

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL



Categoría morfológica, progresión meiótica y expansión en complejos
cumulo-ovocitos teñidos con azul de tripán

Por:

Giovanni Aguilar Valero

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México
Diciembre 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL

Categoría morfológica, progresión meiótica y expansión en complejos
cumulo-ovocitos teñidos con azul de tripán

Por:

Giovanni Aguilar Valero

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito
parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por:



Dr. Juan Luis Morales Cruz

Presidente



Dr. Hugo Zuriel Guerrero Gallegos

Vocal



Dr. Juan Manuel Guillen Muñoz

Vocal



Dra. Zurisaday Santos Jiménez

Vocal Suplente





M.C. José Luis Francisco Sandoval Elías
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México
Diciembre 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Categoría morfológica, progresión meiótica y expansión en complejos
cumulo-ovocitos teñidos con azul de tripán

Por:

Giovanni Aguilar Valero

TESIS

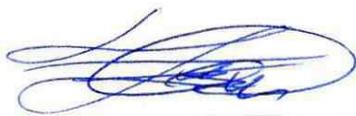
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Juan Luis Morales Cruz
Asesor Principal



Dr. Hugo Zuriel Guerrero Gallegos
Coasesor



Dr. Juan Manuel Guillen Muñoz
Coasesor



M.C. José Luis Francisco Sandoval Elías
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México
Diciembre 2024

AGRADECIMIENTOS

A MI DIOS PADRE que me permitió al darme salud y fuerza para poder lograr lo que hasta ahora tengo, que me bendice y acompaña siempre.

A MIS PADRES Francisco Aguilar Gómez y Reyna Valero Duarte quienes sin su apoyo, motivación y amor no hubiese podido lograr lo que hasta ahora tengo.

A MIS HERMANOS Francisco Aguilar Valero y Daira Aguilar Valero quien es y ha sido siempre un gran ejemplo a seguir como hermano mayor, que sin su apoyo y motivación total no lo hubiese logrado. Y mi hermana menor siendo la pequeña que me motiva para ser su ejemplo a seguir.

A MIS ABUELOS Pascual Aguilar López, Ofelia Gómez Elías, Alberto Valero Alcántara y María Bonifacia Duarte Camacho quienes durante todo mi progreso me apoyaron motivándome y recordándome que podre ser uno de los mejores médicos de la actualidad, y que sin su motivación no tendría las fuerzas para poder seguir adelante.

A MIS PRIMOS Bertín Morales Aguilar y José Luis Morales Aguilar quienes sin su apoyo y recomendaciones no hubiese llegado a la institución de la cual me acogió y ahora me ayudo a abrir las alas y lograr ser lo que me apasiona.

A MIS ASESORES Juan Luis Morales Cruz, Hugo Zuriel Guerrero Gallego y Juan Manuel Guillen Muñoz, quienes han sido participes en este desarrollo institucional y sobre todo para llevar a cabo mi tipo de titulación la que es este documento.

A MIS COLEGAS Jozabed Gibran Gorgonio Gallegos y Sebastián Haro Lavín quienes fueron colegas y amigos que me acompañaron durante el proceso de la carrera y de poderme compartir mucho sobre ellos.

A UN AMIGO MVZ. Maurilio Solorio Ochoa quien durante este tiempo que inicie mi proyecto de tesis me ha brindado las capacidades, conocimientos y recomendaciones para poder lograr hasta ahora este documento.

DEDICATORIA

A MIS PADRES Francisco Aguilar Gómez y Reyna Valero Duarte que sepan que, gracias a su esfuerzo, tiempo y cariño, lograron mi sueño y que se los pago con amor y responsabilidad sobre todo como persona y labor de vida.

A MIS HERMANOS Francisco Eduardo Aguilar Valero y Daira Aguilar Valero quien con su ejemplo como hermano mayor me guio y de su cariño como hermana menor, se los agradezco y amo mucho.

A MIS FAMILIARES Familia Aguilar Gómez y Familia Valero Duarte porque siempre me ofrecen una definición digna de lo que soy y seré el día de mañana.

INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
INDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
HIPOTESIS	3
OBJETIVO GENERAL.....	3
1.2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	3
II. REVISION DE LERATURA	4
2.1 GANADERÍA EN EL MUNDO Y EN MÉXICO.....	4
2.2. BIOTECNOLOGÍA Y SU IMPORTANCIA EN LA REPRODUCCIÓN ANIMAL.....	5
2.3. IMPORTANCIA DE LA BIOTECNOLOGÍA EN MÉXICO.	8
2.4 FISIOLOGÍA DEL CICLO ESTRAL Y GENERALIDADES ANATOMICAS DE LA HEMBRA BOVINA	10
2.5 COMPLEJO CUMULUS-OVOCITO.....	17
2.6 CLASIFICACIÓN DE LOS OVOCITOS.	20
2.7 ESTRUCTURA DE LA CROMATINA.....	24
2.8. TINCIONES MAS UTILIZADAS EN OVOCITOS	26
2.8.1 AZUL DE TRIPAN	26
2.8.2 AZUL BRILLANTE DE CRECILIO	27
2.8.3 TINCIÓN ACETO-ORCEÍNA	29
III. MATERIALES Y MÉTODOS	31
Localización del área de estudio.	31
Obtención de muestras.	31
Evaluación externa y transporte de ovarios.	31
Desinfección y preparación de los ovarios.....	32
Aspiración folicular y obtención de complejos cumulus ovocito (CCO).	32
Selección y clasificación de los COC´S.....	33
Análisis de calidad y viabilidad.	34
Maduración in vitro.	34
Resultados de maduración.....	35

Evaluación del índice de expansión.....	35
Evaluación de la progresión meiótica	36
IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
V. DISEÑO EXPERIMENTAL	38
Grupo control (CN).....	38
Grupo Azul de tripán (AT).....	38
VI. RESULTADOS.....	39
VII. DISCUSIÓN	42
VIII. CONCLUSIÓN	43
IX. LITERATURA CITADA	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proporción de la aplicación de la biotecnología por país. (Espinosa et al., 2017).....	9
Figura 2. Fases del ciclo estral. (Hasbi & Gustina, 2020)	12
Figura 3. Localización de las estructuras del aparato reproductor de la hembra bovina. (Lennis <i>et al.</i> , 2021)	13
Figura 4. Vulva (1) labio vulvar izquierdo, (2) labio vulvar derecho, (3) comisura dorsal, (4) comisura ventral (Lennis <i>et al.</i> , 2021).	14
Figura 5. Cuerpo del útero (recuadro rojo), (1) cérvix o cuello uterino. (2) cuernos uterinos. (Lennis et al., 2021)	15
Figura 6. (1) cuerno uterino, (2) oviducto y (3) ligamento mesosalpinx. (Lennis <i>et al.</i> , 2021)	16
Figura 7. Ovario izquierdo con presencia de folículos (1) y ovario derecho con presencia de cuerpo lúteo (2) y cuerpo albicans (3) (Lennis et al., 2021).	17
Figura 8. Diagrama del desarrollo folicular (Turathum et al., 2021).	18
Figura 9. Comunicación intercelular del complejo cumulus-ovocito (Xie, Xu, & Liu, 2023)	19
Figura 9. Diagrama de estructuras morfológicas en la comunicación intercelular en el complejo cumulus-ovocito.	19
Figura 10. Categorías morfológicas: A= Categoría 1, B=Categoría 2, C= Categoría 3 y D=Categoría 4 (Kouamo <i>et al.</i> , 2019).	23
Figura 11. Compactación de la cromatina desde la doble hélice hasta el cromosoma metafásico. (Rojas L. y Milán C., 2016)	24
Figura 12. Ovocitos teñidos con azul brillante de crecilio (BCB), A: ovocitos negativos (BCB-), B: ovocitos positivos (BCB+) (Bittner <i>et al.</i> , 2023).....	28
Figura 13. Estado nuclear de ovocitos bovinos, GV: Vesícula germinal, MI: Metafase 1, MII: Metafase 2 y D: Degenerado.	30
Figura 13. Estado nuclear de ovocitos bovinos, GV: Vesícula germinal, MI: Metafase 1, MII: Metafase 2 y D: Degenerado	31
Figura 14. Aspiración folicular de los ovarios por aguja.....	33
Figura 15. Búsqueda y selección de los COC´s.	34
Figura 16. Evaluación del índice de expansión de los COC´s a través del programa ImageJ	36
Figura 17. Evaluación de la progresión meiótica en COC´s utilizando tinción de aceto-orceína.	37
Figura 18. Determinación de la viabilidad bajo la tinción de azul de tripán.....	38
Figura 19. Comparaciones entre categorías morfológicas	41

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje del número de COC´s aspirados por aguja y clasificados bajo categoría morfológica.....	39
Tabla 2. Porcentaje de ovocitos vivos y muertos por categoría morfológica.....	39

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto del azul de tripán sobre la progresión meiótica y expansión de complejos cumulus-ovocito (COC's) de ovarios de vacas Holstein de rastro en el Norte de México. Se obtuvieron un total de 816 ovocitos de las diferentes categorías morfológicas (1, 2, 3 y 4). Se evaluaron dos grupos, un grupo control y un grupo con tinción de azul de tripán. La expansión de los complejos se evaluó posterior a la maduración. A su vez la progresión meiótica fue evaluada por medio de tinción de aceto-orceína al 1%. Las variables se analizaron a través de prueba Poisson y chi cuadrado. Se tomó el valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. No se observó diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en proporción del índice de expansión de COC's entre el grupo tratado (1.88) y el grupo control (2.46). Se observó mayor ($p < 0.001$) proporción de COC's viables dentro de las categorías 1=81.9 %, 2=77.7 % y 4=69.9 % en comparación de los COC's muertos, mientras que los COC's de categoría 3 no se encontró diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) entre vivos (45.3 %) y muertos (54.7 %), así mismo la progresión meiótica a MII no se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre el grupo tratado (53.49 %) y el control (48.57 %), respectivamente. Se concluye que el azul de tripán no afecta en la progresión meiótica (MII) y expansión del cumulus en COC's, mientras que la viabilidad se ve determinada por la categoría morfológica de los ovocitos.

Palabras clave: Ovocito, Azul de tripán, Morfología, Progresión meiótica, Expansión del cumulo, Holstein

I. INTRODUCCIÓN

Una de las actividades importantes no solo en México si no en el mundo, es la ganadería, esta actividad aporta al producto interno agropecuario (Quintana et al., 2019) pero sobre todo aporta proteína de origen animal, que permiten sustentar a la población en general (Arieta, 2020). La ganadería cubre el 40% de producto interno bruto agrícola (PIBA) a nivel mundial (Palma., 2014). México ha venido ocupando lugar dentro de la ganadería, siendo uno de los principales países de los cuales se tiene en cuenta que desarrolla ya hace mucho tiempo la ganadería dentro de su territorio cubriendo necesidad sobre todo en la producción de alimento de origen animal y del sustento económico del país (Amaya., 2016)

Una de las prácticas que ha venido cobrando relevancia sobre todo a nivel de desarrollo en la ciencia y la tecnología, es la biotecnología, la cual es una práctica dentro de los procesos biológicos para el desarrollo de nuevas oportunidades, medios y conocimientos (Bourdane, 2021). La biotecnología específicamente a nivel reproductivo ha sido realmente identificada como una de las practicas con mayor índice de ayuda en el propósito de aprovechar y conservar los recursos zoogenéticos (Pérez *et al.*, 2022).

En general los procesos reproductivos se ven caracterizados principalmente por la esencia de la renovación biológica y específica de cada una de las especies (Gasque, 2016). Es así que la biotecnología actúa sobre todo para generar un mejoramiento genético que permita garantizar una buena selección y esquema más completo genéticamente hablando (Mejía *et al.*, 2022).

A su vez este tipo de problemáticas se pueden disminuir con prácticas o técnicas de biotecnología animal como la producción de embriones *in vitro*, siendo una de las prácticas de reproducción asistida que se han venido utilizando durante estos años (Sonjaya *et al.*, 2017). Esta práctica es utilizada en un gran número de especies animales con variedad de propósitos, siendo una de las más comunes y dando buenos resultados en la especie bovina (Zarcula *et al.*, 2015). Sin embargo, a pesar de tener buenos resultados de la producción de embriones *in vitro* en la

especie bovina, solo el 30-40% de los ovocitos llegan a la etapa de blastocisto (Kartikasari *et al.*, 2020).

Se debe tener en cuenta que el éxito en la producción de embriones *in vitro* (PIVE) se ve influenciado sobre todo por la maduración *in vitro* y características del ovocito (Riyusca *et al.*, 2019). El uso de ovocitos de buena calidad conlleva a tener mejores resultados dentro del manejo reproductivo y a su vez lleva a disminuir los efectos negativos en la PIVE por la baja calidad de estos y aumentar así la eficiencia reproductiva del ganado (Baruselli *et al.*, 2020).

Uno de los criterios de evaluación de la calidad de ovocitos en la actualidad es a través de su morfología, que incluye principalmente en la granulación de citoplasma y el número de capas de células del cumulus (Murin *et al.*, 2019). Sin embargo, estos criterios son de forma cualitativa y se dificulta seleccionar a los ovocitos más competentes (Neira *et al.*, 2023).

De otra forma, en la actualidad se implementa la utilización de tinciones que permitan evaluar la viabilidad de las células, que permitan realizar técnicas como la FIV y que estas mismas se vuelvan más eficientes (Filipiak y Larocca., 2012).

El uso del azul de tripán, se ha venido implementado como medio para la evaluación de la viabilidad y competencia de desarrollo de los ovocitos, sin llegar a causar efectos negativos en la calidad del mismo y de sus células en conjunto (Quezada *et al.*, 2018) a diferencia de las técnicas utilizadas para cuantificar las células vivas mediante el etiquetado exclusivo de las células muertas (Caraba, 2023)

Una gama alta en la calidad y viabilidad son principales requisitos previos a los procesos de producción de embriones *in vitro* (Boni, 2012). Pues a lo largo de todo este tiempo las tecnologías reproductivas asistidas han tenido como propósito la producción de especies animales de alto valor genético (Blondín *et al.*, 2012).

Por ello el objetivo principal de este estudio es determinar la expansión del cumulus y la progresión meiótica de los complejos cumulus-ovocito bajo la tinción de azul de tripán.

HIPOTESIS

El uso de la tinción de azul de tripán no afecta la progresión meiótica y expansión de complejos cúmulos-ovocitos, mientras que la categoría morfológica si los afecta

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del uso de la tinción de azul de tripán en ovocitos con diferente categoría morfológica sobre la progresión meiótica y expansión de complejos cúmulos-ovocitos.

1.2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Evaluar la distribución de progresión meiótica, el índice de expansión de ovocitos teñidos y no teñidos con azul de tripán.

Determinar la proporción de ovocitos vivos y muertos en CCO de diferente categoría morfológica.

Describir las relaciones entre la categoría morfológica, el índice de expansión y la progresión meiótica

II. REVISION DE LERATURA

2.1 GANADERÍA EN EL MUNDO Y EN MÉXICO.

La ganadería es una de las practicas pecuarias importantes, no solo en México sino en todo el mundo. Esta actividad tiene un objetivo dual, evitar la pobreza a millones de personas y proveer proteína de origen animal a la humanidad (Arieta, 2020). Es evidente que la producción ganadera es una de las más importantes ocupando incluso la mitad en sector agrícola en los países desarrollados y una tercera parte para los subdesarrollados, con una amplia tendencia de crecimiento. De esta manera las biotecnologías han permitido aumentar la eficiencia de la producción ganadera, como también la disminución de los costos operativos para volverla un poco más accesible (Palma, 2014).

La ganadería se ha centrado como uno de los sectores que presenta mayor potencial de producir proteína de origen animal, que permita alimentar a la población mundial, la cual va en aumento con el paso de los años (Arieta, 2020).

Por tanto, las actividades ganaderas son aquellas que significativamente favorecen y aportan dentro del producto interno agropecuario de los países del mundo (Quintana *et al*, 2019).

La importancia que ha venido cobrando este debate en torno a la ganadería, puesto que se ha centrado como el sector que más puede producir para satisfacer las demandas de productos de origen animal y que estos permitan alimentar a la población mundial, la cual va en aumento con el paso de los años. Actualmente las actividades tecnológicas más avanzadas y sociedades más modernas son dependientes de la ganadería dentro de la seguridad alimentaria y nutricional. (Arieta, 2020). Así mismo, las actividades ganaderas son aquellas que significativamente favorecen y aportan una parte importante del producto interno agropecuario de los países del mundo (Quintana *et al.*, 2019)

Así mismo, la ganadería puede poseer un papel importante con alta permanencia para la mejora de millones de vidas en el mundo proporcionándoles alimento, ingresos, empleos y muchas oportunidades económicas (Arieta, 2020).

Dentro del territorio mexicano la ganadería ha venido siendo uno de los importantes ejes de la economía del país, llegando a ser considerada como una de las actividades de desarrollo económico. Puesto a que la ganadería ha venido tomando relevancia durante estos años, si bien sabemos que la ganadería se trata de una de las actividades que tienen más importancia dentro del ámbito económico y cultural del país (Amaya, 2016).

La ganadería también es notada por cierto grupo de la población como algunas actividades de problemática derivadas de la práctica que atenta contra el medio ambiente, como un proceso atraso del área productiva y de desastre para la naturaleza (Amaya, 2016).

Con alta relevancia podemos asegurar que el estilo de la ganadería en México ha pasado durante algunas décadas cambios ligeros, sin embargo, México tiene la capacidad para posicionarse como uno de los productores de leche y carne a nivel mundial (Arieta, 2020). De la misma manera actualmente la tendencia de escases de producción de proteína de origen animal por el crecimiento de la población ha llevado a intensificar los sistemas ganaderos (Arieta, 2020).

2.2. BIOTECNOLOGÍA Y SU IMPORTANCIA EN LA REPRODUCCIÓN ANIMAL.

Es bien sabido que durante los últimos años indiscutiblemente la ciencia y la tecnología avanzan de forma significativa, que el aprovechamiento de estas mismas nos llevara a satisfacer las necesidades de la población (Bourdone, 2021). La biotecnología es un conjunto de prácticas que a su vez se especializan dentro de los procesos biológicos o incluso de las estructuras biológicas más relevantes (Bourdone, 2021). Se define también a la biotecnología como toda aquella tecnología que se basa a través de la biología (Espinosa *et al.*, 2017). Por otra parte, la capacidad de los países con altas características de desarrollo se ha venido favoreciendo por el amplio y rápido desarrollo de los procesos tecnológicos, y de globalización principalmente que permite aumentar las capacidades de estos mismo (Ugalde, 2014).

Se debe de entender que una dirección específica para los procesos científicos y tecnológicos, tendrán como objetivo satisfacer las necesidades de la población para permitir la facilidad y la viabilidad tanto tecnológica como científica (Ugalde, 2014). La biotecnología dentro del desarrollo puede considerarse dentro de la conservación, preservación o reproducción de especies animales como de vegetales (Ugalde, 2014).

Es necesario recalcar que las técnicas en los animales domésticos son aplicadas de forma sistémica, donde se obtienen resultados bastante aceptables mejorando la producción y calidad de los productos. Sin embargo, la utilización de estas técnicas en el área de la reproducción hay componentes principales que se consideran desde el punto de vista ético y económico (Ugalde, 2014).

Cabe destacar que grandes y pequeños avances de la biotecnología reproductiva ha permitido conocer importantes situaciones, como los mecanismos fisiológicos de los individuos siendo uno de los más sencillo y básicos, mientras que existen otros con más avances tecnológicos como lo son la fecundación o desarrollo embrionario. (Vazquez, 2010). Con respecto a lo anterior existen diferentes biotecnologías reproductivas, que van desde la más simple que es la inseminación artificial hasta la más compleja que es la clonación, y todo este conjunto de técnicas tienen como finalidad aumentar y desarrollar la eficiencia reproductiva en los animales (Ugalde, 2014). De la misma manera otro rasgo de las biotecnologías reproductivas es lograr abrir posibilidades de conservación y aprovechamiento de los recursos zootécnicos (Pérez *et al*, 2022). Es bien sabido que las biotecnologías han venido desarrollándose con el tiempo y se le establecen cinco generaciones dentro de la biotecnología reproductiva, I: inseminación artificial; II: control hormonal y transferencia de embriones; III: sexado de espermatozoides y producción *in vitro* de embriones; IV: identificación de clonación; V: la transgénesis (Ugalde, 2014).

Cabe recalcar que en el ámbito de la genética poblacional y de los modelos genético-estadísticos en los que se realizan programas de evaluación y de selección reproductiva llevando a realizar ambiciosas proyecciones como las modernas técnicas de producción *in vivo* e *in vitro*, conservación de embriones y en su mayor

complejidad la clonación. (Palma, 2014) De las cuales, se demuestra que puede incrementar significativamente el progreso de programas de producción convencionales. (Palma, 2014). Sin embargo, el desarrollo de estas biotecnologías reproductivas, ha traído el aumento de las dificultades para obtener buenos resultados en estas técnicas, mismas que en los costos volviéndolas poco accesible a los productores. (Palma, 2014). Aunque, el desempeño y monitoreo de este tipo de técnicas permiten enfrentar desafíos cada vez mayores, con la finalidad de aumentar la productividad de los sistemas de producción. (Choudhary *et al.*, 2016). Por esta misma razón su uso está restringido en una minoría de la población de animales de alto valor genético, de los cuales existe una mayor aplicación en los países de desarrollo o de países tradicionalmente ganaderos, con productos de alto valor económico. (Palma, 2014).

Es necesario saber que hoy en día el importante reto de este gran problema de aumento de la población, es la de garantizar una creciente demanda de producción de alimentos de origen animal, sin perjudicar al medio ambiente. De igual forma la biotecnología toma fuerza no tanto por las capacidades del desarrollo tecnológico, sino que, todo este avance está más encaminado hacia el aprovechamiento de la misma para la satisfacción de la demanda de alimento como la leche, carne, huevo y derivados principalmente, potenciando la productividad (Urrego & Restrepo, 2006).

Cabe destacar que no siempre la biotecnología es favorable dentro de la nutrición o incluso de la producción, puesto que dentro de ella se debe contar con ciertas capacidades para poder entenderla y aplicarla, en todo caso no se vuelve favorable si se tiene desconocimiento de los beneficios de esta práctica (Uffo, 2011).

Sin ninguna duda la tecnología nos proporciona una serie de interrogante de alta diversidad con relación a lo biológico y con sus posibles modificaciones. En la que prácticamente la biotecnología crece con argumentos, que nos permite entenderla y aplicarla para el bien del desarrollo humano, sobre todo con su relación con la salud humana y la alimentación (Amaro & Morales, 2010)

Globalmente la biotecnología reproductiva en la ganadería tiene como objetivo ampliar dentro del mejoramiento y multiplicación de las razas de animales que expresen una alta calidad genética para su aprovechamiento, que permita tener productos y subproductos de un alto valor (Uffo, 2011).

2.3. IMPORTANCIA DE LA BIOTECNOLOGÍA EN MÉXICO.

México en la década de los años 70 forma parte de la relevancia de los procesos biotecnológicos que se imponen en su territorio para el desarrollo de la productividad de los hatos de ganado bovino, con técnicas de amplia simplicidad (IA y hormonas) en la que cabe mencionar quienes tenían la capacidad de hacer énfasis a estos temas amplios eran las instituciones gubernamentales y universidades de por medio, específicamente instituciones como él (INIFAP) Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (Rosete *et al.*, 2021).

El amplio desarrollo biotecnológico en el mundo es crucial para el favorecimiento de las grandes masas de población durante los últimos 10 años, y que no solo en México se han establecido si no en el mundo. Pues pertenecen a lo hoy en día llamado biotecnologías modernas bajo criterios políticos regulados por los países desarrollados y subdesarrollados logrado tener el máximo de su aprovechamiento, pues bajo los aspectos de crecimiento colabora con los beneficios de la sociedad que incluso se establecen políticas públicas para el desarrollo social (Amaro & Morales, 2010). Esa gran vocación ganadera que destaca a México, lo hace posicionarse en uno de los países con amplia actividad y capacidad frente a otros países en el mundo, pues una de las cuestiones más importantes dentro del territorio son sus regiones agroecológicas que le permiten establecer el ámbito ganadero y por ende tener una amplia variedad de razas bovinas especializadas en la producción de carne y leche (Parra *et al.*, 2011).

Hablando claramente del apoyo de la biotecnología en México es lo suficientemente amplio para que exista un buen desarrollo del mismo, pues existen diferentes áreas que aportan en el desarrollo de México. Específicamente con más énfasis a la industria, con dirección hacia tres grandes sectores como lo son el sector agroalimentario que se conforma del área del sector primario y de la alimentación;

la segunda es el sector sanitario o de salud y por último el del ambiente (Espinosa *et al.*, 2017)

Sin embargo, no solo son esos sectores en los que se puede aplicar la biotecnología en México, sino que existen muchísimos sectores en las que puede influir esta grandísima rama, de la cual cabe recalcar que estas tres son las más importantes para el desarrollo de la industria en México. En pocas palabras el sector primario nos permite realizar técnicas variadas para mejora de la agricultura, acuicultura, producción pecuaria, producción forestal y la alimentación, que esta última ha venido tomando valor significativo durante los últimos años. La biotecnología en el área sanitaria permite tener un desarrollo a terapias, diagnósticos y soluciones frente a la salud humana y animal. Por último, el ambiente que permite implementar soluciones que tengan efecto mínimo frente al medio ambiente para reducir los efectos adversos al mismo y por ende ayudar en su recuperación (Espinosa *et al.*, 2017).

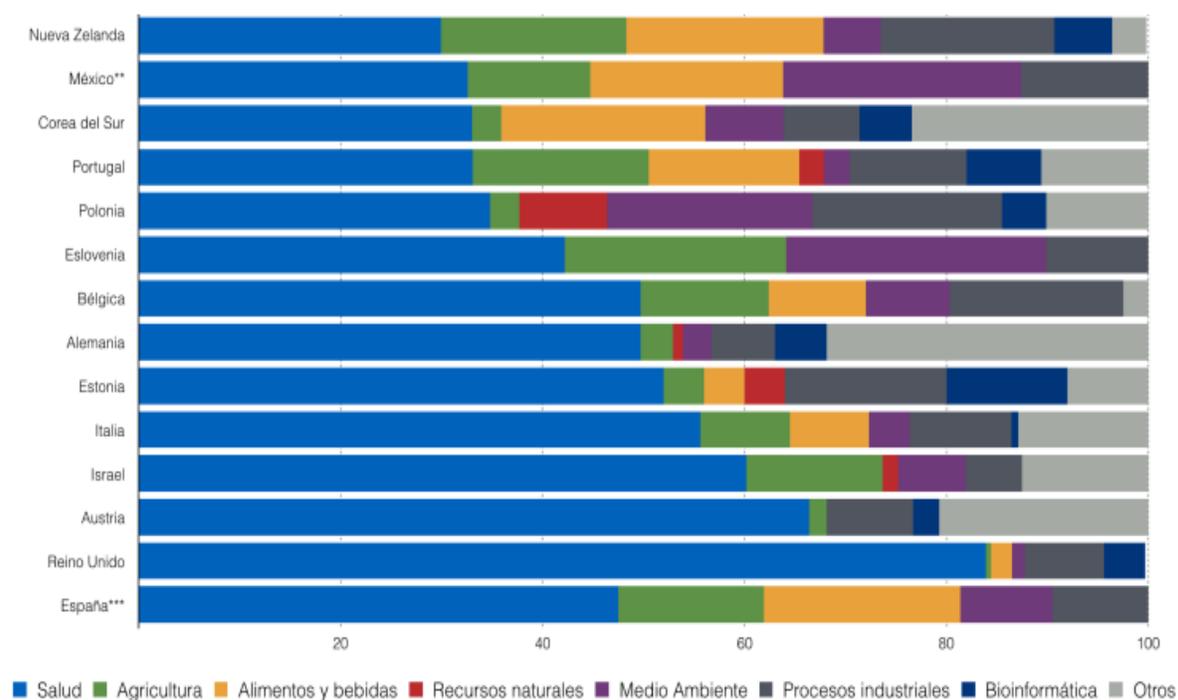


Figura 1. Proporción de la aplicación de la biotecnología por país. (Espinosa *et al.*, 2017).

2.4 FISIOLÓGÍA DEL CICLO ESTRAL Y GENERALIDADES ANATOMICAS DE LA HEMBRA BOVINA

En líneas generales los procesos reproductivos de los animales se ven constituidos por la esencia de su renovación biológica y específica de cada una de las especies. De las evidencias anteriores destacamos que los procesos reproductivos se ven regulados por el sistema endocrino y la otra por el ambiente que ira desarrollando al animal a través de cambios fisiológicos y conductuales (Gasque, 2016)

El ciclo estral varia ampliamente entre las especies. Se pueden clasificar en ovuladores inducidos, como son los gatos y conejos, cuya ovulación se ve inducida desencadenada por la copula, y los ovuladores espontáneos como las vacas, cerdos y caballos cuya ovulación es la que ocurre después del estro conductual. Este mismo nos permite entender la reproducción y la reproducción asistida (Fricquet & Wiltbank, 2022). Otro rasgo importante a considerar es la etapa de pubertad, siendo la característica a través de la cual los animales alcanzan la capacidad de reproducción (Filipiak *et al.*, 2016). Esto nos ayuda a comprender justamente que la vida reproductiva de las hembras se ve justamente desde los inicios de su vida hasta la preparación de su sistema reproductivo (Motta, Ramos, Gonzales, & Castro, 2011).

Naturalmente el estro es una condición en la que las hembras son receptivas al macho para el apareamiento, enseguida de la ovulación (Hasbi & Gustina, 2020). De la misma manera el ciclo estral es un patrón de actividad cíclico-ovárica de las hembras permitiéndoles pasar de un estadio de receptividad reproductiva a una no reproductiva (Etmewally *et al.*, 2021). De igual manera, en el trabajo de *Atuesta J. y Gonella D.* (2011) explican que el ciclo estral es definido como el periodo comprendido entre dos ciclos desde la aparición del estro hasta el comienzo del siguiente. Le Berré *et al.*, (2021) menciona que el ciclo estral es aquel periodo en que las hembras se vuelven altamente receptivas y en conclusión fértiles.

El ganado bovino tiene la característica de ser poliestricos, con ciclos estrales de un lapso de 21 días (promediando entre 17 a 24 días) (Colazo & Mapletoft, 2014) (Colazo, 2014)

En función a la idea anterior el ciclo estral está comprendido por fases, cuatro fases continuas para ser más exactos: proestro, estro, metaestro y diestro, en las que se observaran cambios significativos en la estructura ovárica y así mismo en las concentraciones hormonales que interactúan para que la hembra exprese un comportamiento singular y por ende cicle normalmente (Guaqueta, 2009). Lo que es más importante que todo este proceso se ve regulado hormonalmente, y las hormonas son sustancias secretas por células del organismo que efectúan una acción en otras células específicas o células blanco (Hernández, 2016). Aunado a la situación la secreción endógena de las hormonas tiene asociación directa con el comportamiento estral (Rottgen *et al.*, 2019).

Es necesario recalcar que la señalización hormonal del ciclo estral cumple un rol esencial durante la vida reproductiva de los mamíferos (Billhaq, Lee, & Lee, 2020)

2.4.1 Fases del ciclo estral.

En primer lugar, el proestro es aquel periodo anterior al estro, en el que se ve iniciado por la lisis de cuerpo lúteo lo que conlleva a una caída en la concentración de la hormona progesterona y en consecuente se lleva a cabo el crecimiento de un folículo preovulatorio, que da a un aumento en las concentraciones de estrógenos (Hasbi & Gustina, 2020).

En segundo lugar, el estro generalmente se caracteriza por la producción de un pico de la hormona LH y FSH (Guaqueta, 2009), con relación a la producción de estradiol siendo la hormona dominante (Atuesta & Gonella, 2011), que consecuentemente lleva a la expresión de signos del celo, además en seguida el proceso de ovulación (Atuesta & Gonella, 2011). En particular el celo es un comportamiento en el que la hembra esta lista para ser apareada o cercana a la ovulación (Zebari, Rutter, & Bleach, 2018).

Las altas concentraciones de estrógenos permiten dentro del estro a la hembra expresar ciertas características o signos como la vulva edematizada, secreción de moco vulvar, bramidos, disminución de apetito, quietud cuando otros animales la montan (Gasque, 2016). Además, colectivamente el proestro y el estro se les

conoce como fase folicular del ciclo estral (Atuesta & Gonella, 2011). En seguida en metaestro es periodo el que existe una serie de procesos endocrinos que a su vez conllevan a el control de la dinámica del ovario durante ese proceso de tiempo (Guaqueta, 2009) en el cual se forma el cuerpo lúteo con los restos del folículo ovulado (Atuesta & Gonella, 2011). Por último, el diestro, con la presencia del cuerpo lúteo y el aumento de la progesterona junto con la producción de esteroides con relación al crecimiento del cuerpo lúteo (Hasbi & Gustina, 2020). Siendo estos dos últimos en conjunto llamados como la fase lútea del ciclo estral (Atuesta & Gonella, 2011).

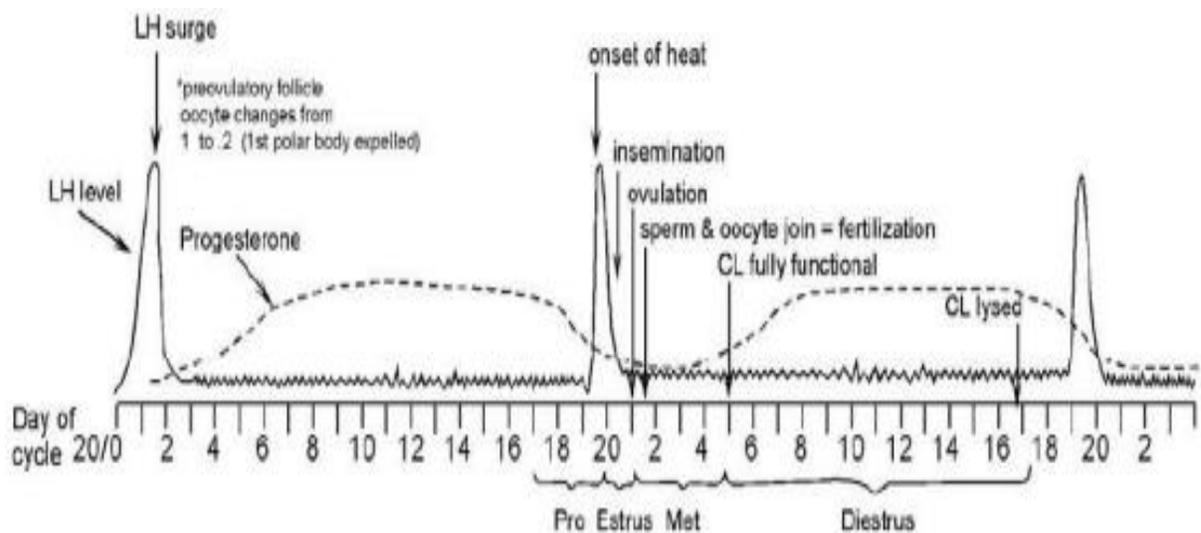


Figura 2. Fases del ciclo estral. (Hasbi & Gustina, 2020)

Es necesario recalcar que el estudio del aparato reproductor de la hembra es importante, ya que en el suceden procesos fisiológicos, metabólicos y hormonales importantes para la reproducción de la hembra (Sequeira, 2013).

Es evidente que el aparato reproductor de la hembra bovina está formado por estructuras que se organizan y se distribuyen de forma anatómicamente. Así mismo estas estructuras están compuestas por tejidos de características flexibles, esto les permite tener cambios drásticos en el tamaño y la posición de los mismos (Lennis *et al.*, 2021)

La distribución de estas estructuras nos permite conocer no tan solo la anatomía, sino también su actividad fisiológica que tienen estos mismos y de cómo es que funcionan (Lennis *et al.*, 2021). De esta forma se aborda el tracto reproductor iniciando de la vulva hasta los ovarios:

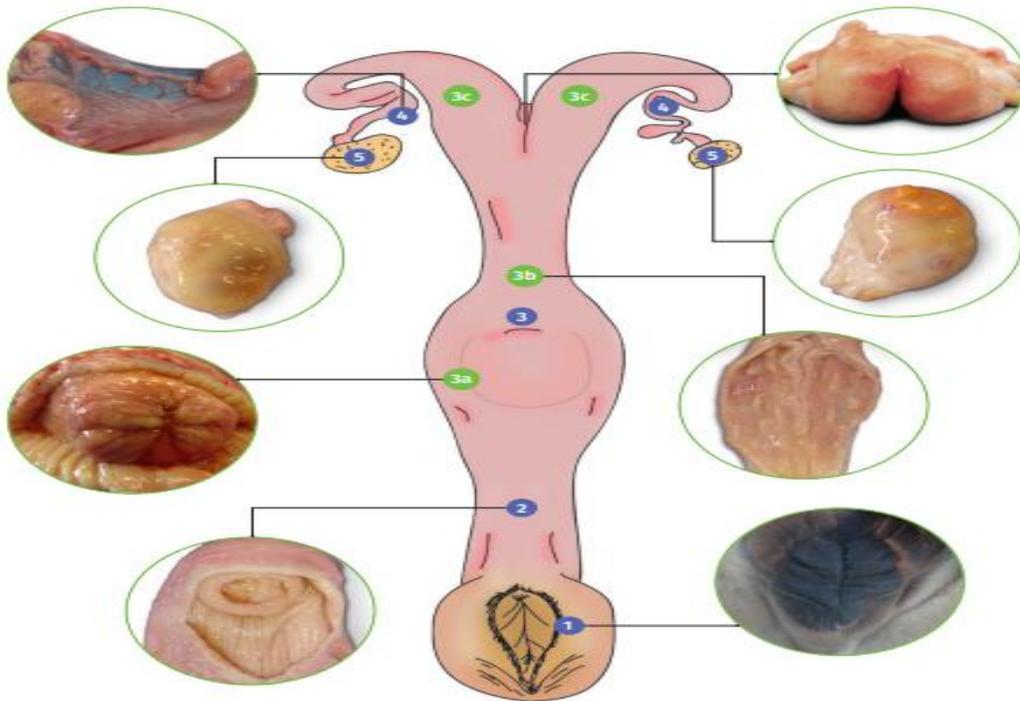


Figura 3. Localización de las estructuras del aparato reproductor de la hembra bovina. (Lennis *et al.*, 2021)

2.4.2 Vulva

La vulva es un tejido o conjunto de pliegues cutáneos, estos mismos son conocidos como labios vulvares que tienen como función la protección del exterior de las otras estructuras internas como por ejemplo la vagina, así mismo que la identificación por parte del macho para el estímulo antes de la monta (Lennis *et al.*, 2021). Generalmente la vulva es ubicada verticalmente, siendo lisa en su totalidad con presencia pequeño pelos llegando a formar una protuberancia de estos mismo en la comisura ventral (Sequeira, 2013).

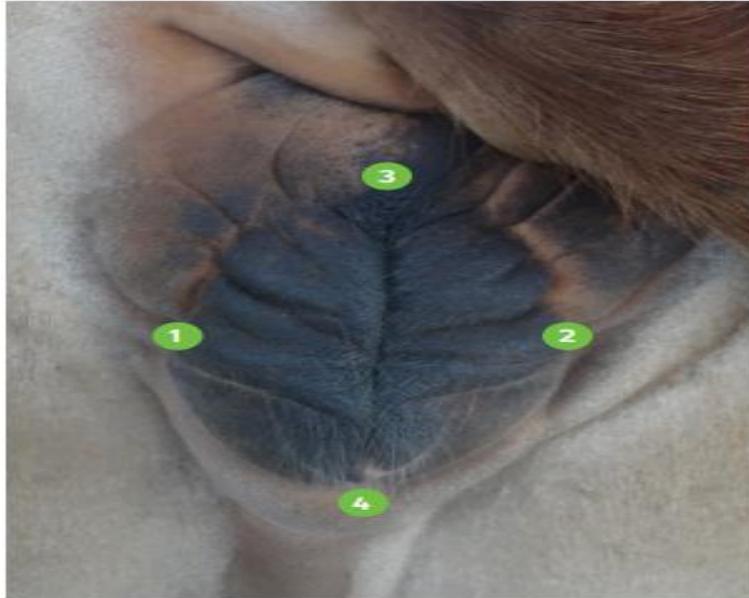


Figura 4. Vulva (1) labio vulvar izquierdo, (2) labio vulvar derecho, (3) comisura dorsal, (4) comisura ventral (Lennis *et al.*, 2021).

2.4.3 Vagina

Es una estructura de tipo tubular con características fibroelásticas, pues permite tener la suficiente capacidad de distensión por parte de sus pliegues longitudinales internos. La vagina es el lugar donde se deposita el semen en la monta natural y propicia el paso de los espermatozoides hacia el canal cervical (Lennis *et al.*, 2021)

2.4.4 Útero

Este segmento o estructura está formado por tres secciones: cuello o cérvix, cuerpo y cuernos. El cérvix o cuello corresponde a la parte más caudal del útero, este conecta el útero con la vagina a través del canal cervical, tiene una longitud de 6 a 18 cm. Este mismo presenta una consistencia firme a la palpación debido a que presenta cuatro anillos cartilagosos circulares mejor conocidos como anillos cervicales. Por otra parte, el cuerpo del útero es una estructura de corta longitud llegando a medir solamente de 1 a 5 cm, el cual conecta al cérvix con los cuernos uterinos. Por último, los cuernos uterinos que son estructuras de buen tamaño y bien definidos. Estos tienen como función de recibir, implantado y desarrollo del embrión hasta el momento del parto (Lennis *et al.*, 2021)

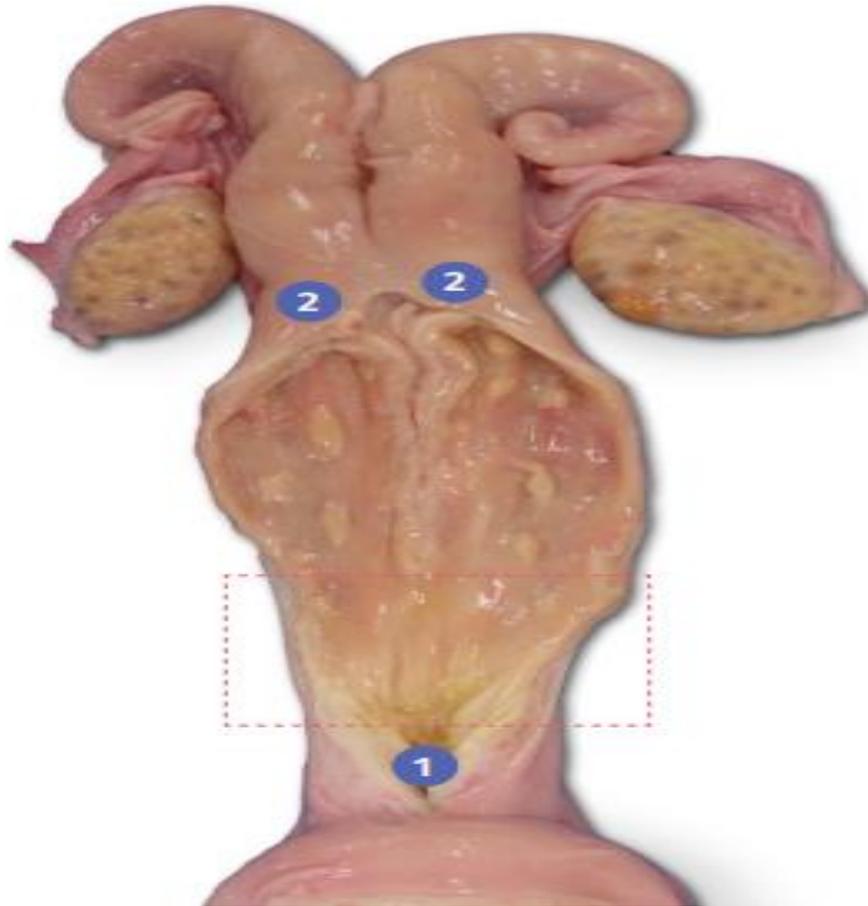


Figura 5. Cuerpo del útero (recuadro rojo), (1) cérvix o cuello uterino. (2) cuernos uterinos. (Lennis et al., 2021)

2.4.5 Oviducto

Este mismo también conocido como trompa uterina son estructuras tubulares que se encuentran entre los cuernos uterinos y los ovarios, estos tienen un recorrido tortuoso dividiéndose en tres segmentos simples de los cuales consta de infundíbulo, ampolla e istmo. La función del oviducto es la de atrapar, transportar y dar el encuentro entre los gametos femeninos (ovocito) y masculino (espermatozoide) (Lennis *et al.*, 2021).

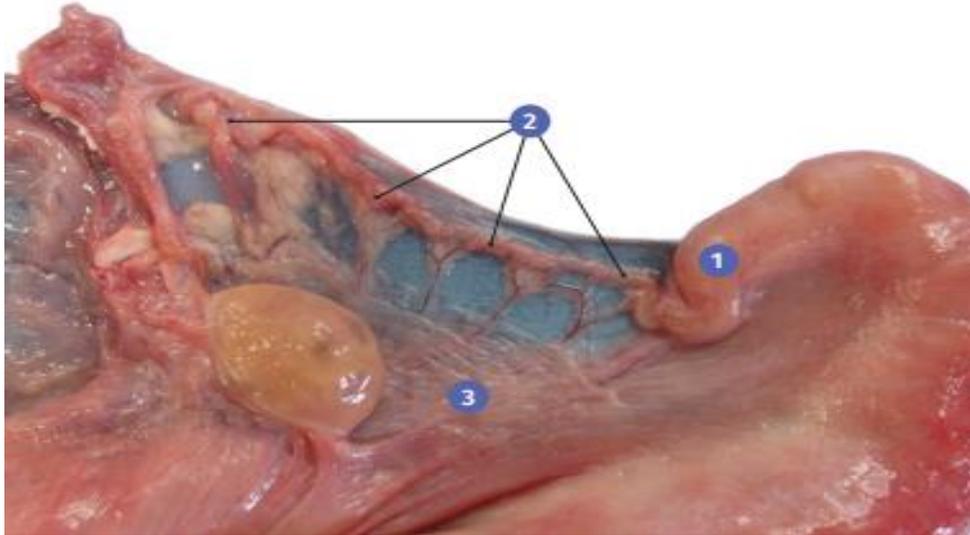


Figura 6. (1) cuerno uterino, (2) oviducto y (3) ligamento mesosalpinx. (Lennis *et al.*, 2021)

2.4.6 Ovarios

Mayormente los ovarios son estructuras en forma ovoide, y con el tiempo y edad del animal sufren cambios entonces llegan a ser irregulares. El tamaño es variable por factores tanto de la edad, etapa reproductiva y número de paros, estos mismo llegan a tener una longitud que va desde los 1 a 10cm (Lennis *et al.*, 2021). En los ovarios podemos encontrar otras estructuras como lo son folículos, cuerpo lúteo, el cual es una glándula transitoria que nos producirá progesterona, esta misma estructura se forma a partir de las células posteriores a la ovulación, teca y granulosa (Arechiga *et al.*, 2019). Las características y situación de los ovarios se ven reflejadas bajo la edad, raza, estado físico y hormonal, e incluso el número de partos (Sequeira, 2013).

Esta estructura tiene funciones importantes dentro de la fisiología reproductiva de la hembra bovina pues tiene como finalidad la producción de ovocitos (gametos) y de la producción de hormonas. Las principales hormonas secretadas o producidas por el ovario son los estrógenos, progesterona, andrógenos y relaxina (Motta, Ramos, Gonzales, & Castro, 2011).

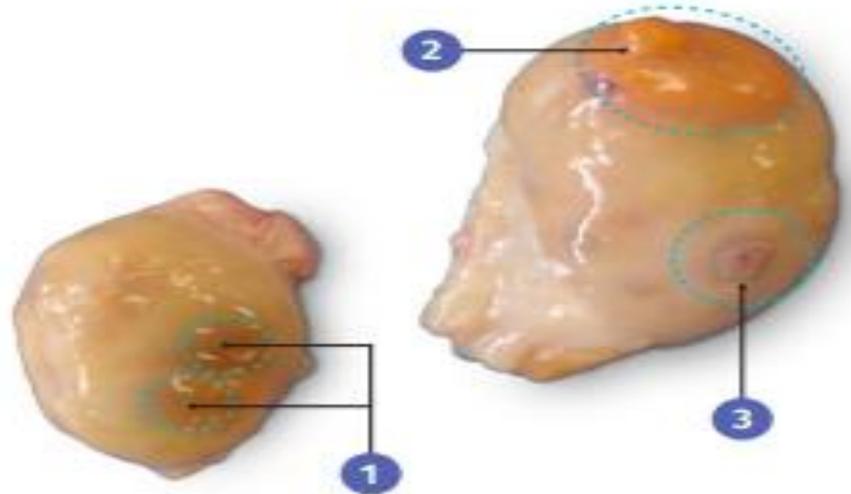


Figura 7. Ovario izquierdo con presencia de folículos (1) y ovario derecho con presencia de cuerpo lúteo (2) y cuerpo albicans (3) (Lennis *et al.*, 2021).

2.5 COMPLEJO CUMULUS-OVOCITO

En definición el complejo cumulus-ovocito es justamente un acoplamiento de células cumulares generando proyección en la zona pelúcida, fijando y rodeando al ovocito (Martínez Serrano *et al.*, 2023). Mientras que Turathum B *et al.* (2021) menciona que este complejo no es más que células somáticas (Células del cumulus) que rodean al ovocito, desempeñando funciones importantes como crecimiento del mismo, maduración, ovulación y fecundación.

Haciendo énfasis a lo ya mencionado el complejo inicia sobre todo con cada folículo primordial en el cual se sabe que dentro del existe un ovocito y una mínima capa de células de la granulosa (GCs2), y estas mismas estructuras cambian conforme al desarrollo del folículo (Xie, Xu, & Liu, 2023). Que a su vez el aumento del tamaño de ovocito y de un cambio de tamaño exponencial de las células de la granulosa, llegando a formar células columnares estratificadas. Siendo así la formación de células del cumulus (CC) y de células murales de la granulosa (Xie, Xu, & Liu, 2023).

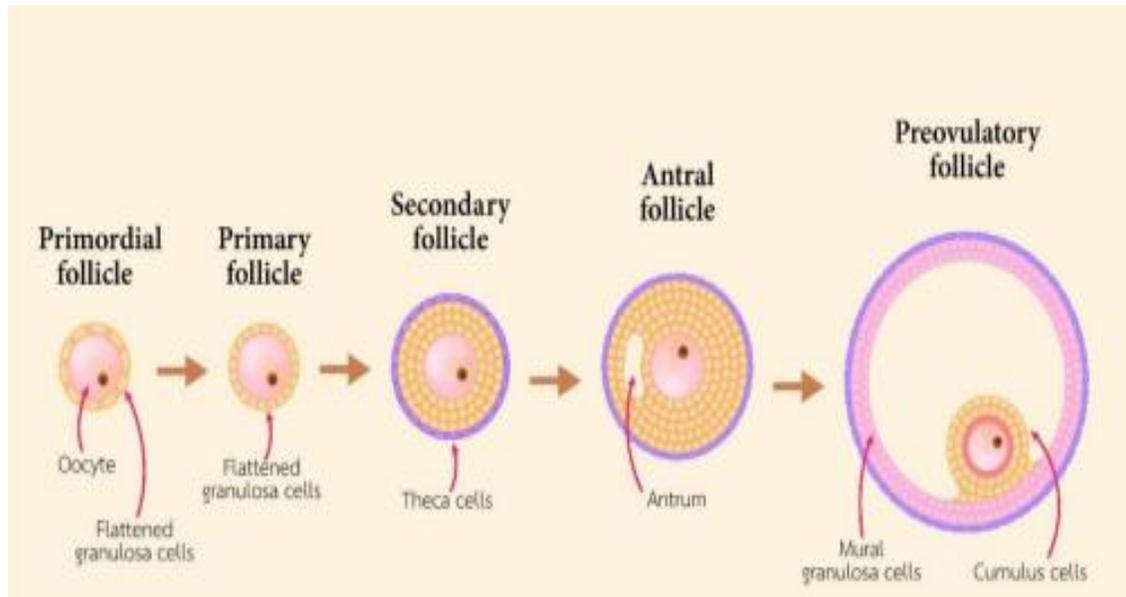


Figura 8. Diagrama del desarrollo folicular (Turathum et al., 2021).

Es primordial saber que la comunicación entre las CC y el ovocito debe ser de forma natural a través de una transmisión directa. Así mismo el contacto directo de las CCs y el gameto permiten la reanudación de la meiosis y del proceso metabólico (Marchais *et al.*, 2022). En pocas palabras las células del cumulus y el ovocito son metabólicamente codependientes (Martínez Serrano *et al.*, 2023).

La comunicación intercelular es fundamental en la mayoría de las células que hacen presencia en el COC's, puesto que esto se ve desarrollado a través de estructuras de conexión (Xie, Xu, & Liu, 2023).

Dentro de esta comunicación existen estructuras morfológicas que permiten llevar a cabo dicha comunicación, siendo estructuras propias o que se encuentran integradas a las células del COC's. A lo anterior expuesto se encuentran estructuras como las son las encargadas de la comunicación intercelular, como la son las proyecciones trazonales (TZP's), Uniones de huecos (Gjs), Microvellosidades, vesículas extracelulares (EV's), y fusión de membranas celulares (Xie, Xu, & Liu, 2023).

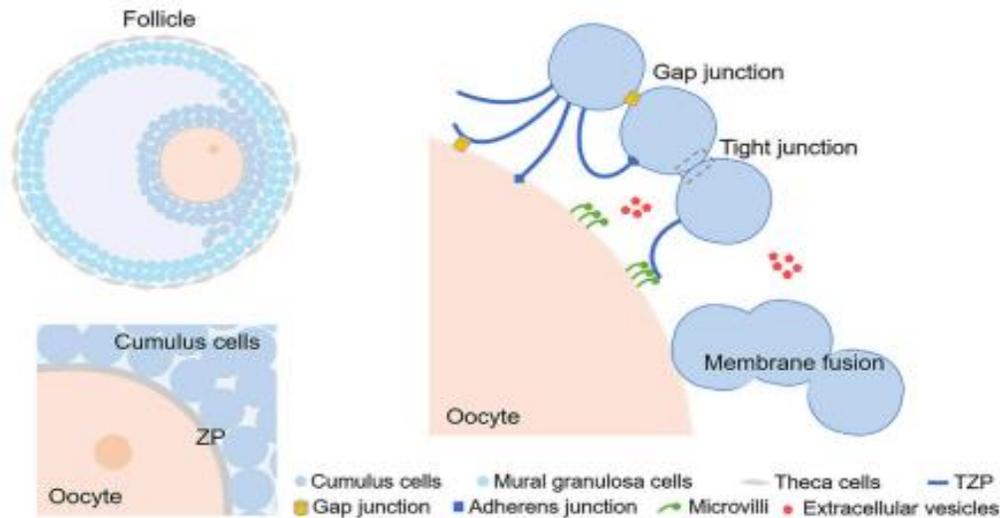


Figura 9. Comunicación intercelular del complejo cumulus-ovocito (Xie, Xu, & Liu, 2023)

Figura 9. Diagrama de estructuras morfológicas en la comunicación intercelular en el complejo cumulus-ovocito. Tomada de (Xie, Xu, & Liu, 2023)

En primer lugar, encontramos a las proyecciones trazonales (TZP) estas son largas proyecciones que sobresalen del citoplasma de las células cumulares (CC) atravesando la zona pelúcida permitiendo adherencia a la membrana plasmática del ovocito (Marchais *et al.*, 2022). En segundo lugar, están las uniones de huecos o uniones gap (Gjs) estas participan en comunicación de diferentes células, a través de pequeños componentes que son las conexinas (CX), siendo la CX43 y la CX37 las dos más importantes. De igual manera las CX43 se encargan de la comunicación entre CC y CC, mientras que la CX37 permite la comunicación entre CC y ovocito (Xie, Xu, & Liu, 2023). Así mismo se cuenta con microvellosidades estas permiten una acción de conectividad y de comunicación con células cercanas e inclusive la de fusionarse con otros gametos (Xie, Xu, & Liu, 2023). Posteriormente están las vesículas extracelulares, presencia de este tipo de vesículas permite que se presente un proceso llamado expansión de las células del cumulus (CC) al momento de la ovulación. De la misma manera proporcionan protección al complejo cumulus-ovocito (COC's) de efectos de estrés por choque térmico (Marchais *et al.*, 2022).

Las CCs cumplen funciones importantes en el complejo cumulus-ovocito, de las cuales observaremos funciones importantes en la calidad, protección, crecimiento y desarrollo del ovocito (Martínez Serrano *et al.*, 2023)

2.5.1 Rol de las CCs en la calidad del ovocito.

La calidad del ovocito es una determinante importante dentro de la fertilidad. Permitiendo así que las células del cumulus influyan en la competencia ovocitaria y generando protección al ovocito de condiciones peligrosas dentro del manejo de la fertilidad (Martínez Serrano *et al.*, 2023).

2.5.2 Rol de las CCs en la protección del ovocito.

Es evidenciado que el ovocito tiene la capacidad de producción de sustancias de especies reactivas de oxígeno (ROS), de las cuales son esenciales para el desarrollo del mismo. Mas sin embargo estas sustancias tienden a reaccionar frente a otras moléculas como son los ácidos nucleicos y lípidos, llegando a generar estrés oxidativo y por ende un daño celular afectando la calidad y viabilidad del ovocito. Mientras tanto las CCs cuentan con esa capacidad, la de producir antioxidantes responsables contra el estrés oxidativo de los ovocitos. Siendo así el tripéptido glutatión el antioxidante primordial producido por las CCs (Martínez Serrano *et al.*, 2023).

2.5.3 Rol de las CCs en crecimiento y desarrollo del ovocito.

Además de formar parte de la calidad y protección las CCs también cumplen demasiado en el crecimiento y desarrollo del ovocito, este desarrollo se nota a través del aprovechamiento de nutrientes y metabolitos esenciales. Principalmente la glucosa es uno de estos, ya que con ella las CCs generan ATP que permite una buena maduración meiótica de los ovocitos (Martínez Serrano *et al.*, 2023).

2.6 CLASIFICACIÓN DE LOS OVOCITOS.

En cuanto al mejoramiento genético del ganado, es indispensable saber que es un motor indispensable no solo en la genética sino también en la sostenibilidad de la agricultura animal. Permitiendo así una intensificación en la producción mundial y

en la reducción en el intervalo generacional, siendo este el punto más importante dentro del mejoramiento genético (Tinoco, Carrera, & Capa Mora, 2024).

El mejoramiento genético es influenciado a través de diferentes prácticas que se garantizan la selección genética y esquemas genéticos más complejos. Una de las practicas dentro de este ámbito es la producción de embriones *in vitro* (Mejía *et al.*, 2022). En pocas palabras, la producción de embriones *in vitro* ha crecido crucialmente durante los últimos tiempos (Tinoco, Carrera, & Capa Mora, 2024).

La producción de embriones se desarrolla para la producción crías de animales de alto valor genético (Quispe *et al.*, 2018).

Sierra (2011). Menciona que la producción de embriones *in vitro* se ve con alta codependencia en la competencia ovocitaria, en la que se necesitan cambios morfológicos, transcripción citoplasmática y compartimiento nuclear del ovocito.

Con respecto a lo anterior el paso más importante en la producción de embriones *in vitro* es bajo un factor de selección de calidad de los ovocitos que permutan someterse a un proceso de maduración nuclear y citoplasmática similar al que es dentro del folículo (Aiman , Ramzi, Muath, & Ahmad, 2022). Así mismo sumado a esto una determinante importante es la variabilidad de los animales de donde se obtiene los ovocitos (Duma *et al.*, 2019).

Se sabe que este tipo de biotecnologías son óptimas hoy en día, más sin en cambio sigue presentando deficiencias ya que el 20-40% de los ovocitos recuperados llegan realmente a ser blastocitos (Duma *et al.*, 2019).

Por otra parte, la recolección de ovocitos permite aprovechar aquellos folículos que no ovularon y que por ende se puedan utilizar dentro de la producción *in vitro* (PIV), con condiciones filológicas similares a la del folículo, con el objetivo de aprovechar el potencial genético del animal (Fernandez, Hernandez, & Reyes, 2010).

Es importante aclarar que los ovocitos necesitan de medios óptimos para su desarrollo, teniendo en cuenta que los medios en los cuales se desarrollan se vienen utilizando desde hace 30 años (Tinoco, Carrera, & Capa Mora, 2024).

A su vez la calidad de los ovocitos se basa en una evaluación morfológica de tipo visual en la que se determina el número de capas de células del cumulus, homogeneidad citoplasmática y conformidad de la zona pelúcida, no obstante, este tipo de cuestionamientos no ha permitido seleccionar ovocitos más competentes (Duma *et al.*, 2019).

Está claro que este tipo de evaluación no causa problemas al ovocito, ya que esta se puede realizar sin daño al desarrollo inicial del ovocito al igual que al embrionario. Las características morfológicas de las células del cumulus tienen una idea subjetiva para determinar la calidad del ovocito (Ozturk, 2020).

Dentro del folículo existen numerosas células somáticas que rodean al ovocito, estas permiten una comunicación continua y progresiva con el mismo permitiéndole desarrollarse y madurar. Un indicativo morfológico importante son las células del cumulus para saber la capacidad de desarrollo y maduración del ovocito (Mejía *et al.*, 2022)

Se han optado por varias clasificaciones morfológicas con el objetivo de identificar ovocitos de mayor calidad y viabilidad. Una de ellas es la comparación en la que se separan bajo escalas de valores del 1 al 4, en la que considera las células de cumulus, citoplasma y zona pelúcida del ovocito (Leinfried y First, 1979).

Hay diferentes criterios de evaluación, pero la mayoría sigue un patrón idéntico de evaluación estructural del ovocito de cada categoría. (I) CC de grado 1, intactas, compactas, multicapas y con homogeneidad del citoplasma; (II) CC de grado 2, intactas, compactas y multicapa con citoplasma no homogéneo, así mismo CC incompletos (> 3 capas) compactos con citoplasma homogéneo o no homogéneo; (III) CC grado 3, incompletos (> 2 capas) compactos con citoplasma homogéneo o no homogéneo, de igual manera con CC parcialmente desnudos compactos con citoplasma homogéneo o no homogéneo; (IV) CC grado 4, completamente o parcialmente desnudos con citoplasma no homogéneo, además de CC expandidas con citoplasma no homogéneo (Choi *et al.*, 2013)

Grado 1: presencia de CCs compactas con más de 4 capas células cumulares, citoplasma con graduaciones finas y homogéneas, una zona pelúcida marrón y completa. Grado 2: Presencia de CCs parcialmente compactas con menos de 3 capas de células cumulares, citoplasma con graduaciones distribuidas, pudiendo estas distribuidas en el centro o en la periferia, zona pelúcida semicompleta y poco descolorida. Grado 3: presencia de CCs, pero expandidas no es su totalidad. Citoplasma contraído con pequeños espacios en la membrana y zona pelúcida degradada y fragmentado. Grado 4: ovocito desnudo sin células cumulares (Gonella *et al.*, 2013).

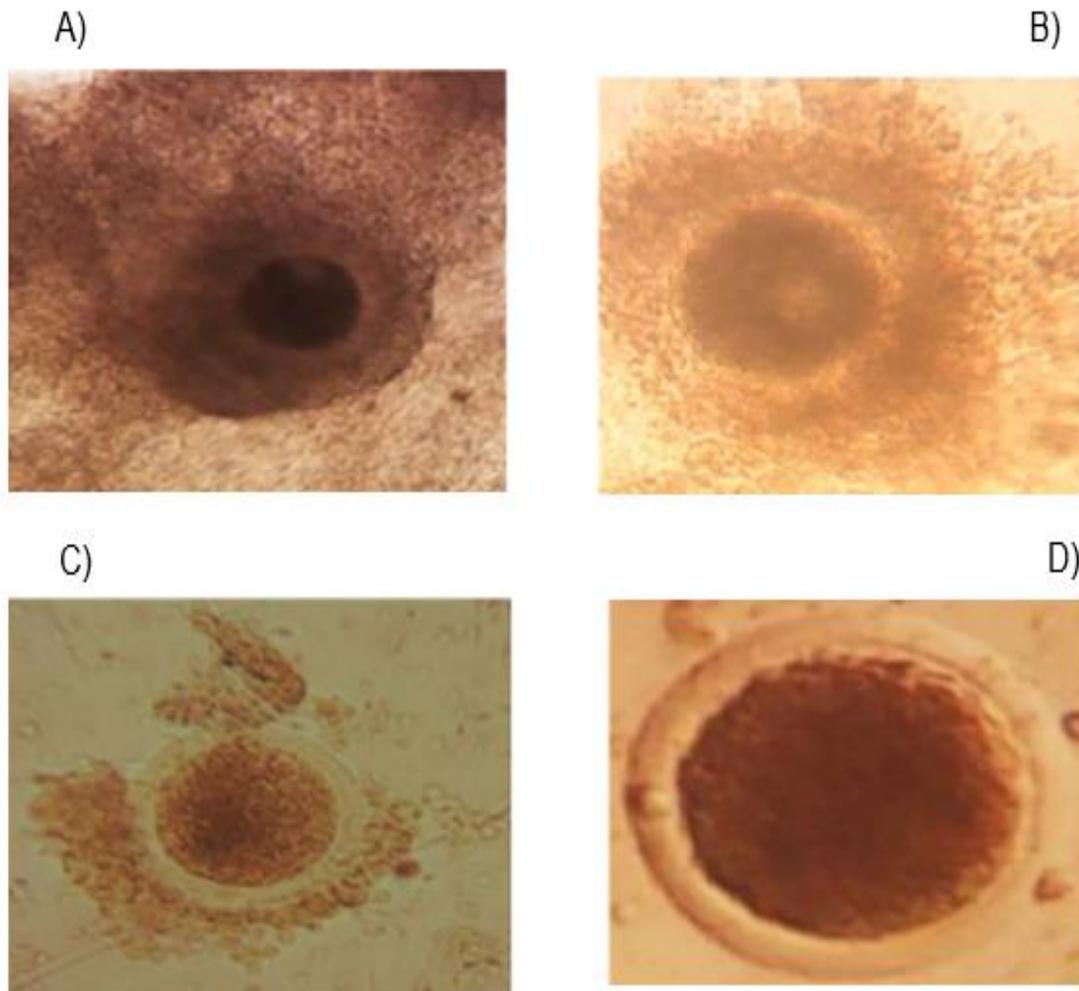


Figura 10. Categorías morfológicas: A= Categoría 1, B=Categoría 2, C= Categoría 3 y D=Categoría 4 (Kouamo *et al.*, 2019).

2.7 ESTRUCTURA DE LA CROMATINA

Generalmente las células eucariotas o somáticas tienden a presentar cargas genéticas similares, una de las diferenciaciones celulares son las proteínas que dan esta diferenciación fenotípica (Cavagnari, 2012). Una de las estructuras evidentes en la célula, es el núcleo, en este se encuentra la mayor parte del DNA y su función es darle integridad al material genético (Rojas & Milán , 2016).

Así mismo en las células eucariotas la cromatina es formada por el mismo DNA y proteínas adyacentes que van compactando las grandes cantidades de material genético (Orrego, Ponte , & Suau, 2015).

Existen diferentes definiciones sobre la cromática, sin en cambio la mayoría tiene similitud o están encaminadas a definición similar. Cavagnari., (2012), menciona que es una estructura formada por complejos, en este caso el DNA y proteínas denominadas histonas que le dan estabilidad y lo acoplan dando como resultado un nucleosoma, el cual que se forma por la unión de 8 histonas o bien así un octámero de histonas

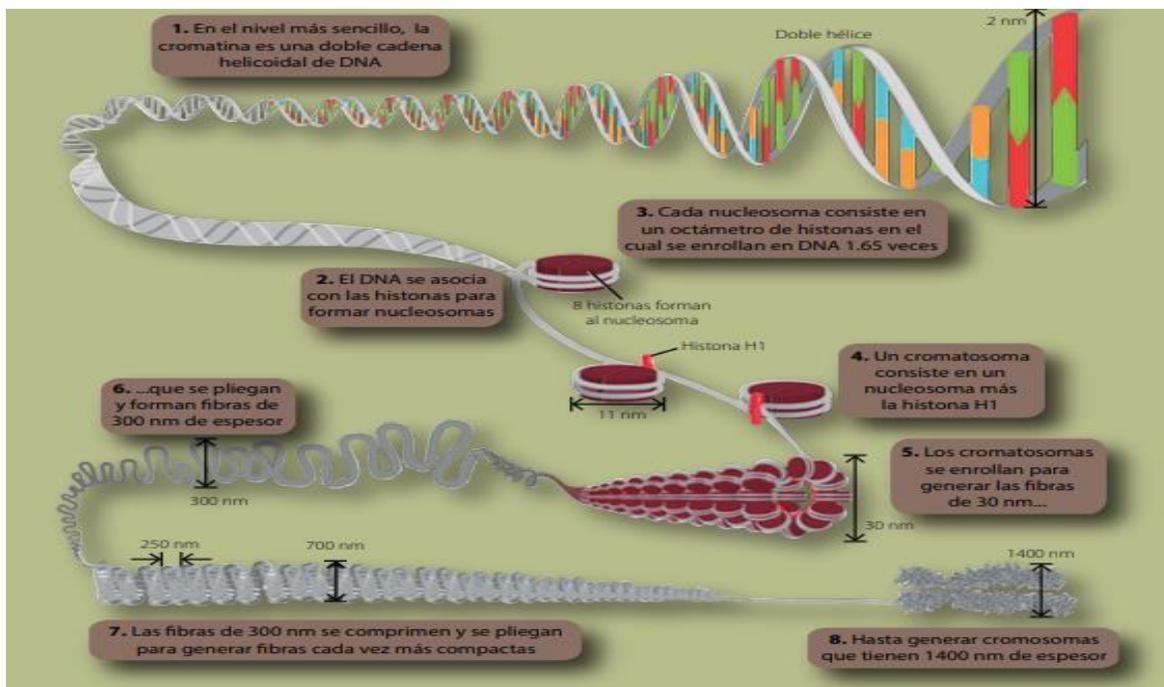


Figura 11. Compactación de la cromatina desde la doble hélice hasta el cromosoma metafásico. (Rojas L. y Milán C., 2016)

Dentro del núcleo de la célula, la cromatina se encuentra en formas o grados de compactación distintas: si la cromatina se encuentra en forma laxa se denomina eucromatina, mientras que la cromatina compacta suele denominarse heterocromática (Rojas & Milán , 2016). De igual manera la cromatina se liga principalmente a procesos de dinámica estructural que permiten llevar a cabo la replicación, transcripción y relación de la expresión genética (Orrego, Ponte , & Suau, 2015).

Como se ha mencionado, la producción eficiente de embriones bajo ovocitos en maduración *in vitro* (IVM) es necesario tener en cuenta que deben ser de alta calidad y el de tenerles en condiciones óptimas para la producción de estos en forma *in vitro*. Estudios mencionan que la calidad de los ovocitos inmaduros son determinantes importantes para la calidad de los ovocitos maduros, en la que son proporcionales (Lee *et al.*, 2019)

Una de las capacidades de desarrollo del ovocito se ve en gran medida dentro de la diferenciación nuclear, que a su vez se ve reflejado en su mayoría dentro del grado de compactación de la cromatina (Silva *et al.*, 2020).

Agregando a lo anterior la maduración de los ovocitos es una proceso crucial y complejo en el cual contribuyen factores citoplasmáticos y nucleares. De la misma manera el ovocito debe de transitar de un estado de crecimiento al proceso de maduración ya antes mencionado, pues característicamente esto se ve con la presencia o el estancamiento en la profase I de la meiosis en el núcleo del ovocito, a la cual se le denomina vesícula germinal (GV). (Salimov *et al.*, 2023). El ovocito entra en meiosis en la etapa de desarrollo fetal y se mantienen inertes en profase I hasta la pubertad. Posterior a la pubertad, el ovocito entra en una reanudación meiótica por la participación de la hormona luteinizante (LH) que reactiva la meiosis. El principal signo de la reanudación meiótica es la ruptura de la vesícula germinal (GVBD), dando lugar a siguientes procesos (Zhang *et al.*, 2019). Posteriormente le ovocito entra en la fase de metafase I (MI) que es la emisión del primer cuerpo polar (PB1) y la metafase II (MII) que viene acompañada de la liberación del segundo cuerpo polar (Salimov *et al.*, 2023).

La cromatina es accesible y dinámica ya que su accesibilidad es importante para la transcripción y desarrollo embrionario (Ming *et al.*, 2021). A esto mismo se sabe que la gametogénesis y el desarrollo celular temprano en los mamíferos se ve especialmente por la reorganización de la cromatina (Du *et al.*, 2020). Los ovocitos en GV mayormente se separan en dos tipos de configuración de la cromatina: (I) nucleolo rodeado (SN) en la que se forma un anillo alrededor del nucleolo; y (II) nucleolo no rodeado (NSN) la cromatina se encuentra dispersa por el nucleolo (Lee *et al.*, 2019). Otra de las formas de clasificación de la cromatina es bajo su forma de condensación, los ovocitos en GV se condensa gradualmente dando clasificatoria de GV0, GV1, GV2 y GV3. Bajo estas cuestiones se sabe que los ovocitos con GV0 se encuentran en crecimiento, sin cromatina condensada y no pueden realizar meiosis II, mientras que los ovocitos con GV1-GV3 están totalmente desarrollados, con grados crecientes de la cromatina y son capaces de ser fertilizados (Silva *et al.*, 2020).

2.8. TINCIONES MAS UTILIZADAS EN OVOCITOS

2.8.1 AZUL DE TRIPAN

Ciertas investigaciones con relación a los complejos cumulus-ovocito (COC) solamente el 54% son fecundados con éxito a través de técnicas de fertilización *in vitro* (FIV). Asimismo, se cuestiona justamente la utilización de tinciones que permitan evaluar la viabilidad de las células para poder realizar técnicas como la FIV y se vuelvan más eficientes (Filipiak y Larocca., 2012)

El azul de tripán (AT) es una tinción de características supervitales, que ha permitido evaluar la viabilidad de las células (Filipiak y Larocca., 2012). De la misma manera el AT es utilizado no solo para la evaluación de células si no dentro de la histología médica para evaluar células muertas, en la viabilidad de levaduras y en tinción de hongos principalmente (Santana et al., 2023). Mas sin en cambio a pesar de ser una de las tinciones de mayor uso sobre todo en esas técnicas no existe respaldo total en la aplicación en el área de reproducción bovina (Filipiak y Larocca., 2012).

Es importante saber que este tipo de tinciones son realmente perjudiciales para la salud humana llegando a generar efectos teratógenos, cancerígenos y muta

génicos (Santana et al., 2023). Todo esto pospuesto por la Agencia Internacional para Investigaciones sobre el Cáncer (Rodríguez *et al.*, 2015).

El uso del azul de tripán, se ha venido implementado como medio para la evaluación de la viabilidad y competencia de desarrollo de los ovocitos, sin llegar a causarle efectos negativos en la salud del mismo y de sus células en conjunto. A su vez esto tiene como finalidad de seleccionar los ovocitos viables (vivos), ya que los no viables (muertos) tienden a absorber el tinte y se tiñen de un color azul (Quezada *et al.*, 2018).

(Caraba, 2023). Menciona que el azul de tripán es una técnica utilizada para cuantificar las células vivas mediante el etiquetado exclusivo de las células muertas. Debido a que en las células vivas existe una membrana sana que no permite la entrada del azul de tripano, permaneciendo incoloros, mientras que en las células muertas el azul de tripano penetra la membrana porosa de la célula tiñendo el citoplasma, dando como resultado el típico color azul.

2.8.2 AZUL BRILLANTE DE CRECILIO

Una de las practicas actuales dentro de las tecnologías embrionarias, es la producción *in vitro* de embriones en bovinos, llegando a ser esencial para llegar a general animales de alto valor genético. Esto consta de 4 etapas importantes: (1) maduración *in vitro*; (2) capacitación espermática; (3) fecundación *in vitro* y (4) cultivo *in vitro* de embriones (Quezada *et al.*, 2018).

Justamente esto nos conlleva a tener en cuenta que la calidad de los ovocitos es un factor principal para llegar a la etapa de blastocisto, así que se deben de seleccionar los de alta calidad (Maia *et al.*, 2017).

Ciertos criterios de calidad permiten tener mayor precisión en el número de ovocitos y de los más competentes. Una de las características o criterios de evaluación de la calidad de ovocitos en la actualidad es a través de su morfología, que incluye principalmente en la granulación de citoplasma y el número de capas de células del cumulus (Murin *et al.*, 2019). Sin embargo estos criterios de evaluación mayormente

son de forma cualitativa y se dificulta seleccionar a los ovocitos más competentes (Neira *et al.*, 2023).

En la actualidad se han implementado métodos bioquímicos de marcaje que permiten tener una tasa alta de recuperación de calidad de ovocitos (Murin *et al.*, 2019). Uno de ellos es el azul brillante de crecilio (BCB) el cual es un medio no invasivo que permite seleccionar ovocitos más homogéneos y competentes, bajo la reacción de una enzima denominada glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), esta misma sintetizada por el ovocito en crecimiento y ausente en los ovocitos que terminaron esta misma fase (Quezada *et al.*, 2018). Esta misma enzima forma parte de la vía de las pentosas fosfato (Bittner *et al.*, 2023). Dentro del metabolismo de la glucosa dando NADPH y ribosomas para el crecimiento celular (Otero *et al.*, 2017). Siendo la G6PDH un promotor de importantes antioxidantes, como el glutatión (GHS) que ayudan en el desarrollo del ovocito (Bittner *et al.*, 2023). Por lo tanto, la enzima G6PDH se presenta con mayor actividad en ovocitos en crecimiento que en aquellos que ya concluyeron su crecimiento final (Otero *et al.*, 2017). Con relación a lo anterior los ovocitos que terminaron su fase de crecimiento son color azul (BCB+) y los ovocitos que siguen en crecimiento permanecen incoloros (BCB-) por la disminución de la enzima (Neira *et al.*, 2023).

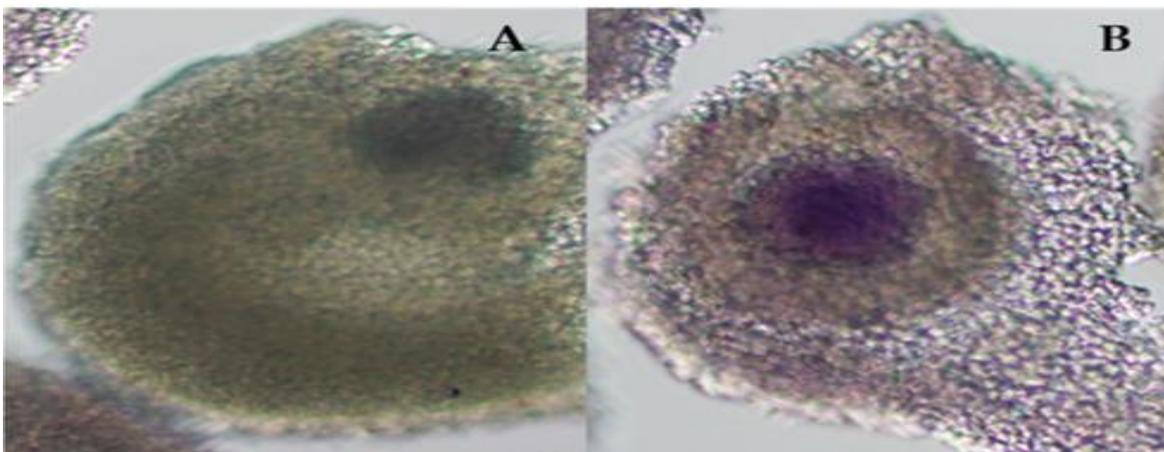


Figura 12. Ovocitos teñidos con azul brillante de crecilio (BCB), A: ovocitos negativos (BCB-), B: ovocitos positivos (BCB+) (Bittner *et al.*, 2023)

2.8.3 TINCIÓN ACETO-ORCEÍNA

Las técnicas de tinción se han venido consolidando durante mucho tiempo permitiendo llegar a conocer ciertas estructuras que a simple vista no son apreciables, evidentemente con apoyo de tecnologías y materiales de laboratorio que permiten hacer este tipo de prácticas más confortables al momento de trabajar con productos biológicos. Una de las tinciones específicas es la orceína, esta es producto de líquenes, principalmente extraída de la orchilla o urchill (del latín *auricilla*, orejita) de la *Roccella tinctoria*. Utilizada comúnmente para la producción de tornasol y técnicas histológicas para teñir neuronas, neuroglías y elastina. Así mismo se le adjudican usos dentro de estudios de biopsias hepáticas, sobre todo en casos de hepatitis B. Así mismo dentro de la cito génica animal y vegetal, al evaluar los cromosomas y estudiar el cariotipo: número, forma, defectos y deformidades de los mismo, al ser fijados y coloreados con la técnica de aceto-orceína, ya que esta tiene afinidad por adherirse a las histonas que sostienen al DNA (Barcat, 2003)

La reproducción asistida es una herramienta esencial y primordial en estudiar la maduración ovocitaria, producción temprana de embriones y el amplio medio de investigaciones en animales (Nguyen & Binh, 2021).

Como se ha venido comentando en el sector ganadero, uno de los grandes desafíos que llegan a ser apremiantes, es la productividad del ganado y la mala calidad genética (Syaiful *et al.*, 2024). A su vez este tipo de problemáticas se pueden disminuir con prácticas o técnicas de biotecnología animal como la producción de embriones *in vitro*, siendo una de las prácticas de reproducción asistida que se han venido utilizando durante estos años en la que consiste en la maduración *in vitro* (IVM), fertilización *in vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV) (Sonjaya *et al.*, 2017). Esta práctica es utilizada en un gran número de especies animales con variedad de propósitos (Zarcula *et al.*, 2015), siendo una de las más comunes y dando buenos resultados en la especie bovina (Zarcula *et al.*, 2015). Mas sin embargo a pesar de tener buenos resultados de la producción de embriones *in vitro* en la especie bovina que en la de otras especies, solo el 30-40% de los ovocitos llegan a la etapa

de blastocisto (Kartikasari *et al.*, 2020). Se debe tener en cuenta que el éxito en la producción de embriones *in vitro* (PIVE) se ve influenciado sobre todo por la maduración *in vitro* y cualidades del ovocito (Riyuska , Karja, & Setiadi, 2019) . En la que la maduración exitosa del ovocito es considerada como la más importante y más crítica dentro de la PIVA (Singh *et al.*, 2023). La calidad de los ovocitos es una de las cualidades principales y esenciales para la producción de embriones *in vitro* (Satrio *et al.*, 2022). Es justamente por ello que la selección de ovocitos de alta calidad permite tener resultados satisfactorios en la producción de embriones *in vitro* (Riyuska , Karja, & Setiadi, 2019)

La maduración es un proceso complejo y muy bien estructurado de pasos que debe de sufrir el ovocito durante sus inicios hasta la maduración como tal, esto se da inicialmente en el desarrollo fetal donde los ovocitos se desarrollan y se mantienen en la etapa de profase I de la meiosis o también denominada vesícula germinal (GV). Estos procesos principalmente se dan *in vivo*, en la que la maduración nuclear se reanuda bajo el aumento de LH que por consecuencia da la ovulación del folículo dominante, ya con el ovocito en la etapa de metafase II (MII) de la meiosis. Esto mismo da la oportunidad de una correcta maduración no solo nuclear sino también citoplasmática. *In vitro* es totalmente diferente, ya que los ovocitos posteriores a ser aspirados y madurados *in vitro*, hay un reinicio espontaneo de la meiosis y por ende a MII (Batsiokis, 2019).

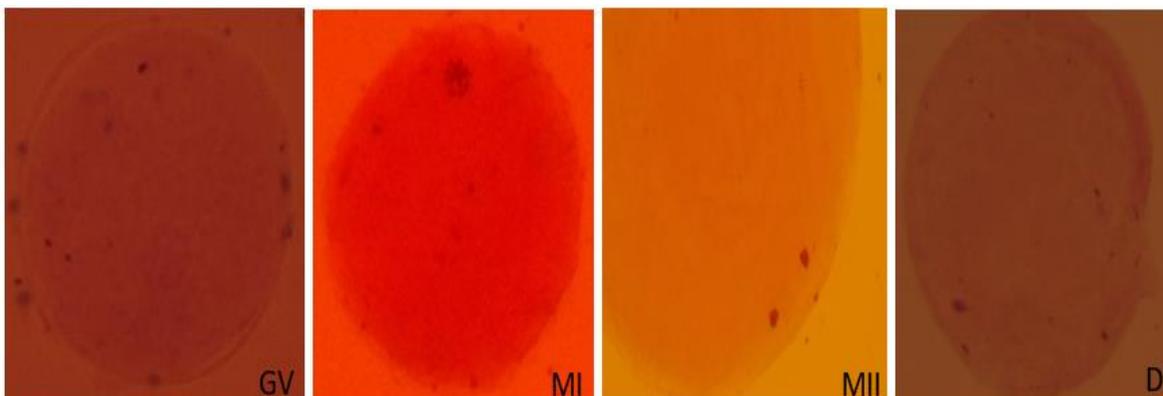


Figura 13. Estado nuclear de ovocitos bovinos, GV: Vesícula germinal, MI: Metafase 1, MII: Metafase 2 y D: Degenerado.

Figura 13. Estado nuclear de ovocitos bovinos, GV: Vesícula germinal, MI: Metafase 1, MII: Metafase 2 y D: Degenerado (Tomado de Satrio *et al.*, 2022)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Para los métodos y manejo de los animales se emplearon criterios éticos y bienestar animal tanto con normas a nivel internacional (Fass, 1999) y nacionales (Norma Oficial Mexicana, 1999). De la misma manera la obtención de las muestras biológicas fue a través de un rastro tipo inspección federal con N°.TIF 243 (SENASICA, 2024)

Localización del área de estudio.

El estudio se realizó en la Comarca Lagunera, se presenta una latitud de 24° 22' norte y longitud 102° 22' oeste a 1.120 metros sobre el nivel del mar. La zona presenta un clima semiárido seco, con una precipitación pluvial anual de 250mm, temperatura media anual de 25°C con máximas de 45°C y mínimas de -5°C, y con una humedad relativa del 20-25% (INEGI, 2021).

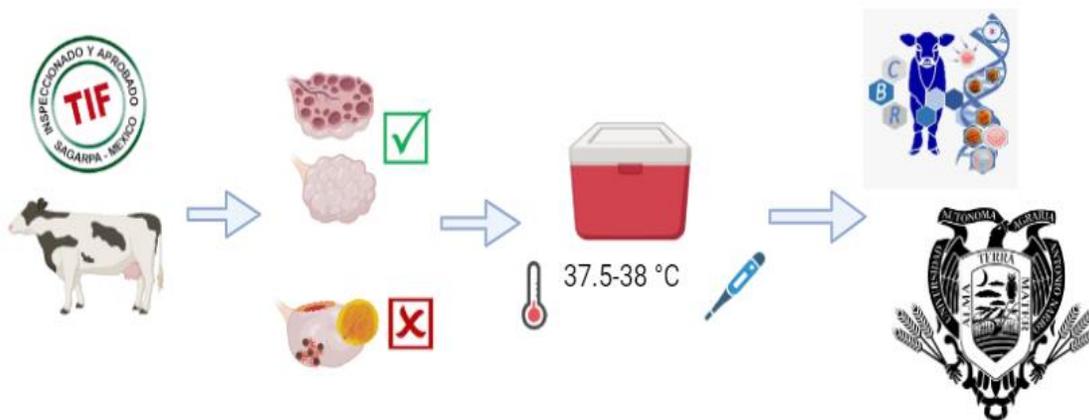
Obtención de muestras.

Se manejaron aproximadamente 213 ovarios de vacas Holstein Friesian de rastro, recolectados del rastro municipal de Torreón Tipo Inspección Federal N°.243 (SENASICA, 2024) ubicado en el Fraccionamiento San Estaban de la carretera Torreón-Mieleras con coordenadas 25° 48' 53.63" N y 103° 34' 38.56", los ovarios se obtenían en el momento del faenado de los animales. Se seleccionaban aquellos ovarios con presencia de cuerpo lúteo, sin anomalías estructurales y con una buena proliferación de folículos de aproximadamente 6-8mm, ya que dentro de ellos se encuentran los ovocitos o gametos (Motta *et al.*, 2011).

Evaluación externa y transporte de ovarios.

Los ovarios seleccionados en 7 bloques definido como la recolección de ovarios (213) fueron aquellos provenientes de vacas de rastro (clínicamente sanas), además de no presentar alteraciones anatómicas evidentes, como lo son adherencias, fibrosis, quistes. El transporte se realizó en un termo con solución salina (SSF al 0.9% de NaCl), adicionado con 1mg/ml de gentamicina (Internacional

Prode®) a temperatura constante de 37° C. Se realizo monitoreo de la temperatura a través de un termómetro de vidrio Brannan Lo-tox™.



El transporte se realizó al laboratorio del Centro de Biotecnología de la Reproducción (CBR) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna (UAAAN-UL), dentro de las primeras 4 horas después de la colecta.

Desinfección y preparación de los ovarios.

En el laboratorio del CBR, los ovarios fueron retirados de la solución de transporte sobre trozos de aluminio y papel canela, fueron rociados con alcohol 70% (Alfimax), dicho procedimiento se realizó cuidando la cadena de temperatura de transporte a 37° C. Posteriormente, los ovarios se colocaron en un vaso de precipitado con SSF (0.9% de NaCl) adicionada con 1mg/ml de gentamicina en un baño maría electrónico (Felisa, Termo: Baño) a temperatura constante de 37° C durante el proceso de aspiración.

Aspiración folicular y obtención de complejos cumulus ovocito (CCO).

La aspiración folicular en tiempo y forma fue realizada siempre por los mismos técnicos de laboratorio. De cada ovario se identificaron visualmente folículos de aproximadamente 6-8 mm, los cuales se aspiran con una aguja de 18 G x 1.5' acoplada a una jeringa de 5 ml estéril. El licor folicular se depositó en un tubo falcón de 50 ml (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, Estados Unidos) con SSF

atemperada y este se colocó en el baño maría. Dicho proceso de aspiración de cada una de las repeticiones se realizó en un promedio de tiempo de 36 ± 11 minutos.

Para la búsqueda de los CCO, se tomó 1 ml del sedimento aspirado, se colocó en una placa de Petri de 90 mm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), añadido con 7 ml SSF a 37°C y 3 ml de buffer fosfato (PBS, Gibco) complementado con 0.3% de albumina sérica bovina al 1% (BSA; Goldbio, Ashby RD. St. Louis, MO) a 37°C a través de un estereoscopio (EMZ 66381, Meiji Techno Co., LTD, Tokio Japón).



Figura 14. Aspiración folicular de los ovarios por aguja.

Selección y clasificación de los COC's.

La recolección de los ovocitos se realizó con ayuda de una pipeta de $10\ \mu\text{L}$ con el estereoscopio (EMZ 66381, Meiji techno Co., LTD, Tokio Japón) en el visor 40X, así mismo se colectaron en una placa con gotas constituidas con $105\ \mu\text{L}$ de medio Wash (IVF-Bioscience, Reino Unido) y $45\ \mu\text{L}$ de PBS adicionado con 0.3% de BSA al 1%, estableciendo por gota a los ovocitos bajo un rango de cuatro categorías morfológicas que se basan en el número de capas de células cumulares (CC) presentes y en la homogeneidad del citoplasma. En las que son: (I) CC de grado 1, intactas, compactas, multicapas y con homogeneidad del citoplasma; (II) CC de grado 2, intactas, compactas y multicapa con citoplasma no homogéneo, así mismo CC incompletos (> 3 capas) compactos con citoplasma homogéneo o no homogéneo; (III) CC grado 3, incompletos (> 2 capas) compactos con citoplasma homogéneo o no homogéneo, de igual manera con CC parcialmente desnudos

compactos con citoplasma homogéneo o no homogéneo; (IV) CC grado 4, completamente o parcialmente desnudos con citoplasma no homogéneo, además de CC expandidas con citoplasma no homogéneo (Choi et al., 2013).



Figura 15. Búsqueda y selección de los COC's.

Análisis de calidad y viabilidad.

Después de la selección y clasificación ovocitaria, cada una de las categorías se dividieron de manera aleatoria y proporcional en grupos de los cuales fueron, control (CN) y azul de tripán (AT), con respecto a cada tratamiento.

Maduración in vitro.

El proceso se implementó bajo cajas de cultivo (NUCLON ®) con una distribución en el contenido por divisiones de la numeración del 1 al 9 en la que se tomaran los criterios bajo los grupos establecidos, de los cuales se subdividen en las categorías del COC correspondientes (1-4). Se colocaron gotas de 50µl de medio de maduración (BO-HES-IVM, ivfbioscience) gaseado con CO₂ por 10 segundos, mismas que se recubrieron con aceite mineral (LifeGuard ® Oíl) sobre toda la atmosfera de la placa hasta cubrir las gotas, colocando los ovocitos correspondientes en cada una de las secciones por gota, en la que el grupo control se estableció en las gotas 1 a la 4, mientras que los ovocitos viables evaluados con azul de tripán se colocaron en las gotas 5 a la 8, mientras que los ovocitos clasificados como muertos fueron colocados en la gota 9 para simular un proceso normal de maduración. Los ovocitos recolectados por categoría se colocaron a

madurar en una estufa-horno (Felisa, Mod: FE-291AD, Serie: 1806029) previamente establecida a una temperatura de 37 °C y 5% de CO² en un lapso de 24hrs.

Resultados de maduración.

Aquellos ovocitos que cruzaron por un cuadro de maduración se evalúan principalmente por el grado de expansión de las células cumulares posterior a ser madurados, de la misma manera, se observó si se encontraron en alguna de las fases de maduración ovocitaria. Una característica principal que se observa es la presencia del primer corpúsculo polar de la cual el ovocito indica que se encuentra en fase de metafase II (Batsiokis, 2019).

Evaluación del índice de expansión.

El índice de expansión se determinó a través de imágenes de los COC a 300x mismas que son tomadas a las 0hrs y 24hrs maduración. Las imágenes fueron tomadas con un celular (iPhone 11, Apple Inc., resolución de 12 pixeles) acoplado a un microscopio estereoscópico con aumento de 2x. Las imágenes se almacenaron en archivos PNG, manteniendo la misma configuración y enfoque. En las fotografías se evaluó el área a través de un programa ImageJ (NHI, versión 1.53k; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>), delimitando la circunferencia de las imágenes a través de la sección de mano alzada (FreeHand), bajo una escala con ayuda de una imagen de la cámara de Neubauer (Improved Neubauer Bright-Line, HBG, Precicolor, Alemania), los resultados se establecieron a áreas en unidades en micrómetros (μm). El índice de expansión se determinó bajo la ecuación modificada de Raes *et al.*, 2023.

$$\text{Índice de expansión} = \frac{\text{Área después de maduración.}}{\text{Área antes de maduración.}}$$



Figura 16. Evaluación del índice de expansión de los COC's a través del programa ImageJ

Evaluación de la progresión meiótica

Se evaluaron un total de 816 ovocitos provenientes en 7 bloques, dentro de cada uno se realizó el mismo proceso por el mismo técnico. El número de ovocitos por bloque respectivamente se transfirieron a una gota de medio Wash (IVF-Bioscience, Reino Unido) donde son lavados, y se procede a de acumular a los ovocitos a través de pipeteo generando un vórtice que permite el retiro completo de las células del cúmulo.

La cantidad seleccionada por cada tratamiento se colocaron en una solución carnol, constituida de alcohol etílico absoluto y ácido acético, a proporciones de (3:1) en una caja NUNC donde cada compartimento se colocó una proporción de 500µL de solución carnol (3:1) y que se estableció un compartimento para cada categoría (1, 2, 3 y 4) para cada tratamiento respectivamente, todo esto para la fijación del DNA y eliminación de las gotas de grasa oscura del citoplasma. En un lapso de 48 hrs a temperatura de 4°C. Posteriormente los ovocitos se retiran de la solución carnol, colocando el número de ovocitos por categoría, el número de ovocitos se colocan en un portaobjetos adicionados con una gota de 10µL de tinción de aceto-orceína (1% orceína en 45% ácido acético) y se colocó una mezcla de vaselina con dentífrico (9:1) para generar una cámara que permita colocar el cubreobjetos para no generar demasiada presión al ovocito, y evaluarlos en un microscopio óptico de contraste de fases (aumento 400x; MT5000, Meiji Techno Co., LTD, Tokio Japón). La evaluación de los ovocitos se realizó para determinar la etapa de estadio de

maduración: vesícula germinal (GV), Metafase I (MI), Metafase II (MII) y Degenerados.

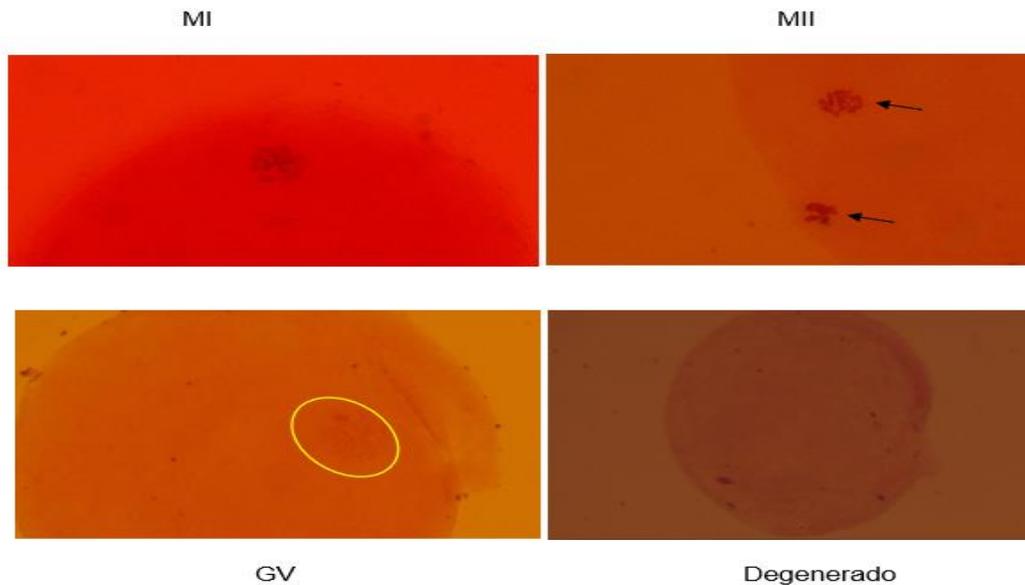


Figura 17. Evaluación de la progresión meiótica en COC´s utilizando tinción de aceto-orceína.

IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron 7 réplicas bajo un diseño completamente al azar. Los COC´s utilizados fueron de las categorías 1, 2, 3 y 4, formando un conjunto, se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos experimentales: grupo control (n=453) y grupo tratado (n=363). La evaluación de la expansión, viabilidad y progresión meiótica se evaluó en ambos grupos. Los datos fueron recopilados, ordenados y depurados en Excel (Microsoft 2023, versión: 16.78.3). La homocedasticidad se evaluó con prueba de Levene y la normalidad con Shapiro-Wilk. Se usó una prueba chi-cuadrada de bondad de ajustes para analizar la distribución de COC´s vivos y muertos por categoría morfológica y en total. La progresión meiótica se evaluó con prueba Poisson. Las comparaciones entre categorías morfológicas se usó un modelo de regresión logística binaria.

V. DISEÑO EXPERIMENTAL

Grupo control (CN).

Los ovocitos en control simplemente se colocaron bajo sus categorías correspondientes sin ningún tratamiento de tinción. Simplemente se colocaron en 100 μ L medio de maduración (BO-HES-IVM, ivfbioscience) y se colocaron a incubar durante 24 hrs en una estufa horno (Felisa, Mod: FE-291AD, Serie: 1806029) a 38 °C y 5% de CO²

Grupo Azul de tripán (AT).

Se colocaron durante 2 minutos los ovocitos en una gota de 100 μ L de azul de tripán al 0.02% (SIGMA-ALDRICH, 0.4%) de cada categoría de la clasificación morfológica. Posteriormente a la incubación en la tinción, fueron lavados en medio Wash (IVF-Bioscience, Reino Unido) x3 gotas, para después clasificarse como AT- (vivos) y AT+ (muertos) de acuerdo a la coloración de las células del cúmulo y citoplasma de los ovocitos. (Carava., 2023). Posteriormente se colocaron a incubar durante 24 hrs en una estufa horno (Felisa, Mod: FE-291AD, Serie: 1806029) a 38 °C y 5% de CO². La realización de esta técnica fue realizada por el mismo técnico en todas las repeticiones de dicho estudio.

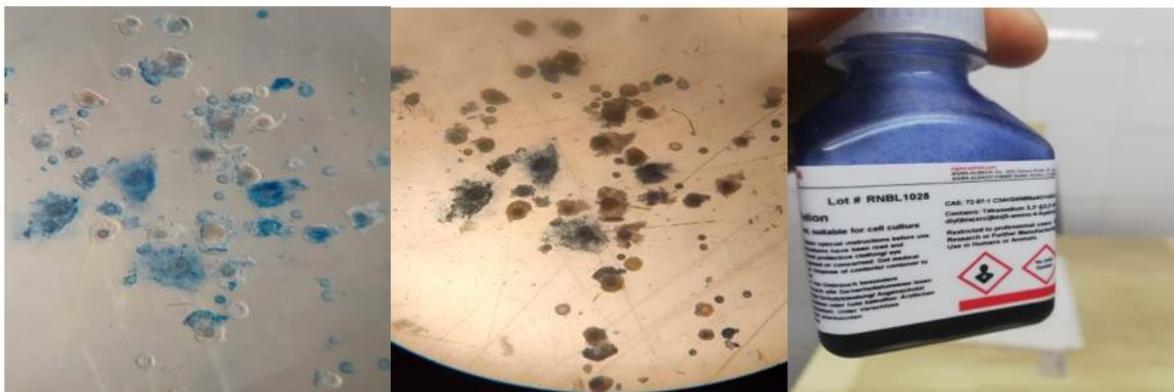


Figura 18. Determinación de la viabilidad bajo la tinción de azul de tripán.

VI. RESULTADOS

De los 213 ovarios de vacas Holstein aspirados en 7 réplicas, se obtuvieron 816 COC's, a su vez estos se clasificaron por categoría morfológica 1, 2, 3 y 4, de acuerdo con el número de capas de células del cumulo y homogeneidad del citoplasma (Choi et al., 2013). Se obtuvo 24.02 % (n=196) en la categoría 1, 22.7 % (n=186) en la categoría 2, 21.9 % (n=179) en la categoría 3 y 31.2 % (n=255) en la categoría 4 (**Tabla 1**).

Tabla 1. Porcentaje del número de COC's aspirados por aguja y clasificados bajo categoría morfológica.

	Clasificación morfológica				COCs Totales	COCs por ovario
	Cat. 1	Cat. 2	Cat. 3	Cat. 4		
Total	196	186	179	255	816	3.8
Porcentaje (%)	24.02	22.7	21.9	31.2	100	

Se observó un mayor porcentaje de COC's vivos (**Tabla 2**) en las categorías 1, 2 y 4 (81.9 %, 77.7 % y 69.9 %, respectivamente) en comparación de COC's muertos (18.1 %, 22.3 % y 30.1 %, respectivamente) ($p < 0.001$). Mientras que, en la categoría 3 no se encontró diferencia estadística significativa entre vivos (45.3 %) y muertos (54.7 %) ($p > 0.05$).

Tabla 2. Porcentaje de ovocitos vivos y muertos por categoría morfológica.

Categoría Morfológica	Vivos (%)	Muertos (%)	P-value
Categoría I (n=83)	81.9 ^a (68/83)	18.1 ^b 1(5/83)	5.973e-09
Categoría II (n=81)	77.7 ^a (63/81)	22.3 ^b (18/81)	5.733e-07

Categoría III (n=86)	45.3 ^a (39/86)	54.7 ^a (47/86)	0.3883
Categoría IV (n=113)	69.9 ^a (79/113)	30.1 ^b (34/113)	2.303e-05
Porcentaje global	68.7	31.3	

Al analizar la progresión meiótica (**Tabla 3**) de los COC's, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los grupos azul de tripán y control en estadios de GV (9.3 vs 11.43 %), MI (30.23 vs 21.43 %) y MII (53.49 vs 48.57 %), respectivamente ($p > 0.05$). Por otro lado, el grupo control presentó mayor porcentaje de COC's degenerados (18.57 %) a comparación del grupo azul de tripán (6.98 %). Con estos resultados se podría mencionar que la exposición de COC's en azul de tripán no afecta su progresión meiótica a MII.

Así mismo, al evaluar el índice de expansión en COC's, no se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos azul de tripán y control (1.88 vs 2.46, respectivamente) ($p > 0.05$).

Tabla 3. Distribución de la progresión meiótica por tratamiento.

Tratamiento	GV	MI	MII	Degenerado	Índice de expansión
Azul tripán (n=43)	9.3 (4/43)	30.23 (13/43)	53.49 (23/43)	6.98 ^b (3/43)	1.88
Control (n=70)	11.43 (8/70)	21.43 (15/70)	48.57 (34/70)	18.57 ^a (13/70)	2.46
p-value	0.2577	0.8403	0.5005	0.0121	0.3572

Al analizar las probabilidades de obtención de COC´s vivos entre comparaciones de categorías morfológicas (**Figura 19**), se muestra que en la categoría 1 tiene 16 veces más probabilidad de generar COC´s vivos en comparación de la categoría III (OR=16, $p < 0.0001$) y 5 COC´s vivos más que en la categoría IV (OR=5, $p < 0.0001$). Al realizar comparación de la categoría II con la categoría III, se obtuvo una probabilidad de generar 5 veces más COC´s vivos (OR=5, $p < 0.0001$), mientras que entre la categoría I y II se registró un OR de 3 ($p < 0.0001$), respectivamente. Así mismo al comparar la categoría II con la categoría IV, arrojo una probabilidad 1.8 veces más de obtener COC´s vivos (OR=1.8, $p < 0.0001$). Por otra parte, al comparar las categorías III y IV, se obtuvo un OR de 0.3, lo que indica que en la categoría III existen menos probabilidades de obtener COC´s vivos con respecto a la categoría IV ($p < 0.05$).

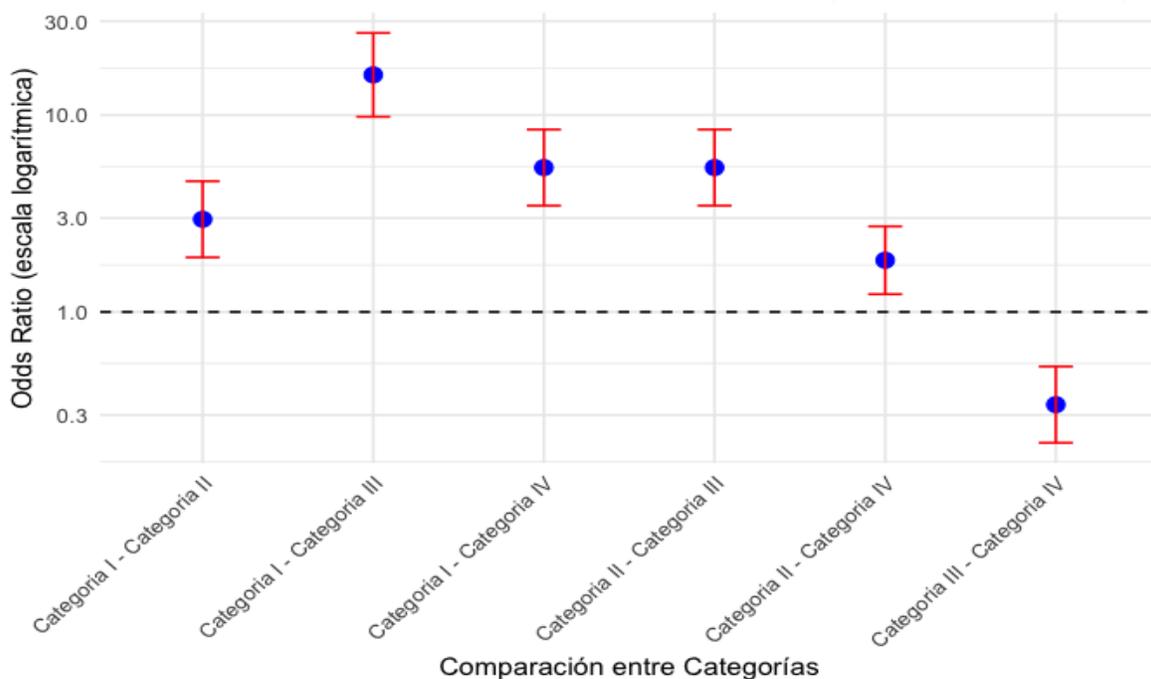


Figura 19. Comparaciones entre categorías morfológicas

VII. DISCUSIÓN

El uso de COC's de categorías de buena calidad (1 y 2) son los más aptos para PIVE, mientras que los de mala calidad son descartados. Los resultados demuestran que las categorías de mejor calidad tienen mayor probabilidad de obtener más COC's vivos que aquellas de menor calidad.

Estudios realizados por Alvarado *et al.*, (2020) obtuvieron porcentajes en COC's de categorías 1= 28.7 %, 2=38.5 % y 3=32.8 %. Siendo estos porcentajes menor a los reportados por Espinoza (2019) quien obtuvo en las categorías 1= 47.6 % y 2= 52.4 %. Por otra parte, Gómez *et al.*, (2015) reportó menor porcentaje de COC's dentro de las categorías de 1=27.7 %, 2=21.1 %, 3=27.7 % y 4=23.4 %. Mientras que, Ayala *et al.*, (2017), aspiraron con una bomba ajustada a 77mmHg reportando 63.3 %. Esto confirma que la técnica y presión ejercida en la aspiración por aguja es una práctica de alta importancia dentro de la recolección de ovocitos y de esta manera se debe tomar en cuenta. En este estudio se utilizó jeringa de plástico con aguja.

A pesar de que el azul de tripán es utilizado ampliamente para evaluar la viabilidad celular, está limitado su uso en procedimientos de producción de embriones *in vitro* en la especie bovina. Este estudio determinó un porcentaje global menor de COC vivos bajo el tratamiento de azul de tripán (68.7 %), con respecto a estudios realizados por Filipiak y Larocca., (2012) donde reportan número de COC vivos con azul de tripán en primavera-verano (87 %), respectivamente. Mientras que Quezada *et al.*, (2019) utilizaron azul de tripán para determinar la viabilidad de COC con presencia de cuerpos lúteos en diferentes posiciones, en la que obtuvo 79.2 % de COC's viables. Por lo tanto, este estudio evidencia que la aplicación de azul de tripán es importante para seleccionar ovocitos de mayor calidad para la PIVE.

El porcentaje de índice de expansión muestra que los resultados del presente estudio son consistentes con respecto a Zarcuła *et al.*, (2015) reporta que ovocitos de mayor categoría, presentan mayor índice de expansión de células del cumulus, ya que a mayor número de capas de células del cumulus, una mayor protección y una mejor nutrición por parte de las mismas.

Este estudio se encontró menor porcentaje global con respecto a la maduración en estadios de MII, oscilando entre un 51.03%, mientras que Satrio *et al.*, (2022) reporto porcentaje de maduración en MII, del 75.3%, respectivamente. Por otra parte, Hernández F. y Hernández F., (2010), reporto un porcentaje global en estadios de MII del 72.7 %. A su vez, Segura *et al.*, (2015) reporto menor porcentaje global con relación al presente estudio en las cifras de MII con 25 %. Los porcentajes menores y mayores de MII en este estudio con respecto al discutido, se puede deber a que evaluamos la progresión meiótica de ovocitos de los cuales eran provenientes de ovarios de vacas Holstein de rastro en las épocas donde se presenta mayor índice de estrés calórico. Es bien sabido que la foliculogénesis en los bovinos se ve reflejada en lapso de 180 días, permitiendo procesos de activación de los folículos primordiales hasta el crecimiento y ovulación del ovocito (Ferreira *et al.*, 2009). Los ovocitos evaluados en este estudio se recolectaron en octubre, lo que indica que el proceso de activación y crecimiento se dio en la época de abril, donde los índices de estrés calórico son elevados y el índice de temperatura y humedad (ITH) es mayor a 68 en la Comarca Lagunera (Rodríguez-Venegas *et al.*, 2022).

VIII. CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio demuestran que la utilización del azul de tripán no afecta la expansión del cumulus y la progresión meiótica de los complejos cumulus-ovocitos, mientras que la categoría morfológica tiene mayor efecto sobre los porcentajes de progresión meiótica e índice de expansión.

IX. LITERATURA CITADA

- Aiman , A., Ramzi, A., Muath, A., & Ahmad, A. (2022). Morphometric Assessment of the Bovine Ovary for in vitro Matured Oocyte Quality to Determine Developmental Competence. *Indian Journal of Animal Research*, 56(5), 557-562. doi:10.18805/IJAR.BF-1471
- Amaro, M., & Morales, M. A. (2010). La biotecnología en México, una aproximación desde los sistemas sectoriales de innovación. *Ideas CONCYTEG*, 5(64), 1225-1245.
- Amaya, J. A. (2016). La Ganadería Mexicana en los últimos años: 1994-2012. *Educatconciencia*, 10(11), 46-57.
- Arechiga, C., Cortes, Z., Hernandez, P., Flores, G., Rochin , F., & Ruiz, E. (2019). Función y regresión del cuerpo lúteo durante el ciclo estral de la vaca. *Abanico Veterinario*, 9, 1-21. doi:10.21929/abavet2019.924
- Arieta, R. (2020). Livestock: Style and trends in the new sex. México 2000-2020. *Agroproductividad*, 13(7), 29-36. doi:https://doi.org/ 10.32854/agrop.vi.1646
- Atuesta, J., & Gonella, A. M. (2011). Control hormonal del ciclo estral en bovinos y ovinos. *Revista Spei Domus*, 7(14), 15-25.
- Barcat, J. A. (2003). Orceina y fibras elasticas. *MEDICINA*, 63(5), 454-456.
- Baruselli, P. S., Ferreira, R. M., Vieira, L. M., Souza, A. H., Bó, G. A., & Rodrigues, C. A. (2020). Use of embryo transfer to alleviate infertility caused by heat stress. *Theriogenology*, 1-45. doi:10.1016/j.theriogenology.2020.04.028
- Batsiokis, M. (2019). *Bovine in vitro embryo production (IVP): assessment of two new approaches to improve the efficiency of embryo production*. The University of Adelaide: Master of Philosophy.
- Billhaq, D. H., Lee, S. H., & Lee, S. (2020). The potential function of endometrial-secreted factors for endometrium remodeling during the estrous cycle. *Animal Science Journal*, 1-9. doi:10.1111/asj.13333
- Bittner, L., Herrera, C., Wyck, S., Malama, E., Wrenzycki, C., & Bollwein, H. (2023). Brilliant Cresyl Blue Negative Oocytes Show a Reduced Competence for Embryo Development after In Vitro Fertilisation with Sperm Exposed to Oxidative Stress. *Animals*, 13(2621), 1-13. doi:10.3390/ani13162621
- Blondi, P., Vigneault, C., Nivet, A. L., & Sirard. (2012). Improving oocyte quality in cows and heifers- What have we learned so far? *Anim Reprod*, 9(3), 281-289.

- Boni, R. (Septiembre de 2012). Origins and effects of oocyte quality in cattle. *Anim Reprod*, 9(3), 333-340.
- Caraba, I. V. (2023). Assessment of the Viability of Cat Oocytes Subjected to Storage at Different Time Intervals. *Animal Science and Biotechnologies*, 56(2), 34-37.
- Cardenas, E., Gallardo, F., Nuñez, J. F., Asiain, A., Rodríguez, M. A., & Velázquez, L. G. (2016). INNOVATION NETWORKS IN LIVESTOCK PRODUCTION GROUPS FOR TECHNOLOGICAL VALIDATION AND TRANSFERENCE IN MÉXICO. *AGRICULTURA, SOCIEDAD Y DESARROLLO*, 13(2), 237-255.
- Cavagnari, B. (2012). Regulación de la expresión génica: cómo operan los mecanismos epigenéticos. *Arch Argent Pediatr*, 2(110), 132-136. doi:doi.org/10.5546/aap.2012.132
- Choi, B. H., Bang, J. I., Jin, J. I., Kim, S. S., Jo, H. T., Deb, G. K., . . . Kong, I. K. (2013). Cocolturing cumulus oocyte complexes with denuded oocytes alters zona pellucida ultrastructure in vitro matured bovine oocytes. *Theriogenology*, 80(9), 1117-1123. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.08.015
- Choudhary, K., Kavya, K., Jerome, A., & Sharma, R. (2016). Advances in reproductive biotechnologies. *Veterinary World*, 9(4), 388-395. doi:10.14202/vetworld.2016.388-395
- Colazo, M. G., & Mapletoft, R. J. (2014). Fisiología del ciclo estas. *Revista Ciencias Veterinarias*, 31-46.
- Du, Z., Zheng, H., Kawamura, Y. K., Zhang, K., Gassler, J., Powell, S., . . . Xie, W. (20 de February de 2020). Polycomb Group Proteins Regulate Chromatin Architecture in Mouse Oocytes and Early Embryos. *Molecular Cell*(77), 825-839. doi:10.1016/j.molcel.2019.11.011
- Duma, J. M., Argudo, D., Ochoa, R., Alvarado, J., & Ayala, L. E. (2019). Uso del Azul Brillante de Cresilo en la selección de ovocitos competentes para la producción in vitro de embriones. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 3(2).
- Elmetwally, M., Hussien, A., Sharawy, H., Mostagir, A., Risha, E., Eldomany, W., . . . Zaabel, S. (2021). A Review of Attempts to Improve Cow Fertility Through Reproductive Management: Estrous Synchronisation. *Journal of Veterinary Healthcare*, 2(4), 1-25. doi:10.14302/issn.2575-1212.jvhc-21-3973
- Escaglia, H. (2022). Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. En O. Forestieri, & Uranga, A., *Salud de la mujer. Enfoque interdisciplinario de su proceso de atención*

- (págs. 208-269). Universidad Nacional de la Plata. Obtenido de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/147639>
- Espinosa, M. E., Esteves, C., Moreno, J. M., & Escalante, F. (2017). *Panorama actual de la industria biotecnologica en México*. ProMexico.
- Fernandez, F., Hernandez, J. E., & Reyes, M. (2010). MADURACIÓN Y FERTILIZACIÓN in vitro DE OVOCITOS DE CERDA OBTENIDOS POR PUNCIÓN Y CORTE DE FOLÍCULOS. *Revista Salud Animal*, 32(2), 78-83.
- Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., & Navarro, P. A. (2009). Cytoplasmatic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 5(72). doi:10.1016/j.theriogenology.2008.10.023
- Fesseha, H., & Degu, T. (2020). Estrus detection, Estrus synchronization in cattle and it's economic importance. *International Journal of Veterinary Research*, 1-8.
- Filipiak, Y., & Larocca, C. (2012). Utilizacion del azul de tripan para diferenciar ovocitos bovinos vivos y muertos en fertilizacion in vitro. *Archivos de Zootecnia*, 61(234), 309-312.
- Filipiak, Y., Viqueira, M., & Bielli, A. (2016). Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. *Veterinaria (Montevideo)*, 52(202), 14-22.
- Fricket, P. M., & Wiltbank, M. C. (2022). The implications of spontaneous versus synchronized ovulations on the reproductive performance of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 105(5), 4679-4689. doi:10.3168/jds.2021-21431
- Garcia, A., Albarran, B., & Avilés, F. (2015). DINÁMICAS Y TENDENCIAS DE LA GANADERÍA DOBLE PROPÓSITO. *Agrociencia*, 49(2), 125-139.
- Gasque, R. (2016). *Reproduccion bovina*. Obtenido de Sitio Argentino de Produccion Animal: <https://www.produccion-animal.com.ar/>
- Gonella, A. M., Atuesta, J. E., Bernal, S., & Chacon, L. (2013). Generalidades de la producción de embriones in vitro. *Revista de Investigacion Agraria y Ambiental*, 4(1), 67-76.
- Gonzales, H., & Gonzales, M.H. (2005). BIOTECNOLOGIA REPRODUCTIVA: UNA ALTERNATIVA PARA MEJORAR LA PRODUCCION ANIMAL. *Biotempo*, 5, 5-11.

- Guaqueta, H. (2009). Ciclo Estral: Fisiología básica y estrategias para mejorar la detección de celos. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 163-183.
- Hasbi, H., & Gustina, S. (2020). Comparative of monitoring estrus cycle in livestock: Hormonal features and ultrasound. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 30(1), 10-18. doi:10.21776/ub.jiip.2020.030.01.02
- Hernandez, J. H., & Corona, L. (2018). METHANE AND CATTLE IN MEXICO: PART OF THE SOLUCION AND NOT OF THE PROBLEM? *Agroproductividad*, 11(2), 46-51.
- Hernández, C. (2016). *Fisiología clínica de la reproducción de bovinos lecheros* (Primera ed.). Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacan, Ciudad de México, México : DR.
- Kartikasari, D., Mulyati, S., Utama, S., Srianto, P., Widjiati, & Plumeriastuti, H. (2020). THE EFFECT OF UREA SUPPLEMENTATION IN MATURATION MEDIA OF BOVINE OOCYTE IN VITRO TOWARSD EXPRESSION OF BAX, BCL-2 AND BAX/BCL-2 RATIO. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 1(14), 16-20. doi:10.21157/j.ked.hewan.v14i1.15283
- Le Berre, M., Gerlach, J. Q., Loughrey, C., Creavin, A., Pluta, K., Gallagher, M., . . . Kilcoyne, M. (2021). Examination of oestrus-dependent alterations of bovine cervico-vaginal mucus glycosylation for potential as optimum fertilisation indicators. *Molecular Omics*, 338-346.
- Lee, J., Lee, M. G., Lin, T., Shin, H. Y., Lee, J. E., Kang, J. W., & Jin, D. (July de 2019). Effect of oocyte chromatin status in porcine follicles on the embryo development in vitro. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 32(7), 956-965. doi:10.5713/ajas.18.0739
- Lennis, Y. Y., Carrillo, D. F., Barrios, D., & Rincón, J. C. (2021). *Inseminación artificial y liderazgo rural en el agronegocio bovino* (Primera ed.). Palmira, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Maia, R. C., Mogollon, E. M., Dubeibe, D. F., Pena, B., & Burla, A. J. (2017). Effect of seasonality on the quality of bovine oocytes selected by the brilliant cresyl blue method. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 259-266.
- Marchais, M., Gilbert, I., Bastien, A., Macaulay, A., & Robert, C. (2022). Mammalian cumulus-oocyte complex communication: a dialog through long and short distance messaging. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39, 1011-1025. doi:10.1007/s10815-022-02438-8
- Martínez Serrano, C., Rizos, D., Rodríguez Martínez, H., & Funahashi, H. (2023). Oocyte-cumulus cells crosstalk: New comparative insights. *Theriogenology*, 205, 87-93. doi:10.1016/j.theriogenology.2023.04.009

- Mejia, I., Hernandez, I. J., Chiquete, N., Cornejo, M. A., & Lammoglia, M. A. (2022). Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos bovinos por la presencia del primer cuerpo polar y la tinción hoechst. *Biologico Agropecuario*, 10(2), 136-145. doi:10.47808/revistabioagro.v10i2.436
- Ming, H., Sun, J., Pasquariello, R., Gatenby, L., Herrick, J. R., Pinto, Y. C., . . . Jiang, Z. (2021). The landscape of accessible chromatin in bovine oocytes and early embryos. *EPIGENETICS*, 16(3), 300-312. doi:10.1080/15592294.2020.1795602
- Motta, P. A., Ramos, N., Gonzales, C. M., & Castro, E. C. (2011). Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. *Vet. Zootecnia*, 5(2), 88-99.
- Murin, M., Strejcek, F., Bartkova, A., Morovic, M., Benc, M., Prochazka, R., . . . Laurincik, J. (2019). Intranuclear characteristics of pig oocytes stained with brilliant cresyl blue and nucleogenesis of resulting embryos. *Zygote*, 1-9. doi:10.1017/S0967199419000352
- Neira, E., Velásquez, J. G., Cardozo, J. A., Velásquez, J., Gutierrez, S. L., & Herrera, R. F. (2023). Morfometría de ovarios, folículos y su relación con la calidad oocitaria en bovinos. *Agronomía Mesoamericana*, 34(1). doi:10.15517/am.v34i1.50156
- Nguyen, N. T., & Binh, T. N. (August de 2021). EFFECT OF HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN ON THE MEIOTIC RESUMPTION OF BOVINE OOCYTE IN VITRO. *ANIMAL PRODUCTION*(268), 74-78.
- Orrego, M., Ponte, I., & Suau, P. (2015). Caracterización de la estructura secundaria de subtipos de la histona H1 por difracción circular. *Revista Biosalud*, 14(2), 29-48. doi: 10.17151/biosa.2015.14.2.4
- Otero, R., Costa, E., & Pereira, E. (2017). In vitro nuclear maturation of bovine oocytes selected by the brilliant cresyl blue method. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 9(2), 345-354. doi:10.24188/recia.v9.n2.2017.617
- Ozturk, S. (2020). Selection of competent oocytes by morphological criteria for assisted reproductive technologies. *Molecular Reproduction Development*, 1021-1036. doi: 10.1002/mrd.23420
- Palma, J. M. (2014). Escenarios de sistemas de producción de carne de bovino en México. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 18(1), 53-62.
- Parra, G., Sifuentes, A., de la Rosa, X., & Arellano, W. (Septiembre-Diciembre de 2011). AVANCES Y PERSPECTIVAS DE LA BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA APLICADA A LA GANADERÍA EN MÉXICO. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(3), 1025-1037. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93921493005>

- Quezada, A., Martínez, K. E., Itzá, M. F., Escarcega, A. M., Pérez, E., Filipiak, Y., . . . Carrera, J. M. (2018). Effect of presence of corpora lutea on cumulus expansion of in vitro matured bovine oocytes selected by trypan blue and brilliant cresyl blue tests. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 967-972. doi:10.1080/09712119.2018.1440566
- Quispe, C., Ancco, A., Solano, J., Unchupaico, I., & Mellisho, E. (2018). Capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos de bovino recuperados vía ultrasonografía y de ovarios de matadero. *Revista Inv Vet Peru*, 29(4), 1114-1121. doi:http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i4.14418
- Raes , A., Azari-Dolatabad, N., Athanasiou, G., Sadeghi, H., Andueza, S. G., Arcos, J. L., . . . Pascottini, O. B. (2023). Measuring cumulus expansion of mammalian oocytes: comparing the reliability of methods and how artificial intelligence could automate the measurement.
- Riyuska , A., Karja, N. W., & Setiadi, M. A. (2019). Efficacy of Leptin Supplementation on Nuclear Maturation and Fertilization Rate of Sheep Oocytes In Vitro. *Tropical Animal Science Journal*, 1(42), 1-5. doi:10.5398/tasj.2019.42.1.1
- Rodriguez, V. R., Meza, H. C., Robles, T. P., Angel, G. O., Rivas, M. J., & Rodriguez, M. R. (2022). Hetal stress characterization in a dairy cattle intensive production cluster under arid land conditions: An annual, seasonal, daily, and minute-to-minute, big data approach. *Agriculture*, 12(6), 760.
- Rodriguez, Y., Arias, L., Medina , A., Mujica, Y., Medina, L. R., Fernández, K., & Mena , A. (2015). Alternativa de la tecnica de tincion para determinar la colonizacion micorrizica. *Cultivos Tropicales*, 36(2), 18-21.
- Rojas , M., & Milán , R. (Enero-Febrero de 2016). Los límites entre la histología y la bioquímica: observando al nucleo celular. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 59(1), 45-56.
- Rosete, J. V., Álvarez , H., Urban, D., Fragoso, A., Aspron, M. A., Ríos , A., . . . De La Torre, J. F. (2021). Biotecnologias reproductivas en el ganado: cinco decadas de investigacion en México. *Rev Mex Ciencias Pecuarias*, 12(3), 39-78. doi:https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5918
- Rottgen, V., Schon, P. C., Becker, F., Tuchscherer, A., Wrenzycki, C., Dupjan, S., & Puppe, B. (2019). Automatic recording of individual oestrus vocalisation in group-housed dairy cattle: development of a cattle call monitor. *Animal*, 1-8. doi:doi:10.1017/S1751731119001733
- Salimov, D., Lisovskaya, T., Otsuki, J., Gzgzyan, A., Bogolyubova, I., & Bogolyubov, D. (2023). Chromatin Morfhology in Human Germinal Vesicle

- Oocyte and Their Competence to Mature in Stimulated Cycles. *Cells*, 12, 1976. doi:10.3390/cells12151976
- Santana, M. D., Couceiro, S. R., & Lara, T. S. (2023). Biodegradation and reduction of toxicity of Azo Trypan Blue dye by Amazonian strains of gasteroid fungi (Basidiomycota). *Brazilian Journal of Biology*, 83, 1-9. doi:10.1590/1519-6984.277577
- Satrio, F. A., Karja, N. W., Setiadi, M. A., Kaiin, E. M., Gunawan, M., Memili, E., & Purwantara, B. (2022). Effect of Sericin Supplementation in Collection Medium on Bovine Oocyte Nuclear Maturation. *Animal Production International Seminar*, 1-6. doi:10.1088/1755-1315/478/1/012006
- Sequeira, L. T. (2013). *Compendio sobre reproduccion animal* (Primera ed.). Managua: UNA.
- Sierra, D. C. (2011). Determinación de la viabilidad de ovocitos bovinos obtenidos post mortem a varios periodos de tiempo en el Camal Municipal de Tulcán. *Tranferencia Tecnologica y Emprendimiento*, 2-11.
- Silva, A. C., Sakoda, J. N., Lima, I., Marcozzi, B., Lodde, V., Maria, A., & Buratini, J. (2020). Characterization and control of oocyte-scale chromatin configuration in different cattle breeds. *Theriogenology*(141), 146-152. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.09.020
- Singh, N., Mavi, G. K., Kumar, A., & Malik. (2023). Efficacy of 2 Day Versus 3 Day Superstimulation Protocol on In Vivo Maturation of OPU Derived Oocytes in Buffaloes. *The Indian Journal of Animal Reproduction*, 44(1), 17-22. doi: 10.48165/ijar.2023.44.01.4
- Sonjaya, H., Yusuf, M., Hamdana, A., Utamy, R. F., Gustina, S., & Hasbi, H. (2017). Effect of Bali Cattle Ovarian Status on Oocytes Nuclear Maturation and In vitro Fertilization Rate. *JITV*, 4(22), 173-178. doi:10.14334/jitv.v22i4.1585
- Syaiful, F. L., Jaswandi, J., Mundana, M., & Udin, Z. (2024). The Effect of using HEPES in Culture Medium on Oocyte maturation Rates and In vitro Fertilization in Pesisir Cattle. *Journal of Animal Health and Production*, 12(3), 450-457. doi:10.17582/journal.jahp/2024/12.3.450.457
- Thieman, W., & Palladino, M. (2010). *Introduccion a la biotecnologia* (Segunda ed.). (M. Romo, Ed.) Madrid, Ribeira de Loira, España: PEARSON EDUCACION S.A.
- Tinoco, L., Carrera, R., & Capa Mora, E. (2024). Efecto de dos medios de capacitación espermática (B.O vs Percoll) en la fecundación in vitro de ovocitos bovinos. *Revista Veterinaria*, 35(1), 48-55. doi:https://doi.org/10.30972/vet.3517479

- Turathum, B., Gao, E. M., & Chian, R. C. (2021). The Function of Cumulus Cells in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and Fertilization. *Cells*, *10*, 2292. doi:10.3390/cells10092292
- Uffo, O. (2011). Produccion animal y biotecnologia pecuaria: nuevos retos. *Salud Animal*, *33*(1), 8-14.
- Ugalde, J. R. (2014). Biotecnologias reproductivas para el siglo XXI. *Revista Cubana de Ciencia Agricola*, *48*(1), 33-34.
- Urrego, R., & Restrepo, G. (2006). Implications of reproductive biotechnology in the animal production. *Revista CES*, *2*(2), 64-73.
- Vazquez, J. (2010). *HORIZONTES EN BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCION ANIMAL*. Murcia, España: Academia de Ciencias de la Region de Murcia.
- Xie, J., Xu, X., & Liu, S. (2023). Intercellular communication in the cumulus–oocyte complex during folliculogenesis: A review. *Cell and Developmental Biology*, *11*, 1087612. doi: 10.3389/fcell.2023.1087612
- Zarcula, S. M., Cernescu, H., Markowsky, A., Nica, N., Tulcan, C., Bonca, G., . . . Hutu, I. (2015). SOME ASPECTS REGARDING IN VITRO MATURATION OF BOVINE OOCYTES. *Research Gate*, 275-279. doi: 10.13140/RG.2.2.24642.73927
- Zarcula, S. M., Godja, G., Tulcan, C., Bonca, G., Otava, G., Markovski, A., . . . Mircu, C. (2015). Comparison of morphological aspects and nuclear status of bovine COCs cultured in medium with/without sheep FSH. *Veterinary Science*, 299-301. doi:10.13140/RG.2.2.26320.46085
- Zebari, H. M., Rutter, S. M., & Bleach, C. L. (2018). Characterizing changes in activity and feeding behaviour of lactating dairy cows during behavioural and silent oestrus. *Applied Animal Behaviour Science*, 1-5. doi:10.1016/j.applanim.2018.06.002
- Zhang, C., Chen, Z., Yin, Q., Fu, X., Li, Y., Stopka, T., . . . Zhang, Y. (2019). The chromatin remodeler Snf2h is essential for oocyte meiotic cell cycle progression. *GENES & DEVELOPMENT*(34), 166-178. doi:10.1101/gad.331157.119