

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ

# Memorias

**7<sup>0</sup>**  
ENCUENTRO

JÓVENES  
INVESTIGADORES  
DEL ESTADO  
DE CHIHUAHUA

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ

**Juan Ignacio Camargo Nassar**  
Rector

**Daniel Constandse Cortez**  
Secretario General

**Tania Hernández García**  
Directora General de Intercambio y Vinculación

**Jesús Meza Vega**  
Director General de Comunicación Universitaria

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ

# Memorias

**7<sup>o</sup>**  
ENCUENTRO

JÓVENES  
INVESTIGADORES  
DEL ESTADO  
DE CHIHUAHUA

Memorias 7to. Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Chihuahua  
Primera edición, 2021

© Universidad Autónoma de Ciudad Juárez,  
Avenida Plutarco Elías Calles 1210,  
Fovissste Chamizal, C.P. 32310  
Ciudad Juárez, Chihuahua, México  
Tel : +52 (656) 688 2100 al 09

La edición, diseño y producción editorial de este documento estuvo a cargo de la Dirección General de Comunicación Universitaria, a través de la Subdirección de Editorial y Publicaciones

Coordinación editorial: Mayola Renova González  
Cuidado de la edición: Subdirección de Editorial y Publicaciones  
Diagramación de interiores y portada: Karla María Rascón González

<https://elibros.uacj.mx>

## ÍNDICE

Mensaje del Rector .....	7
Área I. Física, Matemáticas y Ciencias de la Tierra....	9
Área II. Biología y Química.....	35
Área III. Medicina y Ciencias de la Salud .....	65
Área IV. Humanidades y Ciencias de la Conducta ....	81
Área V. Ciencias Sociales .....	109
Área VI. Biotecnología y Ciencias Agropecuarias...	135
Área VII. Ingenierías .....	153
Área VIII. Artes .....	179
Conferencia Magistral: la importancia de la investigación sobre la participación y representación política de los grupos históricamente vulnerados .....	199
Mesa de Mujeres en la Ciencia. ....	205

# Análisis del desarrollo y nivel de especies reactivas de oxígeno en partenotas bovinas en etapa de segmentación suplementadas *in vitro* con peróxido de hidrógeno y quercetina

Autora: Melissa Molina García<sup>1</sup>

Coautores: Chávez-Solano, M.<sup>2</sup>/Carrera-Chávez, J. M.<sup>1</sup>/Félix-Delgado, C. Y.<sup>1</sup>/Varela-Ramírez, A.<sup>3</sup>/Beristáin-Ruiz, D. M.<sup>2</sup>/Quezada-Casasola, A.<sup>1</sup>/Orozco-Lucero, E.<sup>1</sup>

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

Programa: Licenciatura en Médico Veterinario Zootecnista

Correo: al149526@alumnos.uacj.mx

## Resumen

Los altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) generados durante la producción *in vitro* (PIV) de embriones conducen al arresto embrionario. Por ello, se han investigado los efectos de la suplementación del antioxidante quercetina (Q) durante la PIV. El objetivo fue evaluar la tasa de desarrollo y los niveles de ERO de embriones partenogenéticos (partenotas) de bovinos en distintos estadios: 2 células (2c); 4 células (4c); 8 células temprano (8c Temp.); y 8 células tardío (8c Tard.) al suplementar 2  $\mu\text{M}$  de Q al medio de cultivo *in vitro* (CIV) en presencia o ausencia de 85  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrógeno. Los resultados sugieren que la Q disminuye los niveles de ERO, a la vez que aumenta las tasas de desarrollo de partenotas segmentadas, especialmente alrededor del estadio de 8c en el que presuntamente ocurre la mayor oleada de la activación del genoma embrionario.

## Introducción

La producción *in vitro* de embriones (PIV) se utiliza en el estudio del desarrollo temprano para la conservación de embriones o tratar problemas reproductivos en diversas especies, incluyendo seres humanos. Sin embargo, existen factores en la PIV capaces de impactar el desarrollo, incluyendo altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO), ocasionando estrés oxidativo, el cual se incrementa en condiciones *in vitro* (Betts, Bain, & Madan, 2014). Por este motivo, se ha intentado reducir el daño ocasionado por el estrés oxidativo al suplementar antioxidantes durante la PIV (Yu *et al.*, 2014). Un ejemplo de estos antioxidantes es la quercetina, flavonoide que secuestra anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), importante precursor de

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ). Ciudad Juárez, Chihuahua, México; C. P. 32310.

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la UACJ. Ciudad Juárez, Chihuahua, México; C. P. 32310

<sup>3</sup> The Border Biomedical Research Center, Dep. Biological Sciences, The University of Texas at El Paso (UTEP). El Paso, Texas; 79968.

ERO (Betts *et al.*, 2014). Por ejemplo, Yu *et al.* (2014) disminuyeron los niveles de ERO en embriones preimplantados de ratón al suplementar quercetina, aun en presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Aunque este estudio ha determinado parte del efecto del estrés oxidativo y la suplementación de quercetina durante el desarrollo temprano, aún no se cuenta con suficiente información acerca del efecto preciso de la suplementación conjunta de oxidantes y antioxidantes sobre la segmentación embrionaria y los niveles de ERO. Esto aplica tanto en embriones producidos por fertilización como por partenogénesis (partenotas). La etapa de segmentación incluye la activación del genoma embrionario (AGE), proceso crucial durante el desarrollo temprano y sumamente sensible al estrés oxidativo (Gad *et al.*, 2012).

## Desarrollo

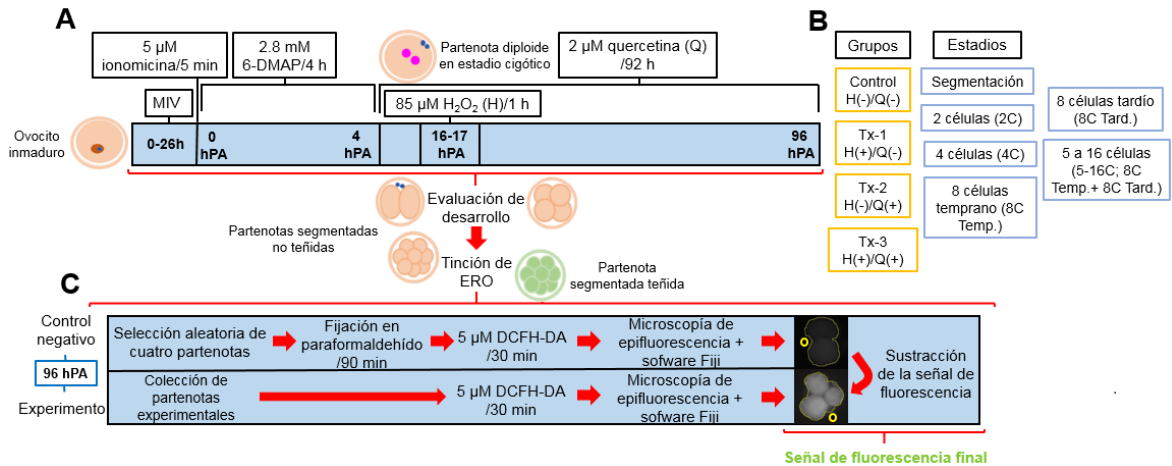
### *Justificación*

Se ha incrementado la incidencia de enfermedades reproductivas, tanto en animales domésticos como en seres humanos. Por tanto, las tecnologías de la reproducción asistida y la implementación de modelos de estudio han progresado a la par (Betts *et al.*, 2014). Para incrementar el éxito de modelos embrionarios *in vitro*, ya sea por fertilización o partenogénesis, se busca disminuir el estrés oxidativo al suplementar antioxidantes (Yu *et al.*, 2014). No obstante, los mecanismos asociados no han sido completamente dilucidados. Por ello, el objetivo fue evaluar el efecto de suplementar  $H_2O_2$  y quercetina al medio de cultivo de partenotas bovinas en etapa de segmentación, al ser una fase de suma importancia durante el desarrollo.

### *Metodología*

*Obtención de complejos cúmulus ovocito y maduración in vitro.* Se colectaron ovarios en el Rastro Municipal de Ciudad Juárez bajo los estándares del Comité de Ética y Bioética de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ). Se transportaron en solución de 0.9 % (p/v) NaCl a 38.5 °C. Se puncionaron folículos de 2-8 mm de diámetro. Se seleccionaron ovocitos con un citoplasma homogéneo y con cúmulus compacto y completo (Blondin, & Sirard, 1995). Los complejos cúmulus ovocito (COC, por sus siglas en inglés) se lavaron en BO-WASH (IVF Bioscience, Falmouth, Reino Unido) a 36 °C y se distribuyeron 10 COC/gota de 50  $\mu$ l, tras equilibrio a 38.5 °C/6.5 %  $CO_2$ /100 % humedad relativa (HR) en BO-IVF (IVF Bioscience). Se colocaron en maduración *in vitro* (MIV) durante 26 h a 38.5 °C/6.5 %  $CO_2$ /100 % HR (figura 1A).

Figura 1. Metodología. Obtención de partenotas y exposición a tratamientos: A) Grupos experimentales y estadios de desarrollo evaluados. B) Tinción de ERO y obtención de fluorescencia. C) Maduración *in vitro* (MIV); 6-dimetilaminopurina (6-DMAP); horas posactivación partenogénica (hPA); tratamiento (Tx); presencia (+); ausencia (-); diclorofluoroscina diacetato (DCFH-DA); región de interés (línea amarilla delgada); ejemplo de la zona de la que se restó el valor de fluorescencia de fondo en cada imagen (círculo amarillo)



Fuente: elaboración propia

**Partenogénesis activada y cultivo *in vitro*.** Tras la MIV se realizó la partenogénesis activada (PA). Las gotas de 50 μl de BO-IVF (IVF Bioscience), se equilibraron a 38.5 °C/6.5 % CO<sub>2</sub>/100 % HR. Se desnudaron COC mecánicamente en BO-WASH/0.33 mg/mL hialuronidasa (Sigma®, St. Louis, MO). De 20-40 ovocitos se incubaron por 5 min a 38.5 °C/6.5 % CO<sub>2</sub>/100 % HR en BO-IVF/5 μM ionomicina (Sigma®). Los ovocitos activados con ionomicina (0 h pospartenogénesis activada; hPA) se lavaron con BO-WASH e incubaron por 4 h (mismas condiciones) en grupos de 20-40 por gota de BO-IVF/2.8 mM 6-DMAP (Sigma®). Los presuntos cigotos (p-Ci) se lavaron con BO-WASH y se colocaron en grupos de 8-12 por gota de 10 μl de BO-IVF (IVF Bioscience). Las partenotas diploides se mantuvieron en cultivo *in vitro* (CIV) a 38.5 °C/6 % CO<sub>2</sub>/6 % O<sub>2</sub>/88 % N<sub>2</sub>/100 % HR hasta las 96 hPA (figura 1A).

**Tratamientos con peróxido de hidrógeno y quercetina.** Se suplementó quercetina (Q4951, Sigma®) a 2 μM (Sovernigo *et al.*, 2017) desde el inicio del CIV como pretratamiento antioxidante (Yu *et al.*, 2014); 12 h después los p-Ci se expusieron durante 1 h a 85 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma®; Betts *et al.*, 2014). Los p-Ci se lavaron con BO-WASH y se colocaron en medio CIV en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero con quercetina hasta las 96 hPA (figura 1A).

**Evaluación de desarrollo partenogénico.** La segmentación de partenotas, se evaluó al estereoscopio a las 96 hPA. Se registraron los siguientes estadios: 2 células (2C); 4 células (4C); 8 células temprano (8C Temp.); 8 células tardío (8C Tard.); y 5 a 16 células (5-16C; combinación de los datos de 8C Temp. y 8C Tard. para estimar el desarrollo) (figura 1B). Los cálculos de la tasa de desarrollo, se realizaron con las fórmulas:



% Segmentación

$$= \frac{\text{estr. segmentadas}}{\text{COC MIV}} \times 100$$

$$\% 8C \text{ Temp.} = \frac{\text{estr. } 8C \text{ Temp.}}{\text{COC MIV}} \times 100$$

$$\% 2C = \frac{\text{estr. } 2C}{\text{COC MIV}} \times 100$$

$$\% 8C \text{ Tard.} = \frac{\text{estr. } 8C \text{ Tard.}}{\text{COC MIV}} \times 100$$

$$\% 4C = \frac{\text{estr. } 4C}{\text{COC MIV}} \times 100$$

$$\% 5-16C = \frac{\text{estr. } 8C \text{ Temp.} + \text{estr. } 8C \text{ Tard.}}{\text{COC MIV}} \times 100$$

Donde: estr. = Número de estructuras; COC-MIV = Complejos cúmulus-ovocito colocados en maduración *in vitro*; 2c = 2 células; 4c = 4 células; 5 a 8 células/8c Temp. = 8 células temprano; 10 a 16 células/8c Tard. = 8 células tardío; y 5-16c = 5 a 16 células.

**Tinción de especies reactivas de oxígeno y evaluación de fluorescencia.** Tras 96 hPA se tiñeron partenotas segmentadas por 30 min a 38.5 °C/6 % CO<sub>2</sub>/6 % O<sub>2</sub>/88 % N<sub>2</sub>/100 % HR en BO-IVC/5 μM diclorofluoroscina diacetato (DCFH-DA; Sigma®) y se lavaron con PBS/1 mg/mL alcohol polivinílico. Se utilizó una sola imagen de epifluorescencia por partenotas con un microscopio Axio Observer.Z1, objetivo 20x y filtro de fluorescencia (excitación, 495 nm; emisión, 520 nm; Zeiss; Oberkochen, Alemania). Se expuso por 150 mS por medio del *software* ZEN Blue 2011 (Zeiss). Se utilizaron 3 réplicas o más de mínimo 3 partenotas. Se determinaron niveles de fluorescencia en todos los estadios por separado con el *software* Fiji (<https://fiji.sc>; Schindelin *et al.*, 2012) con una imagen en escala de grises. Se combinaron los estadios de 8c Temp. y 8c Tard. para estimar la fluorescencia en el estadio 5-16c. En cada imagen se restó el valor de fluorescencia de fondo. A cada partenota (región de interés: citoplasma), se le restó la intensidad de fluorescencia del control negativo de su experimento: promedio de partenotas fijadas en 4 % (p/v) paraformaldehído antes de incubar en DCFH-DA (Betts *et al.*, 2014). La fluorescencia se expresó en unidades arbitrarias (UA) (figura 1C).

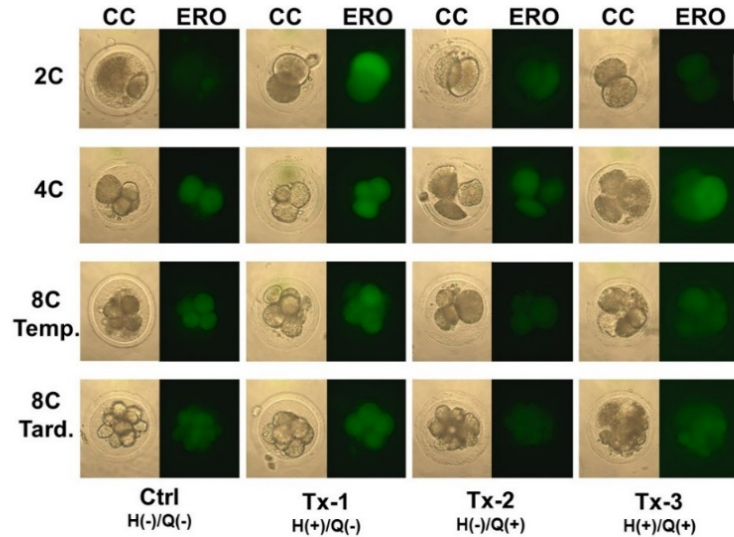
**Diseño experimental.** Se evaluó el desarrollo de partenotas tras cultivar en presencia (+) o ausencia (-) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H) o quercetina (Q). Los grupos fueron: 1) Control (Ctrl), H(-)/Q(-); 2) Tratamiento (Tx) 1, H(+)/Q(-); 3) Tx-2, H(-)/Q(+); y 4) Tx-3, H(+)/Q(+) (figura 1B). Se utilizaron 5 repeticiones para Ctrl y 6 para los demás grupos.

**Análisis estadístico.** Se graficó la media ± error estándar (EE) de la tasa de desarrollo y la intensidad de fluorescencia de los tratamientos respecto a la media del Ctrl con GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Prism, San Diego, CA). Los datos en porcentaje (desarrollo) se transformaron al arcoseno previo al análisis. En ambos casos, se empleó prueba T múltiple (Holm-Sidak). Se consideraron diferencias significativas cuando  $P \leq 0.05$ .

## Resultados

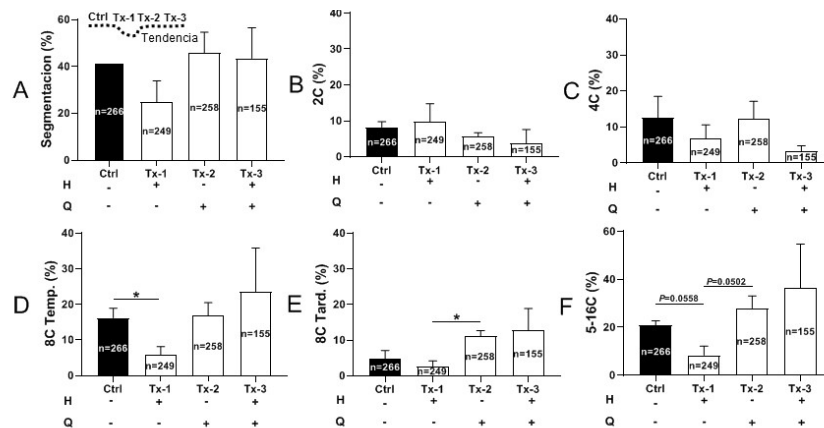
La figura 2 muestra microfotografías representativas (campo claro e imagen de epifluorescencia) de los estadios (2c; 4c; 8c Temp; 8c Tard; 5 a 16c) por tratamiento [Ctrl H(-)/Q(-); Tx-1, H(+)/Q(-); Tx-2, H(-)/Q(+); Tx-3, H(+)/Q(+)]. En el estadio de 8c Temp., Ctrl tuvo una mayor tasa de desarrollo que Tx-1 ( $P < 0.05$ ; Gráf. 1D). En el estadio de 8c Tard, Tx-1 presentó una menor tasa de desarrollo que Tx-2 ( $P < 0.05$ ; Gráf. 1E). En el estadio de 5-16c (8c Temp. + 8c Tard.), Tx-1 mostró una menor tasa de desarrollo que Ctrl ( $P = 0.0558$ ) y que Tx-2 ( $P = 0.0502$ ; Gráf. 1F). Al evaluar los resultados de la fluorescencia en el estadio 2c, Tx-1 presentó niveles de ERO más elevados que Ctrl y que Tx-2, a la vez que Tx-2 mostró menor fluorescencia que Ctrl ( $P < 0.05$ ; Gráf. 2A). En el estadio de 8c Temp., los niveles de ERO en Tx-1 fueron más elevados que en Ctrl ( $P < 0.01$ ), Tx-2 y Tx-3 ( $P < 0.0001$ ; Gráf. 2C). En el estadio de 8c Tard., los niveles de ERO en Tx-1 resultaron más elevados que en Tx-2 y Tx-3 ( $P < 0.05$ ; Gráf. 2D). En el estadio de 5-16c (8c Temp. + 8c Tard), Tx-1 presentó niveles de ERO más elevados que Ctrl ( $P < 0.01$ ), Tx-2 y Tx-3 ( $P < 0.0001$ ; Gráf. 2E).

Figura 2. Microfotografías representativas de partenotas segmentadas de bovinos tratadas con peróxido de hidrógeno o quercetina. Microscopía de campo claro (CC) y epifluorescencia de especies reactivas de oxígeno (ERO) en partenotas teñidas con diclorofluoroscina diacetato (DCFH-DA) en estadios de 2 células (2C), 4 células (4C), 8 células temprano (5 a 8 células; 8C Temp.) y 8 células tardío (10 a 16 células; 8C Tard.) en ausencia (-) y presencia (+) de peróxido de hidrógeno, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H) y quercetina (Q). Ctrl = Control; Tx = Tratamiento. Barra de escala: 100 µm



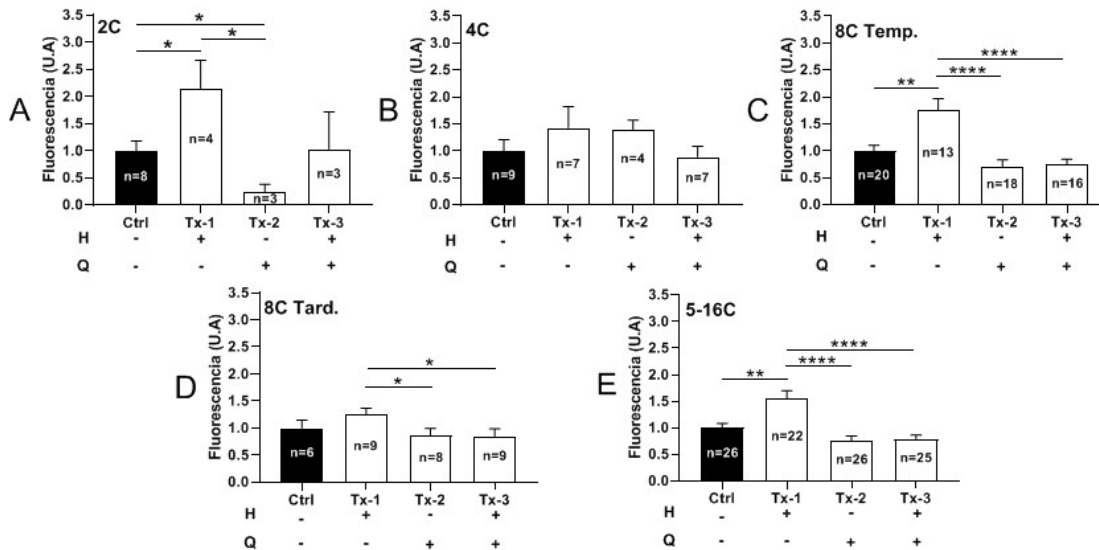
Fuente: elaboración propia

Gráfica 1. Evaluación del desarrollo en partenotas bovinas: tasas de desarrollo en partenotas bovinas en estadio de segmentación (A); 2 células (2C; B), 4 células (4C; C), 8 células temprano (5 a 8 células; 8C Temp; D), 8 células tardío (10 a 16 células; 8C Tard; E) y 5 a 16 células (8C Temp. + 8C Tard; 5-16C; F) cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de peróxido de hidrógeno, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H; 85 µM) y quercetina (Q; 2 µM). Las barras muestran la media ± error estándar (EE). \*( $P \leq 0.05$ ). Ctrl = Control; Tx = Tratamiento;  $n$  = número de complejos cúmulos ovocito inicialmente colocados en maduración *in vitro*



Fuente: elaboración propia

Gráfica 2. Evaluación de los niveles de fluorescencia de ERO en partenotas bovinas. Niveles de ERO teñidas con diclorofluoroscina diacetato (DCFH-DA) en partenotas bovinas en estadios de 2 células (2c; A), 4 células (4c; B), 8 células temprano (5-6 células; 8c Temp; C), 8 células tardío (10 a 16 células; 8c Tard; D) y 5 a 16 células (8c Temp. + 8c Tard; 5-16c; E) en ausencia (-) y presencia (+) de peróxido de hidrógeno, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H; 85 µM) y quercetina (Q; 2 µM). Las barras muestran la media ± error estándar (EE). \*( $P \leq 0.05$ ); \*\*( $P \leq 0.01$ ); \*\*\*\*( $P \leq 0.0001$ ). Ctrl = Control; Tx = Tratamiento; UA = Unidades arbitrarias; n = Número de partenotas analizadas



Fuente: elaboración propia

## Conclusiones

### Discusión

Debido a su acción antioxidante, la Q disminuye los niveles de ERO, aumentando el potencial de la membrana mitocondrial y previniendo el estrés oxidativo (Yu *et al.*, 2014). Estos efectos también se han reportado en embriones. Tal es el caso de Kang *et al.* (2016), quienes suplementaron 3.3 µM Q durante la MIV previo a la producción de partenotas de cerdo. En dicho estudio la suplementación de Q disminuyó los niveles de ERO e incrementó la tasa de desarrollo partenogenético. De manera similar, Sovernigo *et al.* (2017) observaron que tras suplementar 2 µM Q al medio de MIV de ovocitos bovinos los niveles de ERO disminuyen, aumentando la tasa de desarrollo embrionario. Lo anterior podría prevenir los efectos negativos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, oxidante que facilita la producción de ERO (Yu *et al.*, 2014). Considerando que el desarrollo embrionario temprano depende completamente de la etapa de segmentación (Graf *et al.*, 2014), el presente estudio se enfocó en los efectos antioxidantes de la Q durante dicho periodo. Debido a la relativa cercanía del periodo de MIV y el inicio del desarrollo embrionario, este estudio utilizó 2 µM Q desde el inicio y durante el CIV, así como Sovernigo *et al.* (2017) realizaron en bovinos.

Asimismo, este trabajo empleó un pretratamiento de Q ante la aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para evaluar el potencial de la Q para prevenir los efectos adversos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esto debido a que Yu *et al.* (2014) indican que el pretratamiento de Q reduce el número de células apoptóticas y conserva al estado redox por medio de las defensas enzimáticas del embrión. Los estadios evaluados en el presente estudio fueron 2c, 4c, 8c Temp., 8c Tard. y 5-16c, abarcando momentos precisos de la etapa de segmentación. En bovinos, la mayor oleada de la AGE ocurre

durante el estadio de 8 a 16 células (Gad *et al.*, 2012). La AGE es de suma importancia, ya que establece las bases moleculares que regulan el desarrollo posterior, pudiendo ser fácilmente alterada durante el CIV, al incrementar el estrés oxidativo, conduciendo al arresto o muerte embrionaria (Gad *et al.*, 2012). Los resultados del desarrollo evaluado a las 96 hPA (4 días; tiempo estimado para alcanzar la etapa de 8-16 células en bovinos) indican que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lo disminuye, mientras que la Q lo incrementa. Esto fue más visible en momentos específicos de la segmentación embrionaria, donde ocurre la mayor oleada de la AGE en bovinos: al inicio (8C Temp.) y al final (8C Tard.) de dicho evento molecular. Asimismo, los resultados en la etapa 5-16C (todo el periodo de la mayor oleada de la AGE) muestran una fuerte tendencia a que el desarrollo disminuye o aumenta tras suplementar oxidantes o antioxidantes, respectivamente. Los efectos en el desarrollo tras suplementar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Q coinciden con modificaciones en los niveles de ERO, siendo estos más significativos que los observados en el desarrollo.

Esto incluye, incluso, partenotas con desarrollo arrestado (estadio 2C a las 96 hPA). De igual manera, sucedió en partenotas cuyo desarrollo coincide con la parte inicial (8C Temp.) y final (8C Tard.) de la mayor oleada de la AGE, reflejado también en el estadio 5-16C. Además, en el grupo Tx-3, H(+)/Q(+) la Q fue capaz de rescatar el incremento en los niveles de ERO ocasionado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por tanto, se sugiere que el impacto en el desarrollo partenogenético tras suplementar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Q es producto de las modificaciones en los niveles de ERO ocasionadas por dichas sustancias. Esto soporta la observación de que la AGE en bovinos es sensible al estrés oxidativo (Gad *et al.*, 2012) y sugiere que el estado redox durante tal periodo puede modificarse mediante suplementación en cultivo, influyendo en la segmentación y el desarrollo posterior. Se concluye que la suplementación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta los niveles de ERO, disminuyendo el desarrollo, en tanto que bajas concentraciones de Q los reducen, promoviendo el desarrollo de partenotas bovinas en etapa de segmentación, destacando que el desarrollo temprano bovino, alrededor del momento de la AGE, es sumamente sensible a modificaciones del estado redox. Sin embargo, los mecanismos por los cuales el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la Q ejercen dichos efectos en este modelo quedan aún por determinarse.

#### *Aportaciones*

Los resultados del presente estudio generan información del efecto de suplementar Q durante la PIV bajo condiciones de estrés oxidativo, generado por un agente oxidante, específicamente durante un periodo crucial para el desarrollo embrionario. Esto podría emplearse para mejorar la generación *in vitro* de embriones, ya sea por PA o fertilización, tanto en bovinos como en otras especies. Por tanto, este modelo cuenta con potencial para mejorar los protocolos de la PIV, ya sea con fines de investigación, producción ganadera o la conservación de especies animales en categoría de riesgo.

#### **Referencias**

- Betts, D. H., Bain, N. T., & Madan, P. (2014). The p66<sup>Shc</sup> Adaptor Protein Controls Oxidative Stress Response in Early Bovine Embryos. *PLoS One*, *9*(1), e86978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086978>
- Blondin, P., & Sirard, M. A. (1995). Oocyte and Follicular Morphology as Determining Characteristics for Developmental Competence in Bovine Oocytes. *Molec. Reprod. Develop.*, *4*(1), 54-62. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080410109>
- Gad, A., Hoelker, M., Besenfelder, U., Havlicek, V., Cinar, U., Rings, F., Held, E., Dufort, I., Sirard, M. A., Schellander, K., & Tesfaye, D. (2012). Molecular Mechanisms and Pathways Involved in Bovine Embryonic Genome Activation and their Regulation by Alternative *in vivo* and *in vitro* Culture Conditions. *Biol. Reprod.*, *8*(4), 100. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.099697>

- Kang, J. T., Moon, J. H., Choi, J. Y., Park, S. J., Kim, S. J., Saadeldin, I. M., & Lee, B. C. (2016). Effect of Antioxidant Flavonoids (Quercetin and Taxifolin) On *in vitro* Maturation of Porcine Oocytes. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.*, *29*(3), 352-358. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0341>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An Open-source Platform for Biological-image Analysis. *Nat. Met.*, *9*(7), 676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Sovernigo, T. C., Adona, P. R., Monzani, P. S., Guemra, S., Barros, F., Lopes, F. G., & Leal, C. (2017). Effects of Supplementation of Medium with Different Antioxidants during *in vitro* Maturation of Bovine Oocytes on Subsequent Embryo Production. *Reprod. Domest. Anim.*, *52*(4), 5610569. <https://doi.org/10.1111/rda.12946>
- Yu, S., Long, H., Lyu, Q. F., Zhang, Q. H., Yan, Z. G., Liang, H. X., Chai, W. R., Yan, Z., Kuang, Y. P., & Qi, C. (2014). Protective Effect of Quercetin on the Development of Preimplantation Mouse Embryos against Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Injury. *PLoS One*, *9*(2), e89520. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089520>