comparado con los no suplementados (82.7 vs 53.6%, respectivamente). La CYS incrementó los porcentajes de ovocitos con pronúcleo, de ovocitos fertilizados y de embriones totales con respecto al control, y la adición de GSH al medio de FIV potenció el efecto de las CYS; no obstante, no hubo mejora en el porcentaje de blastocistos obtenidos. Por otro lado, Zhou *et al.* (2008) trabajaron con varias concentraciones de CYS en el medio MIV (0 a 500 mM), siendo la de 100 mM la más efectiva en la producción de blastocistos y número de células/blastocisto proveniente de ovocitos que maduraron con y sin células del cúmulo. En este sentido, De *et al.* (2011) utilizando también la concentración de CYS de 100 mM en el medio MIV de ovocitos caprinos incrementaron significativamente la tasa de clivaje, los porcentajes de embriones totales y los de blastocistos que eclosionaron a los 7, 8 y 9 días luego de la FIV.

Por otro lado, la concentración de 100 mM de CYS en el medio MIV, usada como control para evaluar la efectividad de la melatonina como antioxidante, mostró que fue tan efectiva como la melatonina, ya que la tasa de clivaje y la producción de blastocistos fue similar entre ambos grupos, y solo el número de células del trofoectodermo y de la masa celular de los blastocistos fue significativamente menor en CYS que en el grupo suplementado con melatonina (Soto-Heras *et al.*, 2018). Asimismo, según An *et al.* (2018), la adición de 100 mM de CYS al medio MIV mejoró la tasa de fertilización y duplicó el porcentaje de blastocistos comparado con la no adición de CYS al medio de maduración.

#### *b) Adición en el medio de fecundación o de cultivo in vitro*

De *et al.* (2011) encontraron que la concentración más efectiva de CYS adicionada al medio CIV obteniendo un porcentaje de clivaje no menos de nueve puntos porcentuales que en las otras concentraciones y el control ( $p < 0.05$ ), además de obtener una mayor proporción de ovocitos desarrollados hasta blastocistos luego de la FIV. En el Cuadro 4 se presentan los resultados sobre la PIVE luego de agregar 100 mM de CYS en el medio MIV y 200 mM en el CIV. No obstante, Kharche *et al.* (2016) no encontró un efecto benéfico en la tasa de clivaje ni en el desarrollo de mórulas o blastocistos al adicionar 100 mM de CYS al CIV con relación al control. De otra parte, la suplementación de 50 mM de CYS sola o combinada con IGF-1 duplicaron la proporción de blastocistos obtenidos (Goel *et al.*, 2017).

### *Efectos de la cisteamina en la producción in vitro de embriones en ovinos*

#### *a) Adición en el medio de maduración*

De Matos *et al.* (2002) probaron varias concentraciones de CYS en el medio MIV (0, 50, 100, 200 mM) de ovinos y observaron que, aunque el porcentaje de clivaje fue similar entre los grupos, la concentración de 200 mM fue más efectiva para mejorar el porcentaje de blastocistos en comparación con otras concentraciones de b-ME. Además, la concentración de GSH aumentó significativamente. Sin embargo, la maduración de ovocitos ovinos en otros medios (Fluido Oviductal Sintético, SOF y Charles Rosenkrans, CR-1) con y sin CYS no modificó la tasa de clivaje (Enginler *et al.*, 2015) ni la producción de blastocistos combinada o no con células oviductales (Enginler *et al.*, 2016).

Al evaluar el efecto del factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) y la cisteamina (CYS; 100 mM) en un medio de

Cuadro 5. Efectos de diferentes concentraciones de cisteamina (CYS) sobre la producción de glutatión (GSH), y tasa de maduración, clivaje o blastocistos en rumiantes

	Conc.	Prod. GSH	Madurac.	Clivaje	Emb.	Blast.	Fuente
Bovinos	50 µM	↑			↑		Takahashi <i>et al.</i> (1993)
	100 µM				↑		
	25 µM		→	→	→	→	De Matos <i>et al.</i> (1995)
	50 µM		→	→	→	→	
	100 µM		→	→	↑	↑	
	0.5 µM	→	→		→	→	Geshi <i>et al.</i> (1999)
	5 µM	↑	→		→	↑	
	50 µM	↑	→		→	→	
	500 µM	↑	→		→	↓	
	100 µM				→	→	Adona <i>et al.</i> (2011)
	150 µM <sup>1</sup>				→	→	Silva <i>et al.</i> (2010)
	150 µM <sup>2</sup>				→	↑	
	150 µM <sup>3</sup>				→	↑	
	50 µM				→	↑	Lojkic <i>et al.</i> (2012)
	100 µM				→	→	
200 µM				→	↓		
0.1 mM				→	→	Canel <i>et al.</i> (2018)	
0.5 mM				→	→		
1 mM				→	→		
10 mM				↓	↓		
Bubalinos	50 µM			→	↑	↑	Gasparri <i>et al.</i> (2000)
	100 µM			→	→	→	
	200 µM			→	→	→	
	50 µM			↑	↑	↑	Anand <i>et al.</i> (2008)
	100 µM			→	→	→	
	200 µM			→	→	↓	
	10 µM		↓				Ocampo y Ocampo (2015)
50 µM		→			↑		
100 µM		→			↑		
Caprinos	400 µM		↑		↑	→	Urdaneta <i>et al.</i> (2004)
	<i>MIV</i>						
	50 µM			→	→	→	De <i>et al.</i> (2011)
	100 µM			↑	→	→	
	200 µM			→	↑	↑	
	400 µM			→	→	→	
	<i>CIV</i>						
	50 µM			→	→	→	De <i>et al.</i> (2011)
	100 µM			→	→	→	
	200 µM			↑	↑	↑	
400 µM			→	→	→		
Ovino	50 µM			→		→	De Matos <i>et al.</i> (2002)
	100 µM			→		→	
	200 µM			→		↑	

↑: incrementa en relación al control; →: similar al control; ↓: similar o debajo del control.

Conc.: concentración de CYS; Emb.: embriones totales o mórulas compactas; Blast.: producción de blastocistos. <sup>1</sup> en la maduración *in vitro*; <sup>2</sup> en la fecundación *in vitro*; <sup>3</sup> en el cultivo *in vitro*. MIV: maduración *in vitro*; CIV: cultivo *in vitro*

maduración definido (medio de cultivo básico + alcohol polivinílico), semidefinido (medio de cultivo básico + albúmina sérica bovina) e indefinido (medio de cultivo básico + suero fetal bovino) sobre la tasa de clivaje y la capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos de oveja, pudo comprobarse que la adición de CYS al medio definido suplementado con EGF e IGF-I mejoró la formación de blastocistos en comparación con el medio sin CYS. Asimismo, la combinación de EGF + IGF-I + y CYS en el medio indefinido resultó en una mayor proporción de clivaje y mayor producción de mórulas y blastocistos que el medio definido + EGF + IGF-I + CYS o el medio semidefinido + EGF + IGF-I + CYS (Shabankareh y Zandi, 2010). En otro estudio, la adición de IGF-I + EGF al medio de maduración, con o sin CYS, aumentó la tasa de clivaje en comparación al control y los grupos de CYS + IGF-I, sin influenciar la tasa de blastocistos o de blastocistos que eclosionaron (Kelly *et al.*, 2008). Sin embargo, aunque la CYS no mejoró la tasa de maduración respecto al control, y fue estadísticamente inferior al grupo que maduró con EGF (Sofi *et al.*, 2011; Wani *et al.*, 2012), el porcentaje de mórulas fue similar entre ambos tratamientos y significativamente mayor que el grupo que maduró sin CYS y EGF (Wani *et al.*, 2012).

En el Cuadro 5 se presenta un resumen de las concentraciones de CYS más utilizadas y sus efectos en las tasas de maduración, clivaje, producción de embriones y de blastocistos.

## CONCLUSIONES

- Las evidencias documentadas en este trabajo demuestran que a través de distintos enfoques experimentales, la CYS tiene un potente efecto antioxidante indirecto, estimulando las síntesis de GSH por parte del ovocito. En algunos casos su presencia en el medio de maduración estimuló la tasa de maduración nuclear

y la de clivaje, pero el efecto más evidente en la mayoría de los artículos revisados fue sobre la producción total de embriones y de blastocistos, que con mucha frecuencia superó significativamente la del grupo no suplementado con CYS. En los bovinos, 100 mM en el medio de maduración parece ser una concentración efectiva, seguido de concentraciones de 5 y 50 mM.

- Concentraciones más altas (200, 500 mM) en los bovinos y bubalinos parecen tener un efecto adverso sobre la maduración ovocitaria y desarrollo embrionario.
- En pequeños rumiantes, concentraciones de 100 y 200 mM fueron efectivas para mejorar la producción de embriones comparado con el control, aunque hay estudios que no obtuvieron mejora alguna.
- Se comprobó que la CYS actúa en forma sinérgica con factores de crecimiento y que fue tan efectiva como otros antioxidantes para incrementar la producción de embriones.

## LITERATURA CITADA

1. **Adona PR, de Bem, TH, Mesquita LG, Rochetti, RC, Leal CL. 2011.** Embryonic development and gene expression in oocytes cultured *in vitro* in supplemented pre-maturation and maturation media. *Reprod Domest Anim* 46: e31-8. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.-01618.x
2. **Ahmad F, David SL. 2019.** Lysosomal oxidation of LDL alters lysosomal pH, induces senescence, and increases secretion of pro-inflammatory cytokines in human Macrophages. *J Lipid Res* 60: 98-110. doi: 101194/jlrM088245
3. **Ahmad I, Hamid T, Fatima M, Chand HS, Jain, SK, Athar M, Raisuddin S. 2000.** Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Bochum Biophys Acta* 1519: 37-48. doi: 10.1016/s0304-4165(00)00098-2



4. **Albuquerque DMN, Lopes JB, Ferraz MS, Ribeiro MN, Silva SRG, Costa EMS, Lima DCP, et al. 2017.** Vitamin E and organic selenium for broilers from 22 to 42 days old: performance and carcass traits. *An Acad Bras Cienc* 89: 1259-1268. doi: 101590/0001-37652017-20150709
5. **Al-Katanani YM, Lopes FF, Hansen, PJ. 2002.** Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J Dairy Sci* 85: 390-396. doi: 103168/jdss0022-0302(02)-74086-1
6. **Alvares P, De Dio F, Zamparone L, Rafagnin L, Marcondes M. 2006.** *In vitro* production of bovine embryos. In: Seneda MM, Silva Santos KC, Rafagnin LS (eds). *Biotechnology of animal reproduction*. New York, USA: Nova Science Publishers, p 171-191.
7. **Amin A, Gad A, Salilew-Wondim D, Prastowo S, Held E, Hoelker M, Rings F, et al. 2014.** Bovine embryo survival under oxidative-stress conditions is associated with activity of the NRF2-mediated oxidative-stress-response pathway. *Mol Reprod Dev* 81: 497-513. doi: 101002/mrd22316
8. **An L, Liu J, Du Y, Liu Z, Zhang F, Liu Y, Zhu X, Ling P, et al. 2018.** Synergistic effect of cysteamine, leukemia inhibitory factor, and Y27632 on goat oocyte maturation and embryo development *in vitro*. *Theriogenology* 108: 6-62. doi: 101016/jtheriogenology-201711028
9. **An Q, Peng W, Cheng Y, L, Z, Zhou C, Zhang Y, Su JJ. 2019.** Melatonin supplementation during *in vitro* maturation of oocyte enhances subsequent development of bovine cloned embryos. *J Cell Physiol* 234: 17370-17381. doi: 10.1002/jcp.28357
10. **Anand T, Kumar D, Chauhan MS, Manik RS, Palta P. 2008.** Cysteamine supplementation of *in vitro* maturation medium, *in vitro* culture medium or both media promotes *in vitro* development of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Reprod Fert Develop* 20: 253-257. doi: 101071/rd07167
11. **Anchordoquy JM, Anchordoquy JP, Testa JA, Sirini MÁ, Furnus CC. 2015.** Influence of vascular endothelial growth factor and cysteamine on *in vitro* bovine oocyte maturation and subsequent embryo development. *Cell Biol Int* 39: 1090-1098. doi: 101002/cbin10481
12. **Anchordoquy JP, Lizarraga RM, Anchordoquy JM, Nikoloff N, Rosa DE, Fabra MC, Peral-García, P, Furnus CC. 2019.** Effect of cysteine, glutamate and glycine supplementation to *in vitro* fertilization medium during bovine early embryo development. *Reprod Biol* 19: 349-355. doi: 101016/jreplibio201910002
13. **Argudo DE, Tenemaza MA, Merchán SL, Balvoa JA, Méndez MS, Soria ME, Galarza LR, et al. 2020.** Intraovarian influence of bovine corpus luteum on oocyte morphometry and developmental competence, embryo production and cryotolerance. *Theriogenology* 155: 232-239 doi: 101016/jtheriogenology
14. **Ariceta G, Camacho JA, Fernández-Obispo M, Fernández-Polo A, Gamez J, García-Villoria J, Lara Monteczuma E, et al. 2015.** Cystinosis in adult and adolescent patients: recommendations for the comprehensive care of cystinosis. *Nefrologia* 35: 304-321. doi: 101016/jnefro201506010
15. **Babior BM. 1997.** Superoxide: a two-edged sword. *Braz J Med Biol Res* 30: 141-155. doi: 101590/s0100-879x1997-00200001
16. **Bainy ACD. 1996.** Oxidative stress as biomarker of polluted aquatic sites. In: Val AL, Almeida-Val VMF, Randall DJ (eds). *Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon*. Manaus, Brazil: INPA. p 101-110.
17. **Balasubramanian S, Rho GJ. 2007.** Effect of cysteamine supplementation of *in vitro* matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of

- embryos. *Anim Reprod Sci* 98: 282-292. doi: 101016/janireprosci200603011
18. **Barreiros ALBS, David JM, David JP. 2006.** Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova* 29: 113-123.
  19. **Barros FDA, Adona PR, Guemra S, Damião BCM. 2019.** Oxidative homeostasis in oocyte competence for *in vitro* embryo development. *Anim Sci J* 90: 1343-1349. doi: 101111/asj13256
  20. **Biller-Takahashi JD, Takahashi LS, Mingatto FE, Urbinati EC. 2015.** The immune system is limited by oxidative stress: dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Fish Shellfish Immun* 47: 360-367. doi: 101016/j.fsi201509022
  21. **Biller-Takahashi JD, Takahashi LS, Saita MV, Gimbo RY, Urbinati EC. 2013.** Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Braz J Biol* 73: 425-429. doi: 101590/S1519-69842013000200026
  22. **Biller-Takahashi JD, Takahashi LS. 2018.** Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. *Anais Acad Bras Cie* 90: 3403-3414. doi: 10.1590/0001-3765201820170730
  23. **Bols P, Van Soom A, Ysebaert M, Vandenheede J, de Kruif A. 1996.** Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology* 45: 1001-1014. doi: 10.1016/0093-691x(96)-00028-3
  24. **Brand M. 2010.** The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* 45: 466-472. doi: 101016/j.exger201001003
  25. **Brigelius-Flohe, R, Maiorino, M. 2013.** Glutathione peroxidases. *Bochum Biophys Acta* 1830: 3289-3303. doi: 101016/j.bbagen201211020
  26. **Buettner GR. 1993.** The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, -tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 300: 535-543. doi: 101006/abbi19931074
  27. **Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. 2010.** Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminary in Fetal Neonatal Medicine* 15: 186-190. doi: 101016/j.siny201004003
  28. **Burke KE, Wei H. 2009.** Synergistic damage by UVA radiation and pollutants. *Toxicol Ind Health* 25: 219-224. doi: 101177/0748233709106067
  29. **Camargo LSA, Viana JHM, Sá WF, Ferreira AM, Ramos AA, Filho VRV. 2006.** Factors influencing *in vitro* embryo production. *Anim Reprod* 3: 19-28.
  30. **Canel NG, Suvá M, Bevacqua RJ, Arias ME, Felmer R, Salamone DF. 2018.** Improved embryo development using high cysteamine concentration during MIV and sperm co-culture with COCs previous to ICSI in bovine. *Theriogenology* 117: 26-33. doi: 101016/j.theriogenology201805017
  31. **Canel NG, Suvá M, Bevacqua RJ, Salamone DF. 2015.** Improvement of intracytoplasmic sperm injection embryo development in bovine using high cysteamine concentration during *in vitro* maturation and sperm co-culture with cumulus oocyte complexes. *Reprod Fert Develop* 28: 239-240. doi: 101071/RDv28n2Ab217
  32. **Cathcart MK. 2004.** Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/ macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscl Throm Vas* 24: 23-28 doi: 101161/01ATV00000977694730612
  33. **Cavallini D, Scandurra R Demarc C. 1963.** The enzymatic oxidation of cysteamine to hypotaurine in the presence of sulfide. *J Biol Chem* 238: 2999-3005.

34. **Chien LC, Yeh CY, Huang SH, Shieh MJ, Han BC. 2003.** Pharmacokinetic model of daily selenium intake from contaminated seafood in Taiwan. *Sci Total Environ* 311: 57-64. doi: 101016/S0048-9697(03)00134-7
35. **Chowdhury MMR, Park J, Afrin F, Ko YG, Kim CL, Lee SS, Kim SW. 2020.** Transcriptome profiling of *in vitro*-matured oocytes from a Korean native cow (Hanwoo) after cysteamine supplementation. *Anim Biotechnol* 3: 1-12. doi: 101080/1049539820191706545
36. **Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BM, Saul RL, Mccord JM, Harman D. 1987.** Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 107: 526-545. doi: 107326/0003-4819-107-4-526
37. **Curnow EC, Ryan JP, Saunders D M, Hayes ES. 2010.** Oocyte glutathione and fertilization outcome of *Macaca nemestrina* and *Macaca fascicularis* in *in vivo*- and *in vitro*-matured oocytes *Reprod Fert Develop* 22: 1032-1040. doi: 101071/RD09308
38. **Dale DC, Boxer L, Liles WC. 2008.** The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112: 935-945. doi: 101182/blood-2007-12-077917
39. **Damiani P, Fissore RA, Cibelli JB, Long CR, Balise JJ, Robl JM, DUBY RT. 1996.** Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Mol Reprod Dev* 4: 521-534.
40. **De AK, Malakar D, Akshey YS, Jena MK, Garg S, Dutta R, Sahu S. 2011.** *In vitro* development of goat (*Capra hircus*) embryos following cysteamine supplementation of the *in vitro* maturation and *in vitro* culture media. *Small Ruminant Res* 96: 185-190. doi: 10.1016/j.smallrumres.2011.01.001
41. **de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG, Matkovic M. 1996.** Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev* 45: 451-457. doi: 101002/(SICI)1098-2795-(199612)45:4<451:AID-MRD7>30CO;2-Q
42. **de Matos DG, Furnus CC. 2000.** The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cysteine. *Theriogenology* 53: 761-771. doi: 101016/S0093-691X(99)00278-2 PMID: 10735042
43. **de Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini SR, Thompson JG. 2002.** Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* 57: 1443-1451. doi: 101016/s0093-691x(02)-00643-x
44. **de Matos DG, Herrera C, Cortvrindt R, Smitz J, Van Soom A, Nogueira D, Pasqualini RS. 2002.** Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo production. *Mol Reprod Dev* 62: 203-209. doi: 101002/mrd10087
45. **de Matos, DG, Furnus, CC, Moses, DF, Baldassarre, H. 1995.** Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 42: 432-436. doi: 101002/mrd1080420409
46. **Denicol AC, Lopes GJr, Mendoncam LG, Rivera FA, Guagninim F, Perez RV, Lima JR, et al. 2012.** Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 95: 1794-1806. doi: 10.3168/jds.2011-4650
47. **Diaz S. 2017.** Efecto del tiempo de maduración *in vitro* de los ovocitos bovinos sobre el porcentaje de blastocistos obtenidos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 23 p.

48. **Dong M, Liang Y, Ramalingam R, Tang, SW, Shen W, Ye R, Gopalakrishnan S, et al. 2017.** Proteomic characterization of the interactions between fish serum proteins and waterborne bacteria reveals the suppression of antioxidative defense as a serum-mediated antimicrobial mechanism. *Fish Shellfish Immun* 62: 96-106. doi: 101016/j.fsi.201701013
49. **Doyotte A, Cossu C, Jacquin MC, Babut M, Vasseur P. 1997.** Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers or experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat Toxicol* 39: 93-110. doi: 10.1016/S0166-445X(97)-00024-6
50. **El Shima IN, Mahmoud K, El Raheem G, Abuel Roos M, Ahmen Y. 2017.** Effect of using ascorbic acid and cysteamine supplementation on *in vitro* development of buffalo embryos. *Asian Pac J Reprod* 62: 85-88. doi: 10.12980/apjr.6.20170207
51. **El Sokary MMM, El Raey M, Mahmoud KGhM, El Roos MEA, Sosa GMS. 2017.** Effect of melatonin and/or cysteamine on development and vitrification of buffalo embryos. *Asian Pac J Reprod* 64: 176-180. doi: 10.12980/apjr.6.20170406
52. **Elamaran G, Singh KP, Singh MK, Singla SK, Chauhan MS, Manik RS, Palta P. 2012.** Oxygen concentration and cysteamine supplementation during *in vitro* production of buffalo *Bubalus bubalis* embryos affect mRNA expression of BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BAX and BID. *Reprod Domest Anim* 476: 1027-1036. doi: 101111/j.1439-0531.2012.02009x
53. **Elmonem M, Veys KR, Soliman NA, Van Dyck M, Van Den Heuvel LP, Levtchenko E. 2016.** Cystinosis: a review. *Orphanet J Rare Dis* 11: 47. doi: 101186/s13023-016-0426-y
54. **Emmet RE. 1958.** Organic chemistry of bivalent sulfur. New York: Chemical Publishing Company. p 398-399.
55. **Enginler S, Ozdas Ö, Sandal A, Aric R, Erturk E, Baran, A Toydemir, et al. 2016.** The effect of cysteamine and oviductal cells in different culture media on the development of sheep embryos. *Kafkas Univ Vet Fak* 22: 139-145. doi: 10.9775/kvfd.2015.14115
56. **Enginler S, Ozdas OB, Sandal AI, Gündüz MC, Baran A, Toydemir AI, Tek C, et al. 2015.** Effects of cysteamine on sheep embryo cleavage rates. *J Fac Vet Med Istanbul Univ* 41: 37-42.
57. **Fair T, Hyttel P, Greve T. 1995.** Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 424: 437-442. doi: 101002/mrd1080420410
58. **Farin PW, Crosier AE, Farin CE. 2001.** Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* 551: 151-170. doi: 101016/S0093-691X0000452-0
59. **Ferré LB, Kjelland ME, Strobech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ. 2020.** Review: recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal* 145: 991-1004. doi: 101017/S1751731119002775
60. **Ferreira ALA, Matsubara LS. 1997.** Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estress oxidativo. *Rev Assoc Med Bras* 43: 61-68. doi: 101590/s0104-42301997000-100014
61. **Finkel T. 2011.** Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 194: 7-15. doi: 101083/jcb201102095
62. **Folk JE. 1980.** Transglutaminases. *Ann Rev Biochem Allied Res* 49: 517-531. doi: 101146/annurevbi49070180002505
63. **Franco R, Martínez-Pinilla E. 2017.** Chemical rules on the assessment of antioxidant potential in food and food } 71.

- Geshi M, Youngs CR, Nagai T. 1999.** Addition of cysteamine to a serum-free maturation medium enhances *in vitro* development of MIV-FIV bovine oocytes. *J Mamm Ova Res* 16: 135-145.
72. **Goel P, Goel AK, Bhatia AK, Kharche SD 2017.** Influence of exogenous supplementation of IGF-I, Cysteamine and their combination on *in vitro* caprine blastocyst development. *Indian J Anim Sci* 872: 171-174
73. **Gordon I. 2003.** *In vitro* fertilization. In: Laboratory production of cattle embryos Gordon I (ed). UK: CABI Publishing. p 176-219.
74. **Gottardi FP, Barretto LSS, Gonçalves FS. 2012.** Effects of cumulus cells and cysteamine during bovine oocyte *in vitro* maturation on meiosis progression and acquisition of developmental competence. *Arq Bras Med Vet Zoo* 642: 245-252.
75. **Guo L, Tang B, Ma X, Gao F, Zhang JB, Li ZY. 2009.** Effects of 17- $\alpha$  estradiol and cysteamine on *in vitro* maturation of beef cattle oocytes. *Reprod Fert Develop* 221: 326-326. doi: 101071/RDv22n1Ab339
76. **Halliwell B. 2009.** The wanderings of a free radical Free Radical. *Biol Med* 46: 531-542. doi: 101016/jfreeradbiomed-200811008
77. **Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Arouma OI. 1995.** The characterization of antioxidants *Food Chem Toxicol* 33: 601-612. doi: 101016/0278-69159500024-v
78. **Halliwell B, Gutteridge M. 1999.** Free radicals in biology and medicine. 3<sup>rd</sup> ed. Nueva York, USA: Oxford University Press. 936 p.
79. **Halliwell B. 2000.** The antioxidant paradox. *Lancet* 355: 1179-1187. doi: 101016/S0140-67360002075-4
80. **Hamanaka RB, Chandel NS. 2010.** Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trend Biochem Sci* 35: 505-513. doi: 101016/jtibs201004002
81. **Hamilton GA, Buckthal DJ, Mortensen RM, Zerby KW. 1979.** Reactions of cysteamine and other amine metabolites with glyoxylate and oxygen catalyzed by mammalian D-amino acid oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 6: 762625-762629. doi: 101073/pnas7662625
82. **Handrow RR, Lenz RW, Ax, RL. 1982.** Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Co* 1074: 1326-1332.
83. **Hansen PJ. 2020.** Prospects for gene introgression or gene editing as a strategy for reduction of the impact of heat stress on production and reproduction in cattle. *Theriogenology* 154: 190-202. doi: 101016/jtheriogenology202005010
84. **Hernández H. 2001.** Fertilización *in vitro*. En: González-Stagnaro C (ed). Reproducción bovina. Maracaibo, Venezuela: Fundación Girarz. p 411-426.
85. **Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, 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: 683-700. doi: 101016/S0093-691X9900162-4
86. **Hsu PC, Guo YL. 2002.** Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology* 180: 33-44. doi: 101016/s0300-483x0200380-3
87. **Husain SR, Cillard J, Cillard P. 1987.** Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 26: 2489-2497.
88. **Hyttel P, Fair, T, Callesen, H, Greve, T. 1997.** Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 471:23-32. doi: 101016/S0093-691X9600336-6
89. **[IETS] International Embryo Technology Society. 2019.** Embryo Technology Newsletter 364:46. [Internet]. Available in: [https://www.wiet-sorg/pdf/Newsletter/Dec19\\_IETS\\_Newsletterpdf](https://www.wiet-sorg/pdf/Newsletter/Dec19_IETS_Newsletterpdf)

90. **Jeitner TM, Pinto JT, Cooper AJL. 2018.** Cystamine and cysteamine as inhibitors of transglutaminase activity *in vivo*. *Bioscience Rep* 38: BSR20180691. doi: 101042/BSR20180691
91. **Jézégou A, Llinare E, Anne C, Kieffer-Jaquinod S, O'Regan S, Aupetit J, Chabli A, et al. 2012.** Heptahelical protein PQLC2 is a lysosomal cationic amino acid exporter underlying the action of Cysteamine in cystinosis therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E3434-44. doi: 101073/pnas1211198109
92. **Karadjole M, Betz I, Samardžija M, Macesic N, Matkovic M, Makek Z, Karadjole T, et al. 2010.** The developmental competence of bovine immature oocytes and quality of embryos derived from slaughterhouse ovaries or live donors by ovum pick up. *Vet Arhiv* 80: 445-454.
93. **Karadjole M, Getz I, Samardžija M, Matkovic M. 2006.** Influence of cysteamine supplementation during *in vitro* maturation of bovine oocytes on developmental rate and embryo quality. *Slov Vet Zb* 43: 48-51.
94. **Kasinathan P, Wei H, Xiang T, Molina JA, Metzger J, Broek D, Kasinathan S, et al. 2015.** Acceleration of genetic gain in cattle by reduction of generation interval. *Sci Rep* 5: 8674. doi: 10.1038/srep08674
95. **Kelly J, Kleemann D, Kuwayama M, Walker S. 2005.** Effect of cysteamine on survival of bovine and ovine oocytes vitrified using the minimum volume cooling MVC cryotop method. *Reprod Fert Develop* 182: 158-158. doi: 101071/RDv18n2Ab99
96. **Kelly JM, Kleemann DO, Maxwell WM, Walker SK. 2008.** Effects of insulin-like growth factor-I, epidermal growth factor and cysteamine on the *in vitro* maturation and development of oocytes collected from 6- to 8-week-old Merino lambs. *Reprod Fert Develop* 205: 570-578. doi: 101071/rd07220
97. **Kharche SD, Agarwal S, Sharma J, Pathak J, Silkawar AKS, Gangawar C, Ranjan R, et al. 2016.** Influence of cysteamine supplementation during *in vitro* culture of early-stage caprine embryos on blastocyst production. *Indian J Anim Sci* 86: 304-306.
98. **Khazaei M, Aghaz F. 2017.** Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during *in vitro* maturation of oocytes. *Int J Fertil Steril* 1122: 63-70. doi: 1022074/ijfs20174995
99. **Kieliszek M, Blazejak S. 2013.** Selenium: significance, and outlook for supplementation. *Nutrition* 29: 713-718. doi: 101016/jnut201211012
100. **Kiley PJ, Storz G. 2004.** Exploiting thiol modifications. *Plos Biol* 2: 391-400. doi: 101371/journalpbi0020400
101. **Klebanoff SJ. 2005.** Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukocyte Biol* 77: 598-625. doi: 101189/jlb1204697
102. **Krisher RL. 2004.** The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* 82: E14-E23. doi: 102527/2004-8213\_supplE14x
103. **Kruip TAM, Boni R, Wurth YA, Roelofsen M, Pieterse MC. 1994.** Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 42: 675-683. doi: 101016/0093-691x9490384-u
104. **Kubota C, Yang X. 1998.** Cytoplasmic incompetence results in poor development of bovine oocytes derived from small follicles. *Theriogenology* 49: 183. doi: 10.1016/S0093-691X(98)90536-2
105. **Lambeth JD. 2004.** NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4: 181-189. doi: 101038/nri1312
106. **Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruip T, Niemann H, Galli C. 2002.** Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol Reprod* 67: 767-775. doi: 101095/biolreprod102004481

107. **Leivas F. 2002.** Transport of bovine oocytes in TCM-HEPES maturation medium without controlled atmosphere. *Theriogenology* 57: 726.
108. **Leivas FG, Brum DS, Fialho SS, Saliba WP, Alvim MTT, Bernardi ML, Rubin MIB, Silva CAM. 2011.** Fetal calf serum enhances *in vitro* production of *Bos taurus indicus* embryos. *Theriogenology* 75: 429-433. doi: 101016/jtheriogenology201008017
109. **Levtchenko E, de Graaf-Hess A, Wilmer M, Van Den Heuvel L, Monnens L, Blom H. 2005.** Altered status of glutathione and its metabolites in cystinotic cells. *Nephrol Dial Transpl* 20: 1828-1832. doi: 101093/ndt/gfh932
110. **Li H, Jiang W, Liu Y, Jiang J, Zhang Y, Wu P, Zhao J, et al. 2016.** The metabolites of glutamine prevent hydroxyl radical-induced apoptosis through inhibiting mitochondria and calcium ion involved pathways in fish erythrocytes. *Free Radic Biol Med* 126-140. doi: 101016/j.freeradbiomed-201601007
111. **Lojkic M, Getz I, Samardžija M, Matkovic M, Baèiæ G, Karadjole T, Maæešia N, et al. 2012.** Effect of cysteamine supplementation during *in vitro* culture of early stage bovine embryos on blastocyst rate and quality. *Acta Vet Brno* 81: 229-234. doi: 102754/avb201281030229
112. **Lonergan P, Fair T, Forde N, Rizos D. 2016.** Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology* 861: 270-277. doi: 101016/jtheriogenology201604040
113. **Lonergan P, Fair T. 2008.** *In vitro*-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology* 691: 17-22. doi: 101016/jtheriogenology200709007
114. **Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. 1994.** Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 371: 48-53. doi: 101002/mrd1080370107
115. **Lorand L, Conrad SM. 1984.** Transglutaminases. *Mol Cell Biochem* 58: 29-35.
116. **Machatková M, Jokesová E, Petelíková J, Dvorácek V. 1995.** Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 45: 801-810. doi: 10.1016/0093-691x(96)00009-x
117. **Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M. 2004.** Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. *Theriogenology* 61: 329-235. doi: 101016/s0093-691x(03)-00216-4
118. **Mahmoud KGM, El-Sokary MMM, Kandiel MMM, Abou El-Roos MEA, Sosa GMS. 2016.** Effects of cysteamine during *in vitro* maturation on viability and meiotic competence of vitrified buffalo oocytes. *Iran J Vet Res Summer* 17: 165-170.
119. **Malhotra JD, Kaufman RJ. 2007.** Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal* 9: 2277-2293. doi: 101089/ars20071782
120. **Manjunatha BM, Gupta PS, Ravindra JP, Devaraj M, Nandi S. 2008.** *In vitro* embryo development and blastocyst hatching rates following vitrification of river buffalo embryos produced from oocytes recovered from slaughterhouse ovaries or live animals by ovum pick-up. *Anim Reprod Sci* 4: 419-426. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.-06.030
121. **Merton JS, Knijn HM, Flapper H, Dotinga F, Roelen BA, Vos PL, Mullaart E. 2013.** Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. *Theriogenology* 80: 365-371. doi: 101016/jtheriogenology2013-04025

122. **Monteiro DA, Almeida JA, Rantin FT, Kalinin AL. 2006.** Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp Biochem Phys C* 143: 141-149. doi: 101016/jcbpc200601004
123. **Morakinyo MK, Chipinda I, Hettick J, Siegel PD, Abramson J, Strongin R, Martincigh BS, Simoyi RH. 2012.** Detailed mechanistic investigation into the S-nitrosation of cysteamine. *Can J Chem* 9: 724-738. doi: 101139/v2012-051
124. **Moreno JF, Flores-Foxworth G, Westhusin M, Kraemer DC. 1993.** Influence of pregnancy and presence of a CL on quantity and quality of bovine oocytes obtained from ovarian follicles aspirated *post-mortem*. *Theriogenology* 39: 271.
125. **Morotti F, Sanches BV, Pontes JH, Basso AC, Siqueira ER, Lisboa LA, Seneda MM. 2014.** Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale FIV program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology* 81: 696-701. doi: 101016/jtheriogenology201312002
126. **Mukherjee A, Kumar D, Singh KP, Chauhan MS, Singla SK, Paltam P, Manik RS. 2010.** Assessment of DNA damage during in vitro development of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos: effect of cysteamine. *Reprod Domest Anim* 45: 1118-1121. doi: 101111/j1439-0531200901484x
127. **Mukherjee A, Malik H, Saha AP, Dubey A, Singhal DK, Boateng S, Saugandhika S, et al. 2014.** Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. *J Assist Reprod Gen* 31: 229-239. doi: 101007/s10815-013-0116-9
128. **Mullaart E, Dotinga F, Ponsart C, Knijn H, Schouten J. 2015.** Addition of very low amounts of serum (estrus cow serum) improves *in vitro* embryo production in dairy cattle. *Reprod Fert Develop* 27: 205. doi: 101071/rdv27n1ab232
129. **Murillo A, Muñoz M, Martín-González D, Carrocera S, Martínez-Nistal A, Gómez E. 2017.** Low serum concentration in bovine embryo culture enhances early blastocyst rates on day-6 with quality traits in the expanded blastocyst stage similar to BSA-cultured embryos. *Reprod Biol* 17: 162-171. doi: 101016/jrepbio201704002
130. **National Center for Biotechnology Information. 2020.** PubChem Compound Summary for CID 6058, Cysteamine. [Internet]. Available in: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6058>
131. **Ng KYB, Mingels R, Morgan H, Macklon N, Cheong Y. 2018.** *In vivo* oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: a systematic review. *Hum Reprod Update* 24: 15-34. doi: 101093/humupd/dmx028
132. **Nikoloff N, Campagna A, Luchetti C, Carranza-Martín AC, Pascua AM, Anchordoquy JM, Anchordoquy JP, et al. 2020.** Effects of EPA on bovine oocytes matured *in vitro* with antioxidants: impact on the lipid content of oocytes and early embryo development. *Theriogenology* 146: 152-161. doi: 101016/jtheriogenology201911028
133. **Ocampo LC, Ocampo MB. 2015.** Improved developmental competence of swamp buffalo oocytes matured in the presence of cysteamine. *J Agric Technol* 11: 31-40.
134. **Okamura DM, Bahrami NM, Ren S, Pasichnyk K, Williams JM, Gangoiti JA, Lopez-Guisa JM, et al. 2014.** Cysteamine modulates oxidative stress and blocks myofibroblast activity in



- CKD. *J Am Soc Nephrol* 25: 43-54. doi: 101681/ASN2012090962
135. **Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Phar* 13: 137-149. doi: 101016/s1382-6689(02)00126-6
136. **Oruc EO, Sevgiler Y, Uner N. 2004.** Tissue specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4- D and azinphosmethyl. *Comp Biochem Phys C* 137: 43-51. doi: 101016/j.ccca200311006
137. **Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T. 1997.** Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenolog* 48: 769-774.
138. **Oyamada T, Fukui Y. 2004.** Oxygen tension and medium supplements for *in vitro* maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J Reprod Develop* 50: 107-117. doi: 101262/jrd50107
139. **Palma G. 2001.** Producción *in vitro* de embriones. En: Palma G (ed). *Biocología de la reproducción*. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. p 225-294.
140. **Park JB. 2003.** Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophages. *Exp Mol Med* 35: 325-335. doi: 101038/emm200344
141. **Parrish JJ, Foote RH. 1987.** Quantification of bovine sperm separation by a swim-up method Relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. *J Androl* 8: 259-266. doi: 101002/j1939-46401987tb03319x
142. **Penitente-Filho JM, Jiménez CR, Zolini AM, Carrascal E, Azevedo JL, Silveira CO, Oliveira FA, et al. 2015.** Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes. *Anim Sci J* 86: 148-152.
143. **Perea G, Quezada C, Mocha Z, Argudo G, Ayala G, Méndez SM, Soria ME, et al. 2017.** Effect of aspiration vacuum on functional characteristics of bovine oocytes recovered from slaughterhouse ovaries. *Reprod Biomed Online* 14: 444-449. doi: 10.1016/s1472-6483(10)-60891-7
144. **Pietta P. 2000.** Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63: 1035-1042. doi: 101021/np9904509
145. **Quintanilla L, Huanca W, Córdova A, Ampuero A, Benavides L. 2015.** Effect of supplementation of maturation medium with cysteamine and two culture media (KSOMaa and SOF) on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Rev Inv Vet Perú* 26: 462-468. doi: 1015381/rivepv26i311178
146. **Quispe C, Ancco GE, Solano AJ, Unchupaico PI, Mellisho SE. 2018.** Capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos de bovino recuperados vía ultrasonografía y de ovarios de matedero. *Rev Inv Vet Perú* 29: 1114-1121. doi: 10.15381/rivep.v29i4.14418
147. **Ranjbar A, Eslampour MA, Moghadam, MF. 2019.** Effect of cysteamine and 13-cis-retinoic acid on bovine *in vitro* embryo production. *Kafkas Univ Vet Fak* 25: 231-237. doi: 109775/kvfd201820778
148. **Rauber LP, Alves DF, Pinto MGL, Hilgert TF, Brum DS, Bernardi ML, Silva CAM, Rubin MIB. 2002.** Embryo development of bovine oocytes held in bovine follicular fluid from different size follicles. In: XVIII Meeting European Embryo Transfer Association. Rolduc, The Netherlands.
149. **Rivera FA, Mendonça LG, Lopes G Jr, Santos JE, Perez RV, Amstalden M, Correa-Calderón A, et al. 2011.** Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. *Reproduction* 141: 333-342. doi: 101530/REP-10-0375
150. **Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo S, de la Fuente J, Boland MP, Lonergan P. 2003.** Bovine

- embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and mes-senger RNA expression. *Biol Reprod* 68: 236-243. doi: 101095/biolreprod-102007799
151. **Rizos D, Ward F, Boland MP, Loneragan P. 2001.** Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology* 56: 1-16. doi: 101016/S0093-691X(01)00538-6
152. **Rocha-Frigoni NAS, Leão BCS, Dall'Acqua PC, Mingoti GZ. 2016.** Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured *in vitro* with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development. *Theriogenology* 86: 1897-1905. doi: 101016/jtheriogenology201606009
153. **Ruiz S, Astiz S. 2010.** Producción *in vitro* de embriones (PIV) en biotecnología de la reproducción bovina. *Bol ANEMBE* 88: 25-32.
154. **Sá NAR, Vieira LA, Ferreira ACA, Cadenas J, Bruno JB, Maside C, Sousa FGC, et al. 2019.** Anethole supplementation during oocyte maturation improves *in vitro* production of bovine embryos. *Reprod Sci* 27: 1602-1608. doi: 10.1007/s43032-020-00190-x
155. **Sales JN, Iguma LT, Batista RI, Quintão CC, Gama MA, Freitas C, Pereira MM, et al. 2015.** Effects of a high-energy diet on oocyte quality and *in vitro* embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *J Dairy Sci* 98: 3086-3099. doi: 103168/jds2014-8858
156. **Sánchez BV, Zangirolamo AF, Seneda MM. 2019.** Intensive use of FIV in large-scale dairy programs. *Anim Reprod* 16: 394-401. doi: 1021451/1984-3143-AR2019-0058
157. **Sandal AI. 2018.** In vitro maturation of bovine oocytes: beneficial effects of cysteamine. *J Dairy Vet Anim Res* 7: 64-65. doi: 1015406/jdvar20180700191
158. **Santos JE, Cerri RL, Sartori R. 2008.** Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology* 69: 88-97. doi: 101016/jtheriogenology200709010
159. **Santos MVO, Nascimento LE, Praxedes ÉA, Borges AA, Silva AR, Bertini LM, Pereira AF. 2019.** *Syzygium aromaticum* essential oil supplementation during *in vitro* bovine oocyte maturation improves parthenogenetic embryonic development. *Therio-genology* 128: 74-80. doi: 101016/jtheriogenology201901031
160. **Scandalios JG. 2005.** Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38: 995-1014. doi: 101590/s0100-879x2005000700003
161. **Schieber M, Chandel NS. 2014.** ROS function in redox signaling and review oxidative stress. *Curr Biol* 24: 453-462. doi: 101016/jcub201403034
162. **Shabankareh HK, Zandi M. 2010.** Developmental potential of sheep oocytes cultured in different maturation media: effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and cysteamine. *Fertil Steril* 94: 335-340. doi: 101016/jfertnstert200901160
163. **Sies H. 1986.** Biochemistry of oxidative stress *Angewandte Chemie* 25: 1058-1071. doi: 10.1002/anie.198610581
164. **Silva CF, Sartorelli ES, Castilho AC, Satrapa RA, Puelker RZ, Razza EM, Ticianelli JS, et al. 2013.** Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced *in vitro*. *Theriogenology* 79: 351-357. doi: 101016/jtheriogenology201210003

165. **Silva DS, Pereira LP, Navarro RB, Rosa DC, Pessoa GA, Silva CAM, Rubin MIB. 2010.** *In vitro* production of *Bos taurus* indicus embryos with cysteamine. Anim Reprod 7: 29-34.
166. **Singhal S, Prasad S, Singh B, Prasad JK, Gupta HP. 2009.** Effect of including growth factors and antioxidants in maturation medium used for *in vitro* culture of buffalo oocytes recovered *in vivo*. Anim Reprod Sci 113: 44-50. doi: 101016/janireprosci-20080-5078
167. **Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006.** Contribution of the oocyte to embryo quality Theriogenology 65: 126-136. doi: 101016/jtheriogeno-logy200509020
168. **Sofi KA, Khan MZ, Islam R, Lone FA. 2011.** Effect of cysteamine and epidermal growth factor supplementation on the *in vitro* maturation rate of ovine oocytes. Small Ruminant Res 96: 191-194.
169. **Sorg O. 2004.** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? C R Biol 327: 649-662. doi: 101016/jervj200405007
170. **Soto-Heras S, Paramio MT. 2020.** Impact of oxidative stress on oocyte competence for *in vitro* embryo production programs. Res Vet Sci 132: 342-350. doi: 101016/jrvsc202007013
171. **Soto-Heras S, Roura M, Catalá MG, Menéndez-Blanco I, Izquierdo D, Fouladi-Nashta AA, Paramio MT. 2018.** Beneficial effects of melatonin on *in vitro* embryo production from juvenile goat oocytes. Reprod Fert Develop 30: 253-261. doi: 101071/RD17170
172. **Sovernigo TC, Adona PR, Monzani PS, Guemra S, Barros FDA, Lopes FG, Leal CLV. 2017.** Effects of supplementation of medium with different antioxidants during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. Reprod Domest Anim 52: 561-569. doi: 101111/rda12946
173. **Storey KB. 1996.** Oxidative stress: animal adaptations in nature. Braz J Med Biol Res 29: 1715-1733.
174. **Swami DS, Kumar P, Malik RK, Saini M, Kumar D, Jan MH. 2017.** Cysteamine supplementation revealed detrimental effect on cryosurvival of buffalo sperm based on computer-assisted semen analysis and oxidative parameters. Anim Reprod Sci 177: 56-64. doi: 101016/janireprosci201612006
175. **Szondy Z, Korponay-Szabó I, Király R, Sarang Z, Gregory J Tsay GJ. 2017.** Transglutaminase 2 in human diseases. Biomedicine (Taipei) 7: 15. doi: 101051/bmdcn/2017070315
176. **Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N, Okano A. 1993.** Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. Biol Reprod 49: 228-232. doi: 101095/biolreprod492228
177. **Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA. 1972.** Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. J Reprod Fertil 30: 493-497.
178. **Thananurak P, Chuaychu-Noo N, Thélie A, Phasuk Y, Vongpralub T, Blesbois E. 2020.** Different concentrations of cysteamine, ergothioneine, and serine modulate quality and fertilizing ability of cryopreserved chicken sperm. Poultry Sci 99: 1185-1198. doi: 101016/jpsj201910040
179. **Theriault A, Chao J-T, Wang Q, Gapor A, Adeli K. 1999.** Tocotrienol: a review of its therapeutic potential. Clini Biochem 32: 309-319. doi: 101016/s0009-9120(99)00027-2
180. **Tsantarliotou MP, Sapanidou VG. 2018.** The importance of antioxidants in sperm quality and *in vitro* embryo production. J Vet Androl 3: 1-12.
181. **Ulrich K, Jakob U. 2019.** The role of thiols in antioxidant systems. Free Radic Biol Med 140: 14-27. doi: 101016/jfreeradbiomed201905035

182. **Underhill DM, Ozinsky A. 2002.** Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 20: 825-852. doi: 10.1146/annurevimmunol-20103-001114744
183. **Urdaneta A, Jiménez AR, Paramio MT, Izquierdo D. 2004.** Cysteamine, glutathione and ionomycin treatments improve *in vitro* fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote* 12: 277-248. doi: 10.1017/s096719940300-2168
184. **Veal EA, Day AM, Morgan BA. 2007.** Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* 26: 1-14. doi: 10.1016/j.molcel.200703016
185. **Viana JHM, Figueiredo ACS, Goncalves RLR, Siquira LGB. 2018.** A historical perspective of embryo-related technologies in South America. *Anim Reprod* 15(Suppl 1): 963-970. doi: 10.21451/1984-3143-AR2018-0016
186. **Vogt W. 1995.** Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med* 18: 93-101. doi: 10.1016/0891-5849(94)00158-g
187. **Wang C, Yue X, Lu X, Liu B. 2013.** The role of catalase in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix* C. *Fish Shellfish Immun* 34: 91-99. doi: 10.1016/j.fsi.201210013
188. **Wani AR, Khan MZ, Sofi KA, Lone FA, Malik AA, Bhat FA. 2012.** Effect of cysteamine and epidermal growth factor (EGF) supplementation in maturation medium on *in vitro* maturation, fertilization and culturing of embryos in sheep. *Small Ruminant Res* 106: 160-164. doi: 10.1016/j.smallrumres.2012.-02.015
189. **Ward FA, Lonergan P, Enright BP, & Boland MP. 2000.** Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. *Theriogenology* 54: 433-446. doi: 10.1016/S0093-691X(00)00360-5
190. **Watanabe YF, de Souza AH, Mingoti RD, Ferreira RM, Batista EOS, Dayan A, Watanabe O, et al. 2017.** Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with *in vitro* embryo production and field fertility following embryo transfer. *Anim Reprod* 14: 635-644 doi: 10.21451/1984-3143-AR1008
191. **Wood ZA, Poole LB, Karplus PA. 2003.** Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300: 650-653. doi: 10.1126/science1080405
192. **Wrenzycki C. 2016.** *In vitro* culture systems: How far are we from optimal conditions? *Anim Reprod* 13: 279-282. doi: 10.21451/1984-3143-AR869
193. **Zamocky M, Furtmuller PG, Obinger. 2008.** Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid Redox Sign* 10: 1527-1547. doi: 10.1089/ars.20082046
194. **Zhenwei J, Xinhua Z. 2019.** Pre-MIV treatment with C-type natriuretic peptide in the presence of cysteamine enhances bovine oocytes antioxidant defense ability and developmental competence *in vitro*. *Iran J Vet Res Summer* 20: 173-179.
195. **Zhou P, Wu YG, Li Q, Lan GC, Wang G, Gao D, Tan JH. 2008.** The interactions between cysteamine, cystine and cumulus cells increase the intracellular glutathione level and developmental capacity of goat cumulus-denuded oocytes. *Reproduction* 135: 605-611. doi: 10.1530/REP-08-0003