

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



EFFECTO DE LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA-6-FOSFATO
DESHIDROGENASA SOBRE LA CLASIFICACIÓN, SELECCIÓN Y
ASOCIACIÓN CON LA MADURACIÓN *IN VITRO* EN OVOCITOS BOVINOS

Tesis

Que presenta MAURILIO SOLORIO OCHOA

como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Torreón, Coahuila

Diciembre 2024

EFFECTO DE LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA-6-FOSFATO
DESHIDROGENASA SOBRE LA CLASIFICACIÓN, SELECCIÓN Y
ASOCIACIÓN CON LA MADURACIÓN *IN VITRO* EN OVOCITOS BOVINOS

Tesis

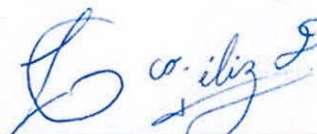
Elaborada por MAURILIO SOLORIO OCHOA como requisito parcial para
obtener el grado de Maestro en Ciencias en Producción Agropecuaria con la
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dr. Juan Luis Morales Cruz
Director de Tesis



Dr. Javier Morán Martínez
Asesor



Dra. Francis Gerardo Veliz Deras
Asesor



Dr. Leticia Romana Gaytán Alemán
Asesora



Dr. Hugo Zúriel Gerrero Gallego
Asesor



Dra. Dalia Ivette Carrillo Moreno
Jefe del Departamento de Postgrado



Dr. Antonio Flores Naveda
Subdirector de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios por darme la fortaleza, sabiduría y sobre todo la salud para completar este proyecto, permitiéndome avanzar cada día y superar los desafíos que se me presentaron.

A mi esposa, Denia Lizbeth, y a mi extraordinario hijo, Owen Haziél, por su gran apoyo emocional, por ser mi pilar y fuente de inspiración para mejorar cada día. Los amo.

A mis padres, Juan Antonio y Josafat Ochoa, por sus enseñanzas, valores y por estar siempre a mi lado, brindándome su apoyo incondicional. A mis hermanos Guadalupe, Antonio, Juan Diego y Marisol, quienes han sido parte fundamental de mi vida y me han alentado en cada paso. A mi abuelita, Maria Santos, quien con sus consejos y palabras de aliento me ha transmitido su sabiduría y amor incondicional. Sus enseñanzas han sido una guía invaluable en mi camino.

A mis asesores, quienes con su experiencia y orientación académica han sido parte crucial en el desarrollo de este trabajo.

A mis grandes amigos, Dr. Juan Luis, Dr. Juan Manuel, Dr. Hugo Zuriel, Dra. Zurisaday, Dra. Cristina, MC. Juan Roberto, y MVZ. Rual Aparicio, quienes han sido más que compañeros; los considero parte de mi familia. Su apoyo incondicional ha sido fundamental para mi desarrollo profesional y personal. Gracias por creer en mí!!

A todos mis compañeros y familia del CBR, quienes si los menciono uno a uno, serian más hojas de agradecimientos que tesis. Simplemente les quiero decir Gracias por todo.

A todos, gracias por acompañarme en esta etapa y por formar parte de este logro.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Tecnologías de reproducción asistida utilizadas en la industria bovina.....	3
2.1.1Tecnologías de producción de embriones.....	4
2.1.2 Factores que afectan la producción de embriones in vitro.....	5
2.1.3 Calidad de los ovocitos.....	6
2.2 Factores asociados a la biología del ovocito bovino.....	7
2.2.1 El ovocito vacuno.....	7
2.2.2 Desarrollo embrionario del ovocito, folículos y ovario.....	7
2.2.3 Clasificación folicular.....	10
2.2.3 Aspectos morfológicos en el crecimiento folicular y desarrollo ovocitario.....	11
2.2.4 Maduración del ovocito y su relación con el desarrollo folicular.....	14
2.2.5 Interacciones celulares en el folículo.....	15
2.2.6 Cambios en la configuración de la cromatina del ovocito.....	17
2.3 Indicadores visuales y morfológicos para selección ovocitaria.....	20
2.3.1 Morfología de estructuras ováricas.....	20
2.3.2 Morfología de los complejos cumulo ovocitos.....	21
2.3.3 Expansión de las células del cúmulo.....	23
2.3.4 Azul brillante de cresil (BCB).....	24
2.3.5 Tinción de orceína.....	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1 Localización del área de estudio.....	27
3.2 Obtención y transporte de muestras.....	27

3.3 Procesamiento de ovarios y obtención de complejos cúmulos ovocito ...	27
3.4 Selección y clasificación de los CCO.....	28
3.5 Determinación de la actividad de la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa por la tinción BCB	29
3.6 Evaluación del índice de expansión.....	29
3.7 Evaluación de la progresión meiótica	30
3.8 Diseño experimental	30
3.9 Análisis estadístico	32
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
V CONCLUSIÓN.....	44
VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Características morfológicas y estructurales del compartimento nuclear en el ovocito bovino en relación con la configuración de la cromatina (Adaptada y modificada de Lodde et al. 2008)..... 18
- Cuadro 2.** Complejos cúmulos ovocitos (CCO's) obtenidos por aspiración folicular con jeringa y clasificados en categorías morfológicas. 33
- Cuadro 3.** Progresión meiótica de ovocitos bovinos 24 horas después de la maduración in vitro de los grupos experimentales. 38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotografías representativas de las configuraciones de cromatina en ovocitos bovinos. (a) ovocito en GVI con acumulos de condensación de ADN y presencia de membrana nuclear. (b) ovocito en MI con cromatina compacta sin presencia de membrana nuclear. (c) ovocito en MI con cromatina en formación de la placa metafásica. (d) ovocito en MII con presencia de corpúsculo polar (CP) y acumulo de cromatina ovocitario. (e) Ovocito en anafase/telofase con placa metafásica visible en la primera división meiótica. (e) ovocito degenerado sin presencia visible de acumulo de cromatina. 31
- Figura 2.** Evaluación de G6PDH (a) porcentaje de BCB[+] y BCB[-] por categoría morfológica y en total. (b) fotografías que representan la tinción del citoplasma en CCO con BCB en diferentes categorías. Los grupos marcados con letras diferentes son estadísticamente diferentes, χ^2 -tes, ($p < 0.05$). 34
- Figura 3.** Índice de expansión con rango intercuartil. (a) cuantificación del índice de expansión de las CC en CCO por grupo. (d) fotografías a 0 h y 24 h después de la maduración en grupos BCB[+] y BCB[-]. Los grupos marcados con letras diferentes (a, b, c) son significativamente diferentes ($p < 0.0001$). 35
- Figura 4.** (a) correlación entre la categoría morfológica y el porcentaje de progresión meiótica hasta MII. (b) fotografía in toto de ovocito en MII por medio de microscopia de campo claro, con la flecha se señala el corpúsculo polar. (c) fotografía in toto de ovocito en MII teñido con aceto-orceina al 1%, con las flechas se señala el corpúsculo polar y cromatina compacta del ovocito. 36
- Figura 5.** Distribución de probabilidades con ajuste a modelo de regresión logística multinomial con interacción de la variable grupo y categoría morfológica ($p < 0.0001$) sobre la competencia meiótica. 41
- Figura 6.** Curva de predicción de llegar a MII en relación a la categoría morfológica y el grupo de ovocitos. 42

RESUMEN

Efecto de la determinación de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa sobre la clasificación, selección y asociación con la maduración *in vitro* en ovocitos bovinos

Maurilio Solorio Ochoa

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Producción Agropecuaria

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Dr. Juan Luis Morales Cruz

Director de tesis

La búsqueda de técnicas con potencial para determinar la competencia ovocitaria, como el uso de azul brillante de cresil (BCB) figura como una alternativa superior. Con el objetivo de evaluar el efecto de la determinación de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa sobre la expansión del cúmulo y progresión meiótica de ovocitos bovinos madurados *in vitro*. Complejos cúmulo ovocitos (CCO's) de ovarios de rastro se clasificaron morfológicamente, en categoría 1, 2, 3 y 4, estas a su vez se dividieron en grupo control y grupo tratado. Este último, se expuso a la tinción BCB, por lo que se subdividió en BCB[+] y BCB[-]. Los tres grupos experimentales se sometieron a maduración *in vitro* (MIV) a 38.5 °C, 5% de CO₂ y humedad saturada por 24 h. Se evaluó el índice de expansión de las CC y la progresión meiótica de los ovocitos. Las variables dicotómicas se analizaron por medio de chi cuadrada y las variables categóricas de conteo se analizaron con un modelo lineal generalizado (GLM). Un valor de $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo. Se observó mayor ($p < 0.05$) proporción de CCO's BCB[+] en la categoría morfológica 1, el índice de expansión fue mayor ($p < 0.0001$) en BCB[+] y la progresión meiótica a MII fue mayor en el grupo BCB[+] en comparación con el BCB[-] ($p < 0.05$). Se concluye que la categoría morfológica de CCO's influye en el resultado de la tinción BCB, los CCO's BCB[+] presentan mayor expansión y la exposición a BCB en los CCO's no afecta la progresión meiótica de los ovocitos.

Palabras clave: Ovocito, BCB, Progresión meiótica, Expansión del cúmulo.

ABSTRACT

Effect of glucose-6-phosphate dehydrogenase determination on the classification, selection, and association with *in vitro* maturation in bovine oocytes

Maurilio Solorio Ochoa

To obtain the degree of Master of Science in Agricultural Production

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Dr. Juan Luis Morales Cruz

Thesis director

The search for techniques with the potential to determine oocyte competence, such as the use of Brilliant Cresyl Blue (BCB), stands out as a superior alternative. This study aim to evaluate the effect of glucose-6-phosphate dehydrogenase determination on cumulus expansion and meiotic progression in bovine oocytes matured in vitro. Cumulus-oocyte complexes (COCs) from slaughterhouse ovaries were morphologically classified into categories 1, 2, 3, and 4; these categories were then divided into control and treated groups. The treated group was exposed to BCB staining, resulting in further subdivision into BCB[+] and BCB[-] groups. All three experimental groups were subjected to in vitro maturation (IVM) at 38.5°C, 5% CO₂, and saturated humidity for 24 hours. The cumulus expansion index and meiotic progression of the oocytes were evaluated. Dichotomous variables were analyzed using chi-square tests, while categorical count variables were analyzed with a generalized linear model (GLM). A p-value of <0.05 was considered statistically significant. A higher proportion (p<0.05) of BCB[+] COCs was observed in morphological category 1, the expansion index was significantly higher (p<0.0001) in BCB[+], and meiotic progression to MII was greater in the BCB[+] group compared to the BCB[-] group (p<0.05). It was concluded that the morphological category of COCs influences BCB staining results, with BCB[+] COCs exhibiting greater expansion, and BCB exposure in COCs does not affect oocyte meiotic progression.

Keywords: Oocyte, BCB, Meiotic progression, and Cumulus expansion.

I. INTRODUCCIÓN

El cambio climático y el crecimiento de la población mundial, impulsan a la ciencia para que las investigaciones se centren en buscar alternativas de sostenibilidad en la producción animal. Por ello, la eficiencia reproductiva y su control son características imperativas de la ganadería sostenible (Choudhary *et al.*, 2016).

El ovocito se distingue de otras células metazoicas por su capacidad de activación totipotente, misma que es transversal en las especies domésticas, además, se considera una célula altamente especializada, cuya función central es la propagación de la vida (Albertini, 2015). Así mismo, esta característica la convierten en un enigma biológico, y su estudio minucioso continúa desafiando nuestra comprensión, es así que el estudio del ovocito desempeña un papel indiscutible en la reproducción de los animales de interés zootécnico y se convierte en un objeto clave para desentrañar los misterios de la biología reproductiva (Yang, 2023; Fair y Lonergan, 2024)

En este sentido, la maduración *in vitro* (IVM) sin lugar a duda logra maximizar el uso de material genético (Hansen, 2014). A pesar de que esta TRA está disponible de manera comercial en el ganado bovinos desde 1981 (Brackett *et al.*, 1982), aun se presentan grandes retos en tratar de explicar los complejos eventos moleculares, nucleares, y bioquímicos que ocurren en el ovocito bovino (Ferreira *et al.*, 2009). Se plantea que la IVM es la etapa crítica de la producción de embriones *in vitro* (IVPE), ya que si se cultivan de manera *in vivo* ovocitos que se maduraron *in vitro*, la eficiencia de blastocistos fue de alrededor de 35%, mientras que si se cultivan ovocitos (*in vivo* o *in vitro*) que fueron madurados *in vivo*, la eficiencia de blastocistos alcanzaba aproximadamente un 80% (Dieleman *et al.*, 2002; Rizos *et al.*, 2002).

Se han descrito un sin fin de marcadores biológicos que permiten obtener CCO's de calidad, entre los cuales se encuentran, la morfología de estructuras ováricas (Hagemann *et al.*, 1999; Manjunatha *et al.*, 2007; Dieci *et al.*, 2016), la morfología de CCO's (De Loos *et al.*, 1989; Moussa *et al.*, 2015; Aguila *et al.*, 2020),

expansión del cúmulo (Choi *et al.*, 2001; Uyar *et al.*, 2013; Nevoral *et al.*, 2015) y otros métodos que involucran el uso de tinciones como el azul brillante de cresil (BCB) (Torner *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2015; Walker *et al.*, 2022).

Se utiliza BCB como un marcador visual de maduración ovocitaria, donde de manera indirecta se mide la actividad de la enzima Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa (G6PDH) (Alm *et al.*, 2005), la cual, de acuerdo con la literatura, esta enzima está presente de manera abundante en el citoplasma de ovocitos inmaduros, mientras que, en los ovocitos maduros su actividad cesa (Mangia y Epstein, 1975). Por lo tanto, en esta prueba se pueden observar dos tipos de CCO's, positivos a la prueba BCB[+] que son los ovocitos teñidos (maduros o de calidad) y negativos a la prueba BCB[-] que son ovocitos incoloros (inmaduros o sin calidad) (Walker *et al.*, 2022). Esta divergencia se debe a que la enzima G6PDH de manera activa promueve la producción de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NAPDH), la cual se considera un agente reductor y la tinción BCB un aceptor de iones hidrógeno, lo que en altas concentraciones de esta coenzima reduce el colorante provocando el citoplasma incoloro (Ghica y Brett, 2009; Walker *et al.*, 2022). Al realizar (IVPE) con ovocitos BCB[+] y BCB[-], los BCB[+] presentan una mayor producción de blastocistos (Alm *et al.*, 2005; Wongsrikeao *et al.*, 2006; Torner *et al.*, 2008; Catalá *et al.*, 2011; Castaneda *et al.*, 2013).

A pesar de las grandes ventajas de este método de selección, no se aplica de manera rutinaria, ya que una de las principales razones es la variabilidad en los resultados de diversos experimentos, lo que promueve la investigación de esta técnica en ovocitos madurados *in vitro* (Iwasaki *et al.*, 2018; Walker *et al.*, 2022). El presente estudio surge frente a la búsqueda de una metodología que nos permita mejorar la selección de CCO's con competencia, en condiciones del árido de México, por medio de marcadores biológicos no invasivos, como el uso de BCB. Con base a lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la determinación de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa sobre la clasificación, selección y asociación con la maduración *in vitro* en ovocitos bovinos

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Tecnologías de reproducción asistida utilizadas en la industria bovina

En las últimas décadas con el advenimiento en el incremento en la producción animal con menos recursos, ha traído consigo avances científicos y tecnológicos que han dado lugar a un grupo de herramientas conocidas como tecnologías de reproducción asistida (TRA) (Hansen, 2014). Entre la principales TRA empleadas en la ganadería de producción de carne y leche son: inseminación artificial, sincronización de la ovulación, múltiple ovulación y transferencia de embriones (MOET, por sus siglas en inglés), producción de embriones *in vitro* (IVPE, por sus siglas en inglés), inyección intracitoplasmática (ICSI, por sus siglas en inglés) y la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, por sus siglas en inglés) (Choudhary *et al.*, 2016).

El desarrollo de la inseminación artificial a principios del siglo XX (Ivanoff, 1922), dictó el punto de partida para el desarrollo de las TRA. La primera vez que se realizó con éxito la transferencia de embriones en conejo fue en el año 1891, en la oveja y la cabra en 1934 y en la vaca en 1951 (Betteridge, 1981). La primera descendencia producida por fertilización *in vitro* (FIV) en el bovino fue en 1981 (Brackett *et al.*, 1982), mientras que, el primer uso de la ICSI se desarrolló en el conejo en 1988 (Iritani *et al.*, 1988) y el primer mamífero producido por SCNT fue la oveja Dolly en 1996 (Wilmut *et al.*, 1997) y en 1998 fue el bovino llamado “gene” (Cibelli *et al.*, 1998).

El principal objetivo de la intervención del hombre en el control de la reproducción del ganado a través de TRA, es obtener una mayor eficiencia productiva y control, características imperativas en la ganadería sostenible (Choudhary *et al.*, 2016). Es bien sabido que la ineficiencia reproductiva es una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria bovina (Hafez, 2015). En el ganado bovino la reproducción es un proceso que demanda mucha energía, para producir una unidad de proteína de carne, más del 50 % del alimento total es consumido por la madre, mientras que, en las cerdas para producir animales

destinados a sacrificio la madre solo consume el 20 % del alimento total. Este alto consumo de energía requerida en el ganado bovino de carne, se ve disminuido al aumentar el número de crías por unidad de tiempo en la que la hembra permanece productivamente activa en la unidad de producción (Hansen, 2014).

2.1.1 Tecnologías de producción de embriones

Las tecnologías embrionarias son una combinación de técnicas de reproducción asistida, biología celular y genómica. La producción de embriones en bovinos tiene dos formas para desarrollarse, la producción de embriones *in vitro* y la múltiple ovulación y transferencia embrionaria (MOET, por sus siglas en inglés) (Mapletoft y Hasler, 2005). Si bien los protocolos de producción son diferentes, por ende, las técnicas, materiales y equipos también lo son. Sin embargo, convergen en la maximización del uso de gametos, proporcionando mayor producción de descendencia genéticamente superior en un intervalo de tiempo menor a comparación de la monta natural y son económicamente rentables comparadas con otras TRA (Hansen, 2020).

Si bien la IVPE y la MOET comparten un mismo fin, dichas tecnologías tienen ventajas una sobre la otra. La MOET se basa en la estimulación de una nueva onda folicular y a través de dosis decrecientes de hormona folículo estimulante (FSH) administrada a intervalos de 12 horas en lapsos de 4 días a 5 días, se induce la codominancia folicular de una cohorte de folículos seleccionados, con el objetivo de producir una ovulación múltiple en hembras monótocas como la vaca (Qamar *et al.*, 2015). En algunos otros protocolos, la estimulación se realiza con gonadotropina coriónica equina (eCG, por sus siglas en inglés) (Qamar *et al.*, 2015). Debido a este sistema de producción embrionaria *in vivo*, es que los embriones derivados de esta técnica tienen mayor criotolerancia (Pollard y Leibo, 1994) y por ende podían ser exportados antes que los producidos *in vitro*, siguiendo los protocolos adecuados (Ponsart y Pozzi, 2018). Más recientemente varios laboratorios comerciales de IVPE, han informado la criopreservación de

embriones con éxito, a expensas de una disminución de las tasas de concepción (Vargas-Reyes y Chacón-Jaramillo, 2016).

La producción *in vitro* (IVPE) de embriones se efectúa en diferentes etapas que comprenden: 1) recuperación de CCO de ovarios de rastro o de hembras vivas, 2) maduración de los CCO, 3) fertilización *in vitro* y 4) cultivo de desarrollo de cigotos (Filipiak y Larocca, 2012). Por ello, una ventaja de la IVPE sobre la MOET es que no se someten a tratamientos hormonales por lo que disminuyen la posibilidad de problemas de fertilidad debido al uso de FSH de origen ovino o porcino (Mapletoft *et al.*, 2002). Además, la IVPE en sinergia con la ovum pick up (OPU) se pueden realizar a intervalos muy cortos, aunque la mayoría de los autores proponen cada 14 días (Pieterse *et al.*, 1991), mientras que en MOET se requiere un mínimo de 6 semanas entre la finalización de un ciclo y el inicio de otro (Mapletoft *et al.*, 2002; Qamar *et al.*, 2015).

2.1.2 Factores que afectan la producción de embriones *in vitro*

Con la introducción de las tecnologías embrionarias en el ganado bovino en la segunda mitad del siglo XX, se comenzaron a realizar esfuerzos exhaustivos en la comprensión de la biología reproductiva y con ello determinar los factores que alteran la homeostasis reproductiva. En la actualidad, se han documentado varios factores, entre los que se incluyen: la nutrición, la condición corporal, el clima, el fotoperiodo, la edad, la raza, estado sanitario, producción de leche, por mencionar algunos (Hopper, 2021; Senger, 2012).

La localización terrestre entre los diversos paralelos geográficos genera una diversidad de regiones con diferentes climas (García *et al.*, 1998). Tal es el caso de las regiones tropicales y subtropicales, donde la combinación de altas temperaturas con alta humedad relativa confluye en la disminución de la eficiencia reproductiva en el ganado (Al-Katanani *et al.*, 1999). Algunas afectaciones puntuales son, los cambios en la dinámica folicular disminuyendo la población de folículos pequeños (3-5 mm) y medianos (6-9 mm) (Wolfenson *et al.*, 1995), desbalance en la producción de hormonas gonadotropinas y esteroides (Roth, 2017), lo que confluye en la disminución del diámetro del folículo

dominante, alteración del proceso ovulatorio (Roth *et al.*, 2001; Roth, 2017) y el desarrollo del siguiente cuerpo lúteo (Wolfenson *et al.*, 1995). Los efectos del estrés calórico en ovocitos se observan como una disminución de la calidad, por alteraciones en el citoesqueleto, estrés oxidativo, fragmentación del ADN, disminución de la redistribución de organelos y de la competencia meiótica (Agarwal *et al.*, 2005; Roth, 2017) y por ende, una menor producción de embriones (Hansen, 2020).

En ganado lechero la producción de leche y la reproducción tienen una correlación inversamente proporcional (Rastani *et al.*, 2005). En el periodo de transición, por efecto de la producción de leche el gasto energético es demasiado, incluso superando la ingesta de energía en la alimentación, lo cual resulta en un proceso catabólico denominado “balance energético negativo” (Rastani *et al.*, 2005; van Knegsel *et al.*, 2013). Esto se acompaña de un incremento de ácidos grasos libre (AGL) en la sangre y el licor folicular, exponiendo al ovocito a altas concentraciones de AGL, donde las especies saturadas disminuyen la competencia del ovocito (Marei *et al.*, 2017). Aunque las células del cúmulo (CC) cuentan con la ingeniería enzimática adecuada para transformar el entorno inhóspito de alta concentración de ácidos saturados a insaturados (Aardema *et al.*, 2017), los efectos negativos se evidencian en el ovocito aumentando el nivel de polarización de la membrana, alteración en la producción de adenina trifosfato (ATP) por la célula y producción de ceramida, que es lipotóxica (Weinberg, 2006). Además, elevadas concentraciones de estos AGL se asocian con fallas durante la elongación y adhesión del embrión bovino (Van Hoeck *et al.*, 2014).

2.1.3 Calidad de los ovocitos

La recuperación de CCO es uno de los factores críticos en la IVPE, ya que es en ese momento donde los ovocitos se seleccionan de un grupo de CCO con características diferentes (Filipiak y Larocca, 2012). Actualmente la evaluación de los ovocitos bovinos destinados a la producción de embriones *in vitro*, se realiza desde un enfoque cualitativo donde se observan la cantidad de células de

los cúmulos y la homogeneidad citoplasmática (De Loos *et al.*, 1989). Sin embargo, realizar una clasificación ovocitaria tomando estas características morfológicas, podría resultar poco eficiente en la selección de ovocitos, lo que se refleja en las bajas tasas de eficiencia de producción de embriones *in vitro* (Ferré *et al.*, 2020), resultado de factores asociados a la complejidad del ovocito (Aguila *et al.*, 2020; Fair y Lonergan, 2024).

2.2 Factores asociados a la biología del ovocito bovino

2.2.1 El ovocito vacuno

En mamíferos, el ovocito se distingue de otras células metazoicas por su capacidad de desarrollar un nuevo organismo después de la fertilización, y su activación totipotente, característica transversal entre los mamíferos domésticos. Estas capacidades son las que convierten al ovocito en una célula altamente especializada, cuya función central es la propagación de la vida (Albertini, 2015). Dentro de la biología reproductiva dicha especialización representa un enigma biológico, y su estudio minucioso continúa desafiando nuestra comprensión, es así que el ovocito desempeña un papel insustituible en el estudio de la reproducción de animales de interés zootécnico y se convierte en un objeto clave para desentrañar los misterios de la biología reproductiva (Yang, 2023; Fair y Lonergan, 2024).

2.2.2 Desarrollo embrionario del ovocito, folículos y ovario

El proceso de formación de las células germinales se desarrolla en varias etapas clave: (I) generación de las células germinales primordiales (CGP); (II) migración de las CGP hacia el lugar donde se desarrollará la gónada; (III) colonización de las gónadas por parte de las CGP; (IV) diferenciación de las CGP en ovogonias; (V) proliferación de las ovogonias; (VI) inicio de la meiosis; y (VII) arresto meiótico en la etapa de diploteno de la profase I (Van Den Hurk y Zhao, 2005).

Desde la primera descripción del ovocito bovino han pasado 93 años (Hartman *et al.*, 1931). Los estudios coinciden en que el ovocito es la célula más grande y rara del cuerpo, y que posee una de las historias de vida más complejas (Gosden

et al., 1997). Esta fascinante historia comienza con las células germinales primordiales (CGP), que se diferenciarán en ovocitos primordiales durante el desarrollo embrionario (García y Gil, 2013).

Las CGP son células característicamente grandes, con un núcleo redondo que contiene uno o más nucleolos conspicuos, tienen pocas mitocondrias, polirribosomas, aparato de Golgi, partículas de glucógeno, gotas de lípidos y túbulos y cisternas del retículo endoplásmico (Picton, 2001). Durante la gastrulación del embrión, las CGP se diferencian y se localizan en el epitelio de la pared dorsal del saco vitelino, cerca de la base del alantoides, posteriormente migran hasta la cresta genital, alcanzando esta estructura a través la mesénquima espláncnico y del mesenterio dorsal (Rüsse y Sinowatz, 1991; García y Gil, 2013). Hay un debate sobre la migración de CGP, si se produce por movimientos ameboides impulsados por el citoesqueleto, o si estas células son impulsadas hacia adelante por el crecimiento del tejido adyacente (Freeman, 2003). La cresta genital aparece alrededor del día 27 de gestación, a través de la proliferación del epitelio celómico, la condensación del mesénquima circunscrito y la posterior colonización gradual de las CGP (Wrobel y Süß, 1998). En el ganado bovino, la diferenciación sexual ocurre alrededor del día 40-45 de gestación (Fair y Lonergan, 2024).

Una vez que las CGP se han diferenciado en ovogonias en el ovario en desarrollo, se dividen por mitosis y alcanzan el número máximo de células germinales interconectadas por puentes citoplasmáticos, formando sincitios (Cran y Moor, 1980). A medida que las CGP entran en meiosis, se denominan ovocitos, lo que ocurre alrededor de los 75-80 días post concepción (Aerts y Bols, 2010; Fair y Lonergan, 2024).

Después de que se inicia la meiosis, las células epiteliales que rodean a los sincitios envían procesos citoplasmáticos entre las ovogonias para individualizarlas y rodearlas con una única capa de células aplanadas, que darán origen a las células de la granulosa, de manera simultánea, se deposita una lámina basal en la superficie de las células de la granulosa, esta interrelación es

lo que se conoce como folículo primordial (Aerts y Bols, 2010; Tukur *et al.*, 2020). La lámina basal que delimita los ovocitos, lo convierte en una estructura avascular (Aerts y Bols, 2010). Por lo tanto, el correcto desarrollo prenatal del ovario, incluye la migración de células germinales, proliferación y asociación con células somáticas (Picton, 2001).

En bovinos, los folículos primordiales plenamente desarrollados están presentes en el feto en desarrollo con 90 días de gestación (Yang y Fortune, 2008), detectándose actividad de crecimiento folicular desde esa etapa fetal (Palma *et al.*, 2012) y prepuberal. Este desarrollo no se acompaña de una reanudación meiótica, por lo que el folículo sufre atresia (Luciano y Lodde, 2013).

Cuando la formación de los folículos primordiales, que son la unidad funcional del ovario en mamíferos (Banks, 1986; Tukur *et al.*, 2020), se completa aproximadamente entre los días 140-170 de gestación del embrión bovino (Fair y Lonergan, 2024), estos quedan embebidos en una matriz de fibroblastos, colágeno y fibras elásticas, lo cual origina la corteza ovárica, mientras que en la médula confluyen nervios, vasos sanguíneos y linfáticos (Hafez y Hafez, 2013). El ovario es rodeado por una capa de tejido conectivo colágeno denso denominada túnica albugínea y esta a su vez por una capa de epitelio germinal cúbico (Aerts y Bols, 2010).

La arquitectura histológica del ovario revela una delgada capa conocida como corteza ovárica, donde se encuentran todos los folículos primordiales (Hafez y Hafez, 2013). Esta capa presenta características avasculares, lo que sugiere que los folículos en reposo están protegidos del flujo sanguíneo por la limitada irrigación de la zona y el entorno brindado por las células de la granulosa (Picton, 2001). Las primeras ovogonias que entran en meiosis se localizan en las zonas más internas de la corteza ovárica y este proceso se extiende hacia afuera en forma de onda (Picton, 2001; Paulini *et al.*, 2014). En contraste, los folículos en crecimiento se encuentran en la región cortico-medular, la cual está altamente vascularizada, lo que indica que la activación y desarrollo de los folículos

depende de la disponibilidad de nutrientes, hormonas y factores de crecimiento presentes en la sangre (Picton, 2001).

2.2.3 Clasificación folicular

El desarrollo y regresión de los folículos está influenciado por cambios estructurales y funcionales que comprometen la calidad de los ovocitos, por ello, clasificarlos de manera precisa permite una comprensión más profunda de la dinámica folicular ovárica (Rodgers y Rodgers, 2010).

Una vez diferenciados los folículos primordiales en ganado bovino, alrededor del 80-95% de todos los folículos sufrirán apoptosis durante el desarrollo fetal, debido a que cuando el ovocito transita por las fases de leptoteno, cigoteno y paquiteno durante su desarrollo, se requieren proteínas reparadores de ADN y factores para una adecuada alineación y recombinación de cromosomas, lo que vuelve a los ovocitos extremadamente vulnerables y como resultado se degeneran (Van Den Hurk y Zhao, 2005). Por lo tanto, una hembra nace con una cantidad limitada de ovocitos (Segerson *et al.*, 1984). Las células pregranulosas asociadas a los folículos primordiales que sufrieron apoptosis no desaparecen, sino que se asocian a otros folículos primordiales que se mantienen (Araki, 2003; Van Den Hurk y Zhao, 2005; Scaramuzzi *et al.*, 2011).

Dicho suministro es variable en cada especie, e incluso se puede observar un efecto intra-especie, tal es el caso en el ganado *Bos indicus* en el que se ha estimado una reserva de 70, 576 (Lucci *et al.*, 2002) ovocitos primordiales, mientras que en ganado *Bos taurus* 89, 577 (Silva-Santos *et al.*, 2011). Además, dentro de la raza se puede observar cierta variabilidad, Murasawa *et al.* (2005), reportaron una correlación positiva entre el recuento ovocitario y el peso ovárico de vaquillas *Bos taurus* con una condición corporal aceptable.

Para el estudio de los ovocitos, algunos criterios para clasificar los folículos ováricos incluyen el tamaño, tipo y cantidad de células de la granulosa, si son dependientes o no de hormonas gonadotrópicas, e incluso la presencia o ausencia del antro folicular (Hulshof *et al.*, 1994; Rodgers y Rodgers, 2010). Braw-Tal y Yossefi (1997), propusieron una clasificación histológica específica

para la especie bovina (**Tabla 1**). Más recientemente Fair y Lonergan (2024), ampliaron esta clasificación al considerar la síntesis de ARN, el grado de metilación del ADN y el día de desarrollo en el ciclo de foliculogénesis (**Figura 1**). A pesar de ello, la terminología más ampliamente utilizada sigue describiendo los folículos como primordiales, primarios, secundarios y terciarios (Picton, 2001; Aerts y Bols, 2010).

2.2.3 Aspectos morfológicos en el crecimiento folicular y desarrollo ovocitario

La formación del folículo primordial marca el inicio del proceso de ovogénesis o producción de ovocitos (Tukur *et al.*, 2020). Tomando la premisa, que los folículos primordiales inicialmente tienen un periodo de quiescencia indefinido antes de adquirir su capacidad de activarse (Yang y Fortune, 2008), en el ganado se ha caracterizado la duración de un ciclo de foliculogénesis en 180 días, de los cuales 138-140 días son necesarios para la activación y desarrollo del folículo preantral (Lussier *et al.*, 1987; Roth, 2017). Después de su activación estos se transforman en folículos primarios, lo cual involucra cambios morfológicos en las células de la granulosa y orgánulos citoplasmáticos con el objetivo de cumplir con la creciente demanda de energía (Fair, 2009).

El **folículo primordial en reposo** se caracteriza por estar conformado por un ovocito inactivo, que atravesó las fases de leptoteno, cigoteno, paquiteno, deteniéndose en diploteno de la primera profase meiótica (Picton, 2001). Los ovocitos son ovoides a redondeados, con un citoplasma homogéneo, el núcleo en posición central o excéntrica rodeado por una envoltura lisa, con uno o dos nucleolos y la cromatina descondensada (Fair *et al.*, 1997). Presenta pocos orgánulos, donde las mitocondrias redondeadas son las más abundantes distribuidas aleatoriamente por todo el citoplasma (Gosden *et al.*, 1997). Además, se exhibe la presencia de gotas de lípidos que son las reservas energéticas de la célula, pocas cisternas del aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso y rugoso (Kacinskis *et al.*, 2005; Paulini *et al.*, 2014). El diámetro del folículo primordial es de aproximadamente 36-38 μm , del ovocito 25-28 μm y presenta 5-

8 células aplanadas de la granulosa (Kacinskis *et al.*, 2005; Langbeen *et al.*, 2015; Senbon *et al.*, 2003).

En comparación con los folículos inactivos, los **folículos primordiales activados** se diferencian por la presencia de una combinación de 5-14 células de la granulosa, que son tanto cúbicas y aplanadas (Fair *et al.*, 1997). Por otro lado, los **folículos primarios** estaban rodeados por una única capa de 8-20 células de la granulosa cubicas exclusivamente (Fair *et al.*, 1997). Este cambio en la forma de las células de la granulosa se debe presumiblemente a la actividad de replicación celular, ya que durante la profase las células se “redondean”, permitiendo de esta manera la formación de huso mitótico (Boucrot y Kirchhausen, 2008; Rosenblatt, 2008), además, se ha demostrado una mayor actividad mitótica en células de la granulosa cubicas en comparación con las planas (Da Silva-Buttkus *et al.*, 2008). A medida que avanzan las etapas de desarrollo, las mitocondrias y complejos de Golgi comienzan a migrar a la región cortical y el número de polirribosomas aumenta. En términos del tamaño, el ovocito experimenta un crecimiento concomitante de tamaño 31 μm y por ende un aumento en el tamaño de los folículos de $>47 \mu\text{m}$ (Kacinskis *et al.*, 2005; Senbon *et al.*, 2003).

Mientras que en las etapas anteriores los orgánulos comenzaban a migrar a la región cortical, en el **folículo secundario** se completa, dejando el espacio perinuclear desprovisto de orgánulos, de los cuales las mitocondrias siguen siendo los más abundantes (Paulini *et al.*, 2014). Estas mitocondrias adquieren un aspecto alargado, lo cual es indicativo de mayor actividad, acompañado por un aumento en el número del retículo endoplásmico y las cisternas del Golgi (Fair *et al.*, 1997; Basso y Esper, 2002). Las características más relevantes en esta etapa son la síntesis de la zona pelúcida, génesis de los gránulos corticales (GC) por parte del aparato de Golgi (Hyttel *et al.*, 1997) y el desarrollo de un sistema vascular propio (Jiang *et al.*, 2023). La morfología de las células de la granulosa permanece como en el folículo primario, pero se produce un aumento abrupto en su número, que oscila entre 41 y 250 células, mientras que el diámetro ovocitario y folicular aumentan a 44-68, 81-100 μm , respectivamente (**Tabla 1**) (Braw-Tal y

Yossefi, 1997; Kacinskis *et al.*, 2005; Fair y Lonergan, 2024). La progresión desde ovocito primario hasta secundario dura alrededor de 30 días en el ganado bovino (Lussier *et al.*, 1987).

La zona pelúcida y GC se interrelacionan en un sistema conocido como “bloqueo de la poliespermia”, donde la zona pelúcida, que es una capa glicoproteica que rodea al ovocito, actúa como el primer contacto del espermatozoide con esta célula durante la singamia, y a través de la interacción ligando-receptor se logra la fecundación (Hopper, 2021). Esto provoca una despolarización de la plasmalema ovocitaria y la consiguiente expulsión del contenido de los GC al espacio perivitelino, posterior a esto ocurre el endurecimiento de la zona pelúcida como principal respuesta para evitar la poliespermia (Senger, 2012).

El **folículo terciario** se caracteriza por la presencia de múltiples capas de células de la granulosa (Fair *et al.*, 1997), que se dividen en dos subpoblaciones: granulosa mural y cúmulo oóforo (Motta *et al.*, 2002). Además, se produce la diferenciación de las células de la teca externa e interna a través del estroma intersticial y formación del antro folicular (Fair, 2009). La aparición de esta cavidad es precoz en folículos con 120-160 μm en el ganado bovino (Lussier *et al.*, 1987), en comparación con porcinos (400 μm) (Morbeck *et al.*, 1992) y ovinos (220-300) (Turnbull *et al.*, 1977).

La organización de los organelos en el citoplasma ovocitario durante la fase del desarrollo folicular, adquiere una configuración homogénea acorde a su alto requerimiento metabólico, evidenciando un aumento adicional de mitocondrias alargadas, complejos de Golgi, gránulos corticales y gotas lipídicas (Fair *et al.*, 1997). Este desarrollo de folículo secundario a terciario tarda aproximadamente 30 días en ganado bovino (Lussier *et al.*, 1987). Durante este tiempo, el folículo y ovocito mantienen un crecimiento paralelo característico, hasta que el folículo alcanza un diámetro de 3 mm, a partir de esta etapa el ovocito deja de crecer alcanzando un diámetro máximo entre 120-130 μm , mientras que tamaño folicular casi se cuadruplica alcanzando una fase preovulatoria a los 15-18 mm, con un

ritmo de crecimiento en la etapa de selección-dominancia de 1-2 mm diarios (Lussier *et al.*, 1987; Lodde *et al.*, 2008; Fair, 2009).

2.2.4 Maduración del ovocito y su relación con el desarrollo folicular

Durante el desarrollo folicular, el ovocito adquiere competencia para su desarrollo hasta blastocisto, una vez que ocurre la ovulación, dicho potencial es fijo (Fair y Lonergan, 2024). Este proceso es extenso y complejo, ya que implica la maduración nuclear como citoplasmática, las cuales, aunque son procesos distintos, están interrelacionados. Debido a esta complejidad, la maduración citoplasmática se ha subdividido en redistribución de orgánulos, dinámica del citoesqueleto y maduración molecular (Ferreira *et al.*, 2009).

Se ha observado que algunos orgánulos en los ovocitos, como el complejo de Golgi, se organizan de manera independiente del centriolo. En las células somáticas durante la mitosis, las proteínas y los complejos de Golgi se distribuyen equitativamente entre las dos células hijas (Sun y Kim, 2013), mientras que, en los ovocitos durante la meiosis, la polaridad celular se altera para permitir la formación de los cuerpos polares (Ferreira *et al.*, 2009).

Las membranas del retículo endoplásmico son altamente dinámicas e interactúan con el citoesqueleto, desempeñando funciones clave como el plegamiento y degradación de proteínas, el metabolismo de lípidos, la compartimentación del núcleo, la regulación de gradientes de Ca^{2+} y la síntesis de membranas (Jiang *et al.*, 2023). Su papel en la regulación del Ca^{2+} es crucial, ya que este influye en los potenciales de membrana del oolema, lo que es fundamental para la activación del ovocito durante la fertilización y previene la poliespermia (Senger, 2012).

La transcripción permisiva durante el desarrollo embrionario es crucial, ya que en este periodo se producen moléculas antioxidantes como el glutatión y las peroxidasas, que capturan hidrogeniones (Ferreira *et al.*, 2009). Aunque una alta cantidad de mitocondrias en el ovocito se correlaciona con su desarrollo, no necesariamente indica alta calidad. Antes de la activación del genoma

embrionario (72 horas tras el cultivo), el embrión depende de la energía mitocondrial, lo que aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), creando un ambiente intracelular desfavorable que afecta la viabilidad del ovocito. Tras la activación del genoma, el embrión comienza a usar otras rutas metabólicas, como la glucólisis anaerobia, reduciendo la actividad mitocondrial (Ferreira *et al.*, 2009).

La ondulación de la envoltura nuclear y la reducción del tamaño del complejo de Golgi en la corteza del ovocito son indicativos de la maduración ovocitaria, observados en ovocitos con configuraciones vesícula germinal 2 y 3 (GV2 y GV3) provenientes de folículos preovulatorios antes del pico de LH (Hyttel *et al.*, 1997). En ovocitos de folículos atrésicos, estas características pueden estar presentes junto con signos de degeneración de los gránulos corticales y disminución de la comunicación de las proyecciones transzonales de las células del cúmulo, típicos de la atresia temprana (De Loos *et al.*, 1991).

Los eventos durante el proceso de maduración ovocitaria relacionados con el citoplasma son responsables de la competencia meiótica del ovocito, mientras que los factores nucleares son responsables de la competencia de desarrollo embrionario (Inoue *et al.*, 2008). En otras palabras, la capacidad del citoplasma del ovocito para activar el genoma ha sido demostrado con el desarrollo de la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT), donde el fundamento es reprogramar un núcleo diferenciado en el citoplasma de un ovocito madurado (Wilmot *et al.*, 1997).

2.2.5 Interacciones celulares en el folículo

La comunicación entre el ovocito y las células de la granulosa en los folículos primordiales y primarios, es llevado a cabo por un proceso endocítico, en el cual el ovocito se proyecta hacia el ooplasma de las células de la granulosa, mientras que, en folículos secundarios y fases posteriores, es mediado a través de uniones de hendidura o GAP (Hyttel *et al.*, 1997). A través de estas uniones, el ovocito coordina la diferenciación, proliferación y función de las células de la granulosa,

mientras que las células de la granulosa llevan a cabo tareas nutritivas y reguladoras con los ovocitos (Fair *et al.*, 1997).

Tomando como premisa que el folículo es un sincitio con líneas de intercomunicación bidireccional (Oktem y Oktay, 2008), se hipotetiza que el ovocito orchestra la foliculogénesis (Matzuk *et al.*, 2002; Aerts y Bols, 2010). Con los estudios del transcriptoma global de ovocitos y células del cúmulo, se han reportado ausencias de factores del ovocito bovino y de las células del cúmulo durante la maduración, cuando estos son separados, lo que indica una comunicación molecular cruzada entre ambos tipos celulares (Regassa *et al.*, 2011). Más recientemente se describieron factores asociados al ovocito (OSF, por sus siglas en inglés) (Buratini *et al.*, 2020), los cuales incrementan la secreción del péptido natriurético C (NPPC) en las células del cúmulo oóforo. Al activar los receptores de estas células, el NPPC participa en la señalización que mantiene el arresto meiótico del ovocito (Lima *et al.*, 2016).

Una vez formada la zona pelúcida, la intrincada comunicación entre el ovocito y las células de la granulosa continua a través de procesos citoplasmáticos transzonales (PCT), los cuales atraviesan esta estructura glicoproteína y más tarde, fijarán la corona radiada (De Loos *et al.*, 1991; Rüsse y Sinowatz, 1991). Las PCT internalizan en la zona pelúcida gracias a la presencia de poros, lo que indica que esta estructura es de naturaleza porosa, afectándose por un aumento en el número de dichos poros en la zona pelúcida (Báez *et al.*, 2019).

La sinergia de las PCT y las uniones GAP entre las células del cúmulo y el ovocito permite la entrega de piruvato, fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADPH) y pirofosfato de fosforibosilo (PRPP) al ovocito (Sutton-McDowall *et al.*, 2010). Además, las células del cúmulo, mediante la estimulación del péptido natriurético C (NPPC), entrega monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) al ovocito, lo cual inhibe la degradación de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), dicho mecanismo es el encargado de mantener el arresto meiótico (Zhang *et al.*, 2010). Paralelamente, los PCT entregan al ovocito ARNm poliadenilado, esencial

para la transcripción de los principales reguladores de la dinámica del citoesqueleto y del huso de actina (Macaulay *et al.*, 2016).

La producción de estrógenos en folículos antrales está controlada por un sistema conocido como “dos células, dos gonadotropinas”, donde la LH se une a sus receptores específicos en la teca interna, esta interacción provoca una cascada de catalizadores, donde el principal efecto es la transformación del colesterol en testosterona. Este andrógeno se difundirá a las células de la granulosa, donde por efecto de la FSH, se aromatiza convirtiendo la testosterona a estrógeno (Senger, 2012).

2.2.6 Cambios en la configuración de la cromatina del ovocito

La singularidad del ovocito como un ente general es impresionante, al igual que la descripción de cada uno de sus componentes. Tal es el caso de los cambios dinámicos, tanto morfológicos y fisiológicos, que ocurren en la cromatina del ovocito. La maduración nuclear de los ovocitos consta de cuatro etapas importantes: la vesícula germinal (GV, por sus siglas en inglés), descomposición de la vesícula germinal (GVBD, por sus siglas en inglés), metafase I (MI) y metafase II (MII) (Strączyńska *et al.*, 2022).

La primera característica de la meiosis I es el emparejamiento de cromosomas homólogos, seguido del intercambio de material genético mediante recombinación y su separación durante la citocinesis (Roeder, 1997; Zickler y Kleckner, 2015). Este arduo proceso ocurre en cinco fases diferentes: leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis (Van Den Hurk y Zhao, 2005). Debido a la complejidad de este proceso, la profase I es la etapa más prolongada de la meiosis I (Conti y Franciosi, 2018).

Una vez que el ovocito llega a la etapa de diploteno, ocurre un arresto meiótico (etapa de dictioteno), que en la vaca se prolongará hasta la pubertad y durante ese arresto sus cromosomas se dispersan y descondensan en el nucleoplasma, rodeándose posteriormente de una membrana nuclear intacta, denominándose a este estado vesícula germinal (GV, por sus siglas en inglés) (Luciano y Lodde,

2013). A su vez, durante el desarrollo folicular, el grado de condensación de la cromatina y su distribución espacial en los ovocitos cambia, subclasificándose en las configuraciones GV 0, GV 1, GV 2 y GV 3 (**Cuadro 2**), donde en la GV 0, la cromatina se encuentra descondensada con un patrón filamentosos difuso en toda el área nuclear. La GV 1 es similar a la GV 0, pero con algunos focos de condensación de la cromatina. La GV 2 presenta mayor condensación, en grumos o hebras en todo el nucleoplasma, mientras que la GV 3, la cromatina se consolida formando una masa condensada de aproximadamente 13-17 μm de diámetro, posteriormente ocurre la GVBD (Lodde *et al.*, 2008). El estudio de dicha subclasificación es biológicamente relevante, ya que la configuración de la cromatina es considerada un marcador de diferenciación y competencia de desarrollo del ovocito en investigaciones de diferentes especies (De La Fuente, 2006; Luciano y Lodde, 2013).

Cuadro 1 Características morfológicas y estructurales del compartimento nuclear en el ovocito bovino en relación con la configuración de la cromatina (Adaptada y modificada de Lodde *et al.* 2008).

	GV 0	GV 1	GV 2	GV 3
Núcleo	Excéntrico	Periférico	Periférico	Periférico
Ondulación de la envoltura nuclear	Casi ausente	Ligera	Profunda	Profunda
Nucleolo	Fibrilgranular	Denso fibrilar	Denso fibrilar	Denso fibrilar

Por otro lado, en cerdos, monos y humanos, al progresar la condensación de la cromatina ocurre la formación de un anillo sobre el nucleolo, denominándose a esta configuración como núcleo rodeado (SN, por sus siglas en inglés), mientras que cuando aún no es visible recibe el nombre de núcleo no rodeado (NSN, por sus siglas en inglés) (Bouniol-Baly *et al.*, 1999).

La estimulación de los receptores de la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) presentes en las células de la granulosa mural desencadena una serie de procesos bioquímicos, entre los se incluyen la producción de AMPc activación de la fosfolipasa C y liberación de Ca^{2+} (Mehlmann, 2013). En respuesta, el ovocito experimenta el paso de GV 0 a GVBD 12 horas después del pico de LH, dicho cambio en la configuración nuclear es considerada como la característica más visible de reanudación meiótica en el ovocito (Fair *et al.*, 1997; Hyttel *et al.*, 1997; Fair y Lonergan, 2024). Aproximadamente 3 horas después de la GVBD, se produce la alineación de los cromosomas en la metafase de la primera meiosis (MI) y la subsecuente extrusión del primer corpúsculo polar (Hyttel *et al.*, 1989). Posteriormente, en la metafase II (MII), ocurre otro arresto meiótico, que desaparece cuando el ovocito es fertilizado por el espermatozoide (Senger, 2012). Durante este arresto, el material genético del ovocito se encuentra dispuesto en cromosomas alineados, listos para su división y así formar el ovocito haploide (Downs, 1993).

Durante la fase permisiva de transcripción, la producción de ARNm es relativamente importante, dicho proceso se lleva a cabo durante el crecimiento del ovocito, antes de la transición de GV0 a GV3 ya que en esa fase se lleva a cabo un silenciamiento transcripcional por la compactación del genoma (Lodde *et al.*, 2017).

En el cromosoma del ovocito en MII, la unidad estructural básica es el nucleosoma (Lodde *et al.*, 2017). A su vez, los nucleosomas consisten en aproximadamente 146 pares de bases (pb) de ADN, enrolladas alrededor de un octámero compuesto por pares de las cuatro histonas principales (H2A, H2B, H3 y H4), mientras que la H1 actúa como histona enlazadora para empaquetar el nucleosoma en estructuras de orden superior (Wang *et al.*, 2017). Por lo tanto, en comparación de los espermatozoides, cuyas proteínas estructurales que compactan el ADN son las protaminas, en el ovocito son las histonas (Wang *et al.*, 2017).

Se han realizado ensamblajes del genoma de la vaca doméstica (*Bos taurus*), reportando un total de 2,857,605,192 pb, lo que representa el 91 % del genoma estimado, distribuido en 30 cromosomas, 29 autosomas y uno sexual (Zimin *et al.*, 2009). Según Doležel *et al.* (2003), 978×10^6 pb corresponde a un picogram (pg.), por lo que en bovinos el genoma de una célula haploide equivale a 2.9 pg. Este valor se relaciona con lo reportado por Benavides y Guénet (2003), quienes mencionan que el genoma haploide (1N,1C, donde “C” se refiere al contenido de ADN y “N” el número de conjuntos de cromosomas) en mamíferos es de 3 pg.

En los mamíferos domésticos, los ovocitos entran en meiosis desde la etapa fetal, deteniéndose en la etapa de diploteno de la profase I (configuración de GV) hasta que reciben el estímulo para desarrollarse o sufrir atresia (Albertini, 2015). Antes de la reanudación meiótica, que ocurre durante la maduración, el ovocito es 2N,4C, una vez completado la reanudación meiótica el ovocito avanza hasta MII donde expulsa un corpúsculo polar que contiene una mínima porción del citoplasma y un complemento de ADN ovocitario que es 1N,2C (Lonergan y Fair, 2016). Posteriormente, la fertilización por parte del espermatozoide (1N,1C) conduce a la extrusión del segundo corpúsculo polar (1N,1C), y tras completar la meiosis, el ovocito queda en el estado 1N,1C, lo que dará origen a un cigoto diploide (2N,2C) (Lonergan y Fair, 2016).

2.3 Indicadores visuales y morfológicos para selección ovocitaria

2.3.1 Morfología de estructuras ováricas

Uno de los primeros filtros para la obtención de CCO competentes de ovarios de rastro, es la selección de ovarios basados en la presentación o ausencia de estructuras relacionadas con el ciclo estral de la hembra bovina (Aguila *et al.*, 2020). En primeras investigaciones se observó un efecto negativo de folículos >10 mm en uno o ambos ovarios, donde la competencia ovocitaria para la producción de blastocistos y el nivel de apoptosis de células del cúmulo de estos folículos subordinados, eran los efectos detrimentales más notorios (Hagemann

et al., 1999). Por otro lado, Manjunatha *et al.* (2007) mencionan que en ovarios de búfalas el mayor desarrollo de embriones *in vitro* ocurrió en aquellos pares de ovarios con un cuerpo hemorrágico o cuerpo lúteo (CL) sin presencia del folículo dominante, mientras que, en pares de ovarios con un folículo dominante y CL la producción de embriones de folículos subordinados disminuyó. En estudios más recientes se ha demostrado que la presencia de un CL ipsilateral tiene efectos negativos en la competencia de desarrollo y expansión del cúmulo (Hajarian *et al.*, 2016; Quezada-Casasola *et al.*, 2018). En ovarios sin estructuras referentes a la ciclicidad del animal solo con menos de 10 folículos de 2-5 mm de diámetro sin ningún folículo >10 mm, los CCO presentan menor competencia de desarrollo (Gandolfi *et al.*, 1997).

Más recientemente se ha demostrado con el estudio de los diferentes tipos de configuración de la cromatina, que la selección basada en el tamaño folicular es un factor para la obtención de CCO con alta heterogeneidad en configuración de cromatina (Dieci *et al.*, 2016). En cada oleada folicular, la transición de GV1 a GV2 indica un alto potencial de desarrollo, con tamaños foliculares variados. Este cambio pasa cuando se hace lento el crecimiento folicular, en forma de meseta, posteriormente tras el aumento de la secreción de FSH y la aparición de folículos dominantes, la cromatina se compacta hasta llegar a GV3, dejando a estos ovocitos con dos vías, la ovulación o atresia, por lo tanto, los ovocitos GV1, GV2 y GV3 presentan competencia de desarrollo baja, alta y media respectivamente (Dieci *et al.*, 2016).

Por ello, la selección de ovarios con relación a las diferentes estructuras del ciclo estral en bovinos, podría ser un marcador poco invasivo para la obtención de CCO competentes para la producción de embriones *in vitro* (Aguila *et al.*, 2020), sin embargo, se presentan discrepancias de acuerdo a la información científica.

2.3.2 Morfología de los complejos cumulo ovocitos

En la recolección de CCO hay diversos factores intrínsecos que no se pueden controlar, como la raza, la fase del ciclo estral, edad, raza, estado metabólico, estado nutricional, niveles hormonales, entre otros (Moussa *et al.*, 2015).

Mientras que, los factores que si se pueden controlar son: el tiempo entre el sacrificio y extracción de ovarios, morfología de ovarios, métodos de obtención de CCO, temperatura de almacenamiento, medios de recolección, categorías de selección de CCO entre otros (Moussa *et al.*, 2015).

La cantidad de capas de células del cúmulo y la homogeneidad del citoplasma es otro marcador de calidad, reconocido desde 1990 cuando se describió por primera vez (De Loos *et al.*, 1989; Blondin y Sirard, 1995). De manera sucinta, la mejor calidad morfológica de los CCO es la clase uno, donde hay muchas capas del cúmulos y compactas; en la clase dos, presenta menos capas del cúmulos, parcial o total, con presencia de una ligera expansión; la clase tres, presenta una cantidad más reducida de células cumulares, citoplasma oscuro o con picnosis, cúmulos expandido; por último la clase cuatro, donde el ovocito no presenta células del cúmulos o si puede presentar, pero el citoplasma tiene presencia de picnosis moderada indicando atresia (Choi *et al.*, 2013; Moussa *et al.*, 2015). Esta clasificación tiende a variar entre laboratorios.

La importancia de las células del cúmulo con los ovocitos es de tipo nutritivas, de soporte y señalización (Albertini, 2015). Las células del cúmulo proporcionan al ovocito precursores energéticos como NADPH, piruvato y pirofosfato de fosforibosilo (PRPP) (Sutton-McDowall *et al.*, 2010). Se sabe que el ovocito recibe ARNm poliadenilado que usará hasta la activación del genoma embrionario, la cual ocurre 70 horas después de la fertilización (Macaulay *et al.*, 2016). Con el desarrollo de la genómica, se han buscado marcadores de calidad ovocitaria, tratando de comprender mejor la comunicación entre el ovocito y las células del cúmulo (Assidi y Sirard, 2013; Uyar *et al.*, 2013; Turathum *et al.*, 2021).

Se han realizado libros completos de investigaciones, donde se busca explicar cómo las categorías morfológicas influyen en la calidad ovocitaria. Boni *et al.* (2002) estudiaron las corrientes y reservas de Ca^{2+} en la membrana plasmática del ovocito y citoplasma respectivamente, donde concluyeron que estaban relacionadas con las categorías morfológicas y competencia de los CCO. Por otro lado, mencionan que los CCO con menos de cinco capas de células del cúmulo

presentan un menor clivaje, pero el potencial de desarrollo de los blastocistos era igual a los CCO con más de cinco capas de células (Boni *et al.*, 2002). Así mismo, De Bem *et al.* (2014) reportan que los CCO grado tres, tenían mejor tasa de desarrollo una vez que eran blastocistos que aquellos CCO grado dos e igual que los grado uno. De acuerdo a lo anterior, se ha generado un consenso en la utilización de ovocitos grado uno, dos y tres, aunque en algunas investigaciones esta última categoría se omite (Palma, 2001).

2.3.3 Expansión de las células del cúmulo

Un factor que se relaciona con la maduración ovocitaria, es la expansión del cúmulo, la cual se evalúa mediante la observación a las 0 h y a las 22 ± 2 h de MIV (Uyar *et al.*, 2013). La expansión del cúmulo es resultado de la ruptura de las GAP junctions, separación de células del cúmulo y mucificación (secreción de matriz extracelular) de la periferia del ovocito (Nevoral *et al.*, 2015). La secreción de la matriz extracelular, se realiza básicamente a través de una compleja señalización bioquímica entre las células del cúmulo y el ovocito, donde el principal resultado es la secreción de proteoglicanos, los cuales se sintetizan con proteínas de la plasmalema del cúmulo y glucosaminoglicanos, donde el ácido hialurónico es el principal componente (Tirone *et al.*, 1993).

Desde las primeras descripciones del proceso de expansión del cúmulo, se relacionó directamente con la competencia ovocitaria, sin embargo, se ha mencionado que su papel como marcador biológico de competencia es modesto (Choi *et al.*, 2001). Esto se apoya con las recientes investigaciones donde mencionan que la expansión está influenciada por múltiples señales hormonales (Turathum *et al.*, 2021) y de concentración de oxígeno (Turhan *et al.*, 2021). Recientemente Suebthawinkul *et al.* (2022), determinaron la tasa de expansión general del cúmulo en CCO de ratones, con 0.091 ± 0.002 $\mu\text{m}/\text{min}$, donde la velocidad de expansión máxima ocurrió durante las primeras 8 horas de maduración *in vitro*.

Hay diferentes métodos para la evaluación de la expansión del cúmulo, tales como la medida del área de expansión, espectrofotometría y cromatografía

líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés), donde la medición del área es la menos específica pero más fácil de realizar, mientras que, las otras dos técnicas son muy específicas, pero no se realizan rutinariamente (Nevoral *et al.*, 2015).

2.3.4 Azul brillante de cresil (BCB)

Desde que Ericsson *et al.* (1993) aportó una mejora en la selección de ovocitos porcinos con mayor competencia de desarrollo, el uso de la tinción BCB se ha extendido de manera exitosa a varias especies, como cerdos (Wongsrikeao *et al.*, 2006), ovejas (Catalá *et al.*, 2011) y bovinos (Alm *et al.*, 2005).

El azul brillante de cresil es un colorante tiazínico, cuya estructura bioquímica presenta un núcleo aromático con grupos aminos y sulfonatos, estas características le confieren la capacidad de absorber luz y el color característico que presenta. Se sintetiza a partir de compuestos de anilina y productos de condensación de fenotiazina (Ghica y Brett, 2009).

La vía del fosfato pentosa está presente en todos los organismos, producen NADPH actuando como un donador de electrones y facilitando reacciones de reducción en la biosíntesis de ácidos grasos, el colesterol, neurotransmisores, nucleótidos, GSH, y sintetiza azúcares de cinco carbonos (Kim *et al.*, 2012). Por lo tanto, la enzima G6PDH produce NADPH (Walker *et al.*, 2022).

Con el BCB se identifican los ovocitos que han completado su crecimiento y con ello su maduración citoplasmática (Alm *et al.*, 2005). El estudio de la G6PDH en ratones ha correlacionado de manera inversamente proporcional la actividad de dicha enzima y el nivel de maduración (Mangia y Epstein, 1975). Cuando la enzima está activa en CCO inmaduros, participa en la vía del fosfato de pentosa para producir la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NAPD+) y un ion de hidrógeno (H+) (Walker *et al.*, 2022). Por lo tanto, el tinte captura electrones (es un aceptor) de la cadena de transporte de los electrones, este es un proceso de reducción en donde el tinte no se desintegra, sino se reduce,

perdiendo su color característico (Ghica y Brett, 2009). Por lo tanto, la tinción BCB se usa como un marcador visual de la maduración ovocitaria.

Por lo tanto, el resultado visual de la prueba son ovocitos BCB[+], aquellos que permanecen teñidos, tienen baja G6PDH y completaron su maduración, mientras que los BCB-, aquellos que su citoplasma permanece incoloro, tienen alta actividad de la G6PDH y aun no completan su maduración (Torner *et al.*, 2008). La categorización de ovocitos a través del uso de BCB, se ha relacionado con un mayor diámetro (Wu *et al.*, 2007), mayor contenido de lípidos (Castaneda *et al.*, 2013), un mejor ordenamiento de mitocondrias (Castaneda *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013), formación y distribución de gránulos corticales a la periférica (Fu *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2013) con respecto a los BCB[-]. Además, con análisis transcriptómicos se han detectado diferencias entre los ovocitos BCB[+], BCB[-] y la comunicación con las células del cúmulo (Torner *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 2022). Al realizar un ciclo de IVEP con ovocitos BCB[+] y BCB[-], los BCB[+] presentan una mayor producción de blastocistos (Alm *et al.*, 2005; Wongsrikeao *et al.*, 2006; Torner *et al.*, 2008; Catalá *et al.*, 2011; Castaneda *et al.*, 2013).

Aunque se ha tenido éxito en la selección de ovocitos competentes con el uso de BCB, su difusión y aplicación aún son limitadas debido al aumento en los costos operativos, las modificaciones en los protocolos estándar y la variabilidad en los resultados (Iwasaki *et al.*, 2018; Walker *et al.*, 2022). Pawlak *et al.* (2011) demostró en CCO de cerdas prepúberes una disminución en la proporción de ovocitos que alcanzan la MII y un aumento en la incidencia de anomalías cromosómicas en comparación con un grupo control, además, encontraron un aumento en la apoptosis de los ovocitos por la tinción BCB (Pawlak *et al.*, 2014; Ghoneimy *et al.*, 2017)

2.3.5 Tinción de orceína

La orceína es un colorante natural y actualmente ya se sintetiza, derivado de líquenes, se utiliza en histología y citoquinética, para la tinción de cromosomas y fibras elásticas (Barcat, 2003).

Desde que se descubrió que tiñe los cromosomas en 1949, se ha utilizado activamente para estudio de células en división. El fundamento es su capacidad de teñir cromosomas debido a su alta afinidad por las histonas, proteínas asociadas a la cromatina condensada (Barcat, 2003; Lille y Conn, 1969). La técnica consiste en fijar la muestra en una solución Carnoy's, la cual debido a su naturaleza permite mantener la estructura del ADN y ARN y posteriormente teñir la muestra con una tinción de aceto-orceína al 1% (K-state, 2018).

En la biología reproductiva se usa ampliamente para evaluar la progresión meiótica de los ovocitos, confirmando su avance de acuerdo a la remodelación de la cromatina del ovocito (Prentice-Biensch *et al.*, 2012; Camacho de Gutiérrez *et al.*, 2024).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología aplicada y el manejo de los animales para la obtención del material biológico se llevó a cabo siguiendo las pautas para el uso ético, el cuidado y bienestar de los animales de investigación a nivel internacional (Fass, 1999) y nacional (Norma Oficial Mexicana, 1999).

3.1 Localización del área de estudio

El presente estudio se realizó en la Comarca Lagunera, presenta una latitud 25° 32' Norte y longitud 103° 27' Oeste a 1,120 metros sobre el nivel del mar. El clima es semiárido cálido BSh (García et al., 1998) con una temperatura media anual de 25 °C, con máximas de 45 °C (mayo-agosto) y mínimas de -5 °C (enero), humedad relativa del 20-25 %, con precipitaciones de junio a septiembre con un promedio anual de 266 mm (INEGI, 2021).

3.2 Obtención y transporte de muestras

Se utilizaron 177 ovarios de vacas de la raza Holstein Friesian, clínicamente sanas, ciclando, con más de 5 folículos mayores a 6mm y sin anomalías estructurales visibles en el ovario, tejido circundante y útero. Los ovarios se obtuvieron del rastro Tipo Inspección Federal (TIF) 243 de Torreón (SENASICA, 2024), el tiempo promedio de colección de ovarios fue de 85 ± 20 minutos.

Los ovarios fueron almacenados en un termo con solución salina fisiológica (SSF, 0.9 % NaCl, Flex-o-val ®, PISA farmacéutica) a temperatura de 37 °C adicionada con 1 mg/ml de gentamicina (Internacional Prode ®), el control de la temperatura se realizó por medio de termómetro de laboratorio de vidrio (Brannan Lo-tox). Se transportaron al Centro de Biotecnología de la Reproducción (CBR) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna (UAAAN-UL).

3.3 Procesamiento de ovarios y obtención de complejos cúmulos ovocito

Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron desinfectados con alcohol al 70 % (Alfimax) y posteriormente se mantuvieron en solución salina fisiológica

adicionada con 1 mg/ml de gentamicina en baño maría (Termo baño serie 400, Felisa) de 37 °C.

Folículos de 6-10 mm de diámetro, fueron aspirados por medio de una jeringa montada con aguja de 18 G x 1.5'. El licor folicular aspirado, se depositó en un tubo falcon de 50 mL (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, Estados Unidos), que contenía SSF atemperada. La aspiración en cada una de las repeticiones fue realizada por los mismos técnicos en un tiempo promedio de 36 ± 11 minutos.

Para la búsqueda de los CCO's se prepararon placas de cultivo rodac de búsqueda de 90 mm (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, Estados Unidos), previamente tratadas con 7 ml de SSF a 37 °C y 3 ml de solución buffer fosfato (PBS, Gibco) adicionada con albumina sérica bovina al 1 % (BSA; Goldbio, Ashby Rd., St. Louis, MO).

3.4 Selección y clasificación de los CCO

La búsqueda de los CCO's la realizaron técnicos entrenados, donde a través de microscopia estereoscópica (EMZ 66381, Meiji techno Co., LTD, Tokio Japón) se clasificaron 805 CCO's utilizando el criterio de capas de células del cúmulo (CC) y homogeneidad del citoplasma, descrito por Choi *et al.* (2013), donde la categoría 1: presenta más de 5 capas CC, compactas y citoplasma homogéneo; categoría 2: más de 3 capas de CC, compactas y evidencia de una leve picnosis en citoplasma; categoría 3: capas de CC incompletas, citoplasma heterogéneo; categoría 4: parcial/totalmente desnudo o CC con evidencia de expansión, citoplasma muy heterogéneo.

Los CCO's se colocaron en una placa rodac de 90 mm con cuatro gotas, una por categoría, cada gota 150 µl de medio Wash (IVF-Bioscience, Reino Unido) adicionadas con 0.3 % de BSA y sobre una platina térmica a 37 °C.

Clasificados los CCO's, de cada categoría se tomó de manera aleatoria la mitad y fue identificado como grupo control, el resto fue el grupo tratado con la tinción BCB, este a su vez se dividió en los grupos BCB[+] y BCB[-].

3.5 Determinación de la actividad de la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa por la tinción BCB

Los CCO's fueron teñidos con BCB (Fagalab) según el método descrito por Torner *et al.* (2008), con algunas modificaciones. Se expusieron a 26 μM de BCB diluidos en 50 μl de medio BO-IVM (IVF-Bioscience, Reino Unido) durante 90 minutos a 38.5 °C en una atmósfera humidificada. Los CCO's se clasificaron como BCB[+], aquellos con citoplasma de color azul/violeta en distintos grados, y BCB[-], aquellos con citoplasma incoloro.

Grupos de 15 a 20 CCO's fueron colocados en gotas de 100 μl de medio BO-IVM cubiertas con aceite mineral (IVF-Bioscience, Reino Unido) y sometidos a maduración en una atmósfera a 38.5 °C, 5 % de CO_2 y humedad controlada durante 24 horas

3.6 Evaluación del índice de expansión

Las imágenes de los CCO's a las 0 h y 24 h de MIV se capturaron con la cámara de un teléfono celular (iPhone 11, Apple Inc., Zhengzhou, China; resolución de 12 MP) acoplada a un microscopio estereoscópico con aumento de 2x. Las imágenes se guardaron en formato PNG con una resolución de 4032 x 3024 píxeles, manteniendo las mismas configuraciones de enfoque en el microscopio y la cámara en todas las evaluaciones.

Se evaluó el área de los CCO's en las imágenes tomadas a las 0 h y 24 h de maduración siguiendo el protocolo descrito por Raes *et al.* (2023), con algunas modificaciones. Utilizando el programa ImageJ (NHI, versión 1.53k; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>), se delineó el contorno de los CCO's con la herramienta de selección a mano alzada para obtener el área seleccionada. Como escala se usó una fotografía de una cámara de Neubauer (Improved Neubauer Bright-Line, HBG, Precicolor, Alemania) con las mismas condiciones de aumento. Los resultados de las áreas se expresaron en micrómetros (μm). El

índice de expansión (IE) se calculó por grupo de maduración utilizando una fórmula modificada de Raes *et al.* (2023)

$$IE = \frac{\text{Área 24 h de MIV}}{\text{Área 0 h de MIV}}$$

3.7 Evaluación de la progresión meiótica

Después de 24 horas de MIV, se realizó la decumulación de los CCO's mediante pipeteo en medio Wash. Los ovocitos desnudos se colocaron en una solución de Carnoy (K-state, 2018), compuesta por etanol (J.T. Baker) y ácido acético (Fermont) en una proporción 3:1 (v/v), durante 48 horas en una placa Nunc de 4 pozos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) a 4 °C. Posteriormente, los ovocitos se montaron portaobjetos, se tiñeron con acetoorceína (45 % de ácido acético con 1 % de orceína; Thermo Fisher Scientific) y se cubrieron con un cubreobjetos sostenido por una mezcla de vaselina y dentífrico (9:1 v/v) para su evaluación bajo un microscopio óptico con aumento de 400x (MT5000, Meiji Techno Co., Ltd, Tokio, Japón).

La progresión meiótica se clasificó en cuatro categorías: vesícula germinal (VG), cuando se observaba la envoltura nuclear y ADN descondensado; metafase I (MI), para ovocitos sin envoltura nuclear, con ADN compacto y formación de placa metafásica; metafase II (MII), con dos acúmulos de cromatina o en anafase/telofase; y degenerados, cuando no se observaban acúmulos de cromatina (Figura 1) (Hewitt *et al.*, 1998). Los resultados se expresaron como conteo de cada categoría de progresión meiótica

3.8 Diseño experimental

Se realizaron 6 réplicas del experimento bajo un diseño completamente al azar. Los CCO's de las categorías 1, 2 y 3, sin mezclarse entre sí, se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos experimentales: un grupo Control (n=253) y un grupo Tratado (n=325). En el grupo Tratado, al determinar la actividad de la

enzima G6PDH mediante BCB, se subdividieron en dos categorías: BCB[+] (n=184) y BCB[-] (n=141). Tras la MIV, se midió el índice de expansión y la progresión meiótica en los tres grupos experimentales.

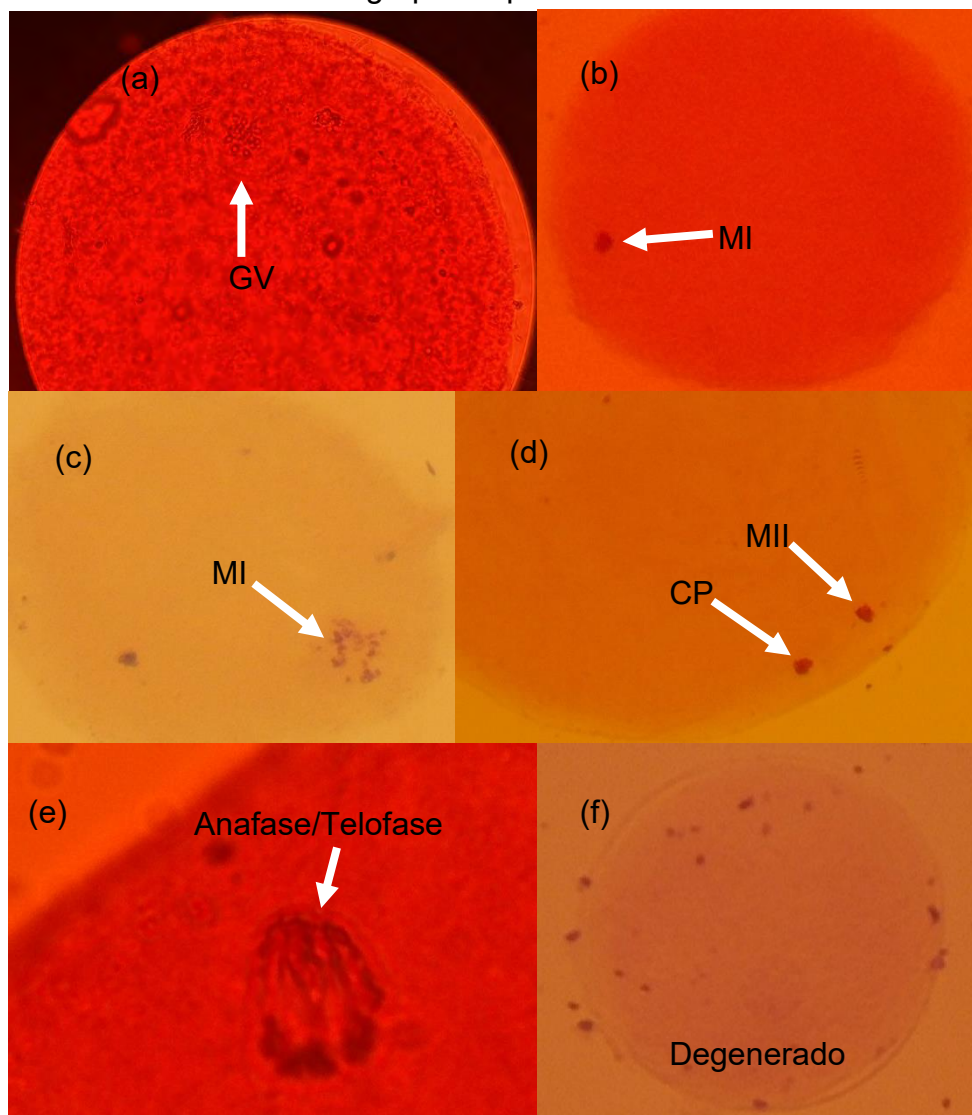


Figura 1. Fotografías representativas de las configuraciones de cromatina en ovocitos bovinos. (a) ovocito en GVI con acumulos de condensación de ADN y presencia de membrana nuclear. (b) ovocito en MI con cromatina compacta sin presencia de membrana nuclear. (c) ovocito en MI con cromatina en formación de la placa metafásica. (d) ovocito en MII con presencia de corpusculo polar (CP) y acumulo de cromatina ovocitario. (e) Ovocito en anafase/telofase con placa metafásica visible en la primera división meiótica. (e) ovocito degenerado sin presencia visible de acumulo de cromatina.

3.9 Análisis estadístico

Los datos fueron recopilados, ordenados y depurados en Excel (Microsoft, 2023, ver. 16.78.3). La homocedasticidad se evaluó con la prueba de Levene y la normalidad con Shapiro-Wilk. Se usó una prueba chi-cuadrada de bondad de ajuste para analizar la distribución de CCO BCB+ y BCB- por categoría morfológica y en total. El índice de expansión se evaluó entre grupos mediante un modelo lineal generalizado (GLM) con distribución Gamma. La distribución de las fases meióticas se analizó con un modelo Poisson y pruebas post hoc con ajuste Bonferroni. La asociación entre los grupos experimentales y la categoría morfológica se evaluó mediante regresión logística multinomial, con pruebas de bondad de ajuste y predicciones. Se calcularon correlaciones de Spearman entre las variables estudiadas. Los análisis se realizaron en R ver. 4.4.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Boston, MA, USA). Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 177 ovarios de vacas Holstein se aspiraron en 6 replicas obteniendo 805 CCO's, los cuales fueron clasificados en categorías morfológicas 1, 2, 3 y 4, de acuerdo a la cantidad de capas de células del cúmulo y homogeneidad del citoplasma. La categoría 1 representó el 17.8 % (n=143), la categoría 2 el 25.7 % (n=207), la categoría 3 el 28.3 % (n=228) y la categoría 4 el 28.2 % (n=227) (**Tabla 3**). Samaniego *et al.*, (2017), clasifica los CCO's de categoría 1 y 2 como "óptimos" para IVPE, por ende, en este estudio se obtuvo un total de 43.5 % de CCO's óptimos. Este porcentaje fue menor a los obtenidos por Estrella *et al.*, (2017) quienes reportan un total de 66 % de CCO's óptimos recuperados de folículos de 4-8 mm. Así mismo, Perea *et al.*, (2017), utilizaron una bomba de aspiración ajustada a 66 mmHg reportaron un 88.7 %. Contrastando estos resultados, queda de evidencia que la técnica y presión de aspiración es un factor a tomar en cuenta.

La proporción de CCO's por ovario fue de 4.5 (**Tabla 2**), lo cual se considera baja al compararla con los estudios de Wang *et al.* (2007) y Marc-Zarcuła *et al.* (2015), quienes reportaron 8.55 y 9.7 CCO's por ovario, respectivamente. Esto puede deberse a la raza utilizada en este estudio, que fue Holstein, ya que como se ha descrito anteriormente, su producción de CCO's es relativamente baja (Morales-Cruz *et al.*, 2023). Además, en presencia de estrés calórico, con índice de temperatura-humedad (ITH) mayor a 68 en la Comarca Lagunera (Rodríguez-Venegas *et al.*, 2022) durante el desarrollo del experimento, la población folículos pequeños (3-5 mm) y medianos (6-8 mm) disminuye (Wolfenson *et al.*, 1995), así como la calidad de los CCO's (Roth, 2017).

Cuadro 2. Complejos cúmulos ovocitos (CCO's) obtenidos por aspiración folicular con jeringa y clasificados en categorías morfológicas.

	Clasificación morfológica				Total, CCO's	CCO's por ovario
	Cat. 1	Cat. 2	Cat. 3	Cat. 4		
Total	143	207	228	227	805	4.5
Porcentaje (%)	17.8	25.7	28.3	28.2	100	

Al evaluar la actividad de la G6PDH por categoría morfológica (**Figura 2a**), se observó en la categoría 1 mayor cantidad de CCO's BCB[+] a comparación del grupo BCB[-], 64.7 % (n=44) y 35.3 % (n=24) ($p < 0.05$), respectivamente. Para las categorías 2, 3 y 4, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$). Sin embargo, numéricamente se observó un incremento de aproximadamente 4.9 % CCO's BCB[-] por cada aumento en la categoría morfológica, mientras que, el número de CCO's BCB[+] disminuyó proporcionalmente. Por otro lado, en este estudio se evidencia que la tinción de BCB está influenciada por la categoría morfológica, lo que concuerda con los hallazgos de (Pujol *et al.*, 2004; Alm *et al.*, 2005; Samaniego *et al.*, 2017).

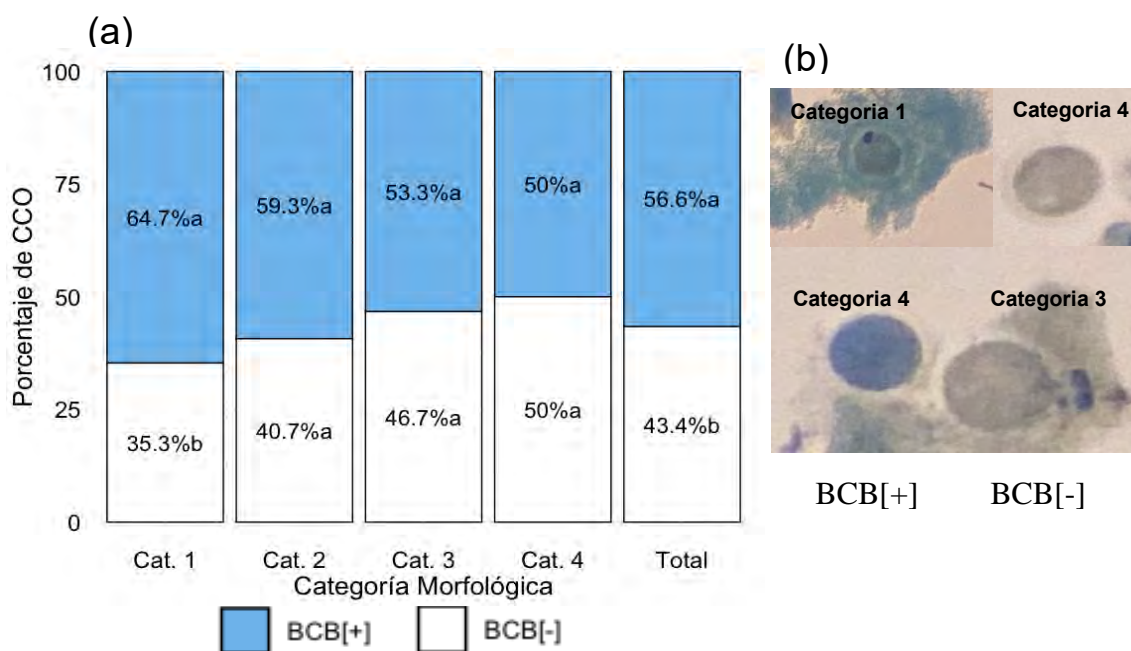


Figura 2. Evaluación de G6PDH (a) porcentaje de BCB[+] y BCB[-] por categoría morfológica y en total. (b) fotografías que representan la tinción del citoplasma en CCO's con BCB en diferentes categorías. Los grupos marcados con letras diferentes son estadísticamente diferentes, χ^2 -tes, ($p < 0.05$).

En el total de todas las categorías (**Figura 2a**), se observó un recuento significativamente mayor de CCO's BCB[+] del 56.6 % (n = 184), a comparación de CCO's BCB[-] del 43.38 % (n = 141) ($p < 0.05$). En este estudio, se obtuvo una mayor proporción de CCO's BCB[+] (56.6 %) en total de las categorías, en

comparación con el 43 % reportado por Walker *et al.* (2022). Este mayor porcentaje de BCB[+] en nuestro estudio probablemente se deba a que se aspiraron únicamente folículos de 6-10 mm, mientras que Walker *et al.* (2022) aspiraron folículos de 3-8 mm. Lonergan *et al.* (1994) reportan que CCO's de folículos de 2-6 mm, presentan menor crecimiento y competencia que aquellos recuperados de folículos mayores a 6 mm.

Al cuantificar el índice de expansión a las 0 h y a las 24 h de maduración (**Figura 3a**), el grupo BCB[+] mostró un mayor índice de expansión (1.99 ± 0.10) en comparación con el grupo Control (1.80 ± 0.05) y el grupo BCB[-] (1.19 ± 0.07) ($p < 0.0001$). Estos resultados sugieren que los CCO's BCB[+], tienen un mayor potencial de expansión del cúmulus, lo cual es consistente con los resultados de Lee *et al.* (2020), quienes reportan una expansión mayor en los ovocitos BCB[+]. De acuerdo en la **figura 2a**, en este estudio la mayor cantidad de CCO's BCB[-] son en mayor proporción de categoría 2 y 3, donde la presencia de capas del cúmulo es menor a comparación de los BCB[+] donde la categoría 1 es predominante, por ende, en los CCO's BCB[-] el índice de expansión se ve

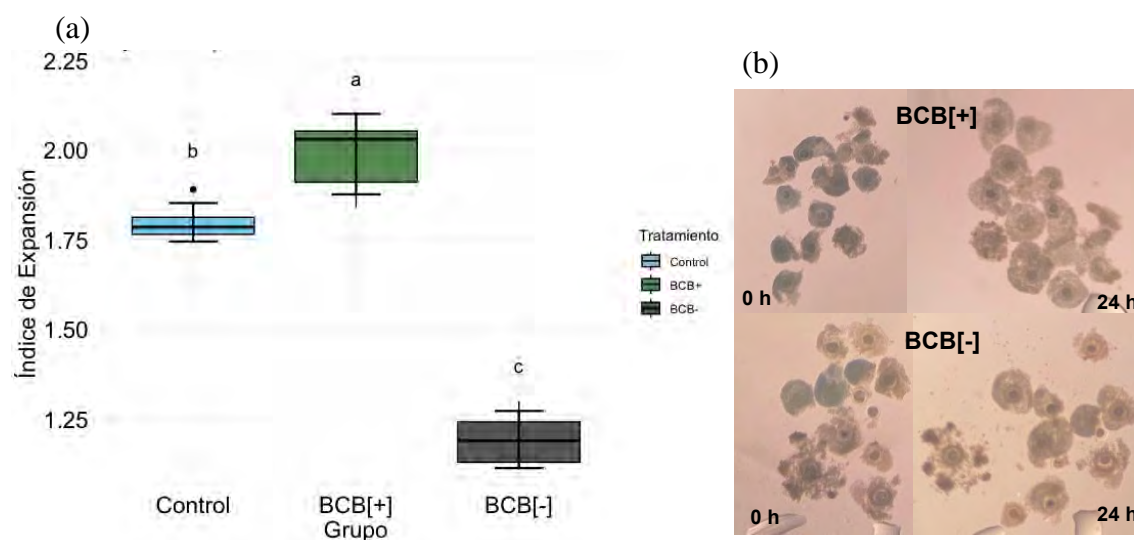


Figura 3. Índice de expansión con rango intercuartil. (a) cuantificación del índice de expansión de las CC's en CCO's por grupo. (d) fotografías a 0 h y 24 h después de la maduración en grupos BCB[+] y BCB[-]. Los grupos marcados con letras diferentes (a, b, c) son significativamente diferentes ($p < 0.0001$).

disminuido, probablemente a la menor cantidad de capas de CC's en este grupo. En el grupo control no se realizó cuantificación BCB[+] y BCB[-], asimilando un proceso rutinario de IVPE, lo que podría explicar las diferencias con el grupo BCB[+], ya que en el grupo Control se pondera el índice de expansión de los CCO's.

La progresión meiótica a MII, en este estudio muestra una correlación moderada, positiva y significativa ($p < 0.01$) con el índice de expansión, con un coeficiente de Spearman rho de 0.585 (**Figura 4a**).

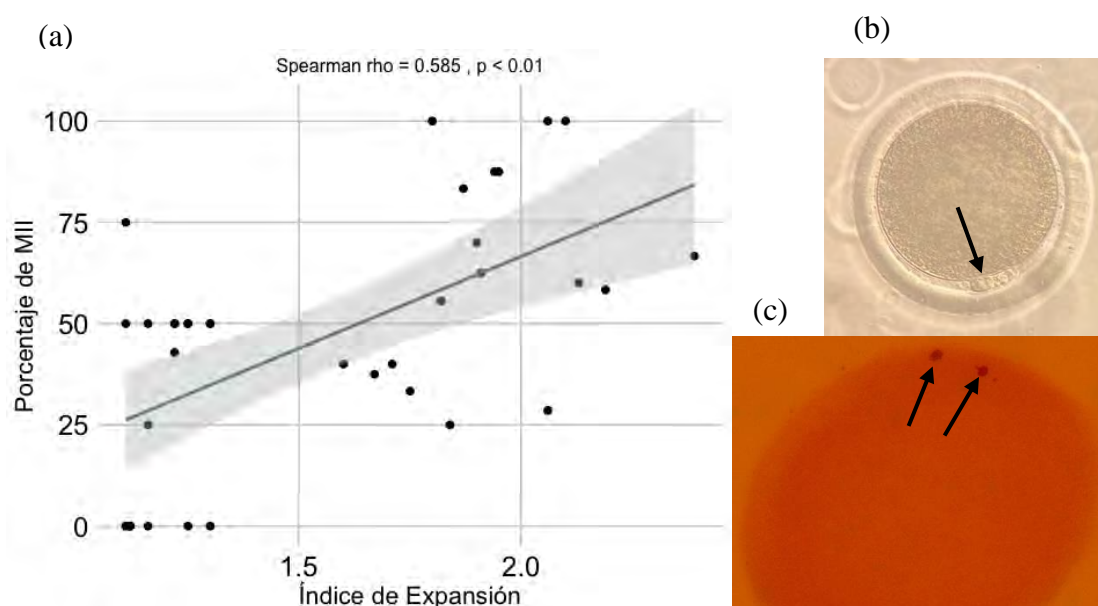


Figura 4. (a) correlación entre la categoría morfológica y el porcentaje de progresión meiótica hasta MII. (b) fotografía *in toto* de ovocito en MII por medio de microscopia de campo claro, con la flecha se señala el corpúsculo polar. (c) fotografía *in toto* de ovocito en MII teñido con aceto-orceina al 1%, con las flechas se señala el corpúsculo polar y cromatina compacta del ovocito.

Si bien medir el área de expansión del cúmulo es un método no invasivo, es poco específico para evaluar la competencia de los CCO's (Uyar *et al.*, 2013), sin embargo, se relaciona íntimamente con la reanudación meiótica del ovocito (Lonergan y Fair, 2016). El ovocito y el cúmulo forman un sincitio de intercomunicación activa mediada por proyecciones transzonales y uniones GAP

(Aerts y Bols, 2010), lo que permite una comunicación bidireccional con mensajeros menores a 1kDa (Nevoral *et al.*, 2015). El AMPc es el principal mensajero que mantiene el arresto meiótico de los ovocitos, y una vez que esta comunicación se interrumpe, comienza la reanudación meiótica (Fair y Lonergan, 2024). Por ello, la expansión del cúmulo se considera en los ciclos de IVPE, aunque no es el mejor marcador de competencia ovocitaria (Uyar *et al.*, 2013). Esto se debe a que la expansión es un evento fisiológico durante el cual las uniones GAP se degradan por diversos procesos bioquímicos (Mehlmann, 2013), perdiendo su estructura compacta. Además, las CC's secretan una matriz extracelular compuesta de glucosaminoglicanos (Assidi y Sirard, 2013) rica específicamente en ácido hialurónico (Banks, 1986), que convierte la periferia del ovocito en un medio altamente hidrofílico, facilitando su captación en el infundíbulo, la fertilización y la reducción de la poliespermia (Nevoral *et al.*, 2015). La expansión también está influenciada por múltiples señales hormonales (Turathum *et al.*, 2021) y de concentración de oxígeno (Turhan *et al.*, 2021).

Por otro lado, la cantidad de capas de células del cúmulo y la homogeneidad citoplasmática del ovocito es otro marcador de calidad, reconocido desde 1990 cuando se describió por primera vez (De Loos *et al.*, 1989; Blondin y Sirard, 1995). Las células del cúmulo proporcionan al ovocito precursores energéticos como piruvato y pirofosfato de fosforibosilo (PRPP) (Sutton-McDowall *et al.*, 2010). Se sabe que el ovocito recibe ARNm poliadenilado que usará hasta la activación del genoma embrionario, lo cual ocurre 70 horas después de la fertilización (Macaulay *et al.*, 2016). Con el desarrollo de la genómica, se han buscado marcadores de calidad ovocitaria a base de expresión de genes, tratando de comprender la comunicación entre el ovocito y las CC's (Assidi y Sirard, 2013; Uyar *et al.*, 2013; Turathum *et al.*, 2021).

La progresión meiótica, evaluada mediante tinción con aceto-orceína al 1% en ovocitos con 24 horas de MIV, no mostró una diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los grupos BCB[+] (62.7 %) y Control (47.4 %), mientras que el grupo BCB[-] (22.2 %) fue significativamente menor ($p < 0.05$). Así mismo, la tasa de MI fue

significativamente mayor ($p < 0.05$) en ovocitos BCB[-], a comparación de los grupos BCB[+] y Control (**Tabla 3**). Cabe destacar que el grupo Control simula un proceso estándar de MIV, en el que no se emplean protocolos de tinción como método de selección ovocitaria. La competencia meiótica en los ovocitos que alcanzaron MII en este estudio fue menor en comparación con los resultados de Alm *et al.* (2005), quien en su estudio reporta 77.1 %, 72.5 % y 58.1 % de MII en los grupos Control, BCB[+] y BCB[-], respectivamente. Así mismo, Satrio *et al.* (2022) y Camacho de Gutiérrez *et al.* (2024) también reportan porcentajes de MII mayores, en un 75.3 % y 81.9 % respectivamente.

Cuadro 3. Progresión meiótica de ovocitos bovinos 24 horas después de la maduración in vitro de los grupos experimentales.

Grupo	% GV (n)	% MI (n)	% MII (n)	% Degenerado (n)
Control (n=135)	10.4 (14/135)	39.3 ^b (53/135)	47.4 ^a (64/135)	3 (4/135)
BCB[+] (n=134)	4.5 (6/134)	30.6 ^b (41/134)	62.7 ^a (84/134)	2.2 (3/134)
BCB[-] (n=45)	17.8 (8/45)	57.8 ^a (26/45)	22.2 ^b (10/45)	2.2 (1/45)

Los resultados se expresan como porcentaje y en paréntesis en número de ovocitos.

^{ab} los valores con distinta literal dentro de columna indican grupos diferentes ($p < 0.05$).

Los ovarios de rastro representan la fuente más común y accesible de CCO's para investigaciones científicas. La calidad de estos CCO's está influenciada por diversos factores como la edad de la donante, la fase del ciclo estral, el estado nutricional, el potencial genético y la presencia de problemas reproductivos subclínicos (Moussa *et al.*, 2015; Lonergan y Fair, 2016). Esto hace que sea casi imposible obtener una población homogénea de CCO's, reflejándose este hecho en su capacidad de maduración y desarrollo embrionario (Blondin y Sirard, 1995). No obstante, esta heterogeneidad no impide realizar investigaciones con este tipo de material biológico, que en su mayoría es desechado.

La baja tasa de MII en este estudio se podría deberse a que el proceso de foliculogénesis en el ganado bovino dura aproximadamente 180 días (Lussier *et al.*, 1987), desde que el ovocito primordial recibe la señal (Picton, 2001), comienza a crecer, completa el proceso de maduración y ovula (Ferreira *et al.*, 2009; Lussier *et al.*, 1987). Los ovocitos empleados en este estudio fueron recuperados en el mes de octubre, lo que implica que la activación de estos folículos primordiales ocurrió en abril (Lussier *et al.*, 1987), todo el proceso de desarrollo folicular fue durante un periodo de estrés calórico en la región de la Comarca Lagunera (Rodríguez-Venegas *et al.*, 2022). Uno de los factores más relevantes asociados al estrés calórico es el estrés oxidativo (Roth, 2017), el cual resulta perjudicial para la estructura molecular y nuclear del ovocito (Agarwal *et al.*, 2005; Almansa-Ordonez *et al.*, 2020), reduciendo así su calidad intrínseca (Aguila *et al.*, 2020). Aunque en este estudio se utilizó el BCB como método de tinción diferencial para determinar de manera indirecta la actividad de la enzima G6PDH y seleccionar ovocitos competentes (Torner *et al.*, 2008), no se ha evaluado ni relacionado específicamente la actividad de dicha enzima en ovocitos de vacas Holstein expuestos a estrés calórico y oxidativo.

Hasta este momento de la discusión, resulta razonable la siguiente pregunta: ¿Por qué gran proporción de los ovocitos activaron la progresión meiótica, llegaron a MI pero no siguieron a MII? esto debido probablemente a la gran cantidad de factores que se pueden relacionar, como un posible daño al ADN de los ovocitos a consecuencia del estrés oxidativo. Lo cual se sustenta con que los ovocitos, a diferencia de una célula somática no tiene la ingeniería molecular y enzimática suficiente para reparar los insultos hacia el ADN, por lo que un ovocito con daño moderado puede progresar a MII y ser fertilizado (Carroll y Marangos, 2013), sin embargo, cuando el insulto al ADN sobrepasa el umbral permisivo de daño, el ovocito detiene su meiosis y queda en MI, debido a la deficiencia del ensamblaje del huso meiótico (Collins *et al.*, 2015; Marangos *et al.*, 2015; Rémillard-Labrosse *et al.*, 2020). Por lo tanto, implicaciones de este experimento, podrían resultar en estudios posteriores que asocien el ITH, la fragmentación de ADN, la detención meiótica en ovocitos de vacas Holstein y la exposición a BCB.

En este mismo contexto, la biología reproductiva en ganado lechero altamente especializado es un proceso que demanda una gran cantidad de energía, similar a lo que ocurre en otras especies domésticas (Hansen, 2014). Aunado a ello, durante el periodo de transición, las vacas Holstein experimentan un elevado gasto energético (Rastani *et al.*, 2005). Este proceso catabólico generalmente no puede ser compensado completamente mediante la ingesta de alimento, lo que lleva a un estado conocido como balance energético negativo (Rastani *et al.*, 2005; van Knegsel *et al.*, 2013; Kok *et al.*, 2019). Este estado provoca un aumento en los niveles de ácidos grasos libres (AGL) que, a través del flujo sanguíneo, llegan al líquido folicular y exponen a los CCO's a altas concentraciones de AGL. Esto, particularmente con los ácidos grasos saturados, reduce la competencia ovocitaria (Marei *et al.*, 2017). Este fenómeno podría explicar la disminución observada en la cantidad de ovocitos que alcanzan la etapa de MII en este estudio.

Se calcularon las probabilidades de progresión meiótica en función de los niveles de clasificación morfológica y del grupo BCB, observándose una interacción significativa ($p < 0.0001$) entre la categoría morfológica y los grupos BCB[+], BCB[-] y control (**Figura 5**). Como se esperaba, los ovocitos clasificados como BCB[+] y de categoría morfológica 1 presentaron una probabilidad del 75 % de llegar a la fase MII, mientras que en la categoría 3 la probabilidad disminuyó al 40 %. En contraste, los ovocitos pertenecientes al grupo BCB[-] con categoría 1 alcanzaron una probabilidad del 50% de progresar a MII. Por otro lado, los ovocitos del grupo control, sin selección por BCB, y clasificados como categoría 1, mostraron una probabilidad del 65 % de alcanzar MII, lo que representa un 10 % menos en comparación con el grupo BCB[+].

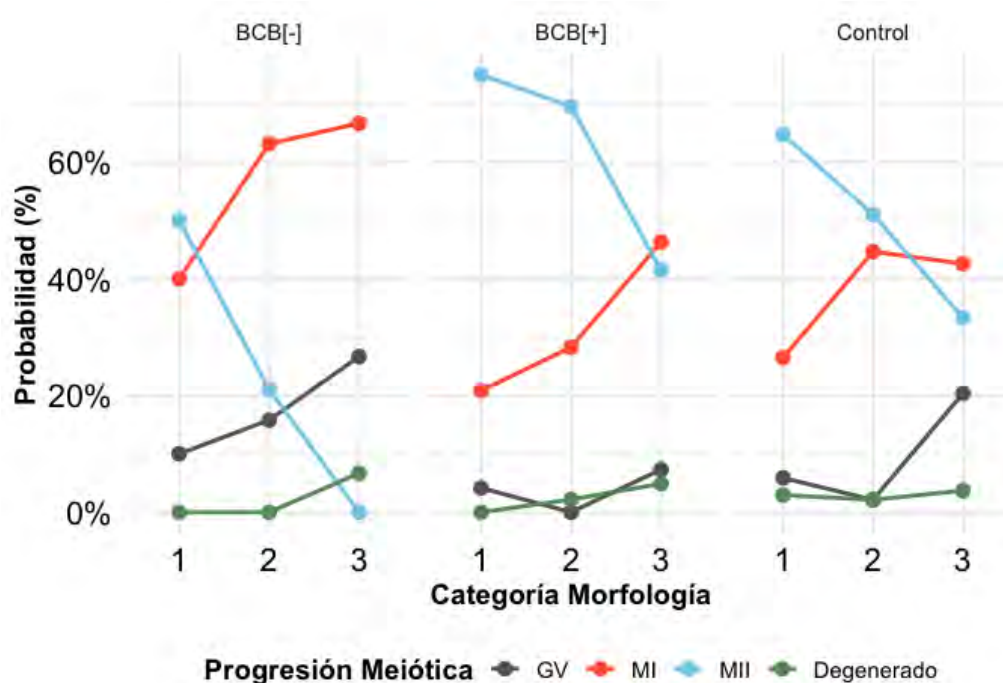


Figura 5. Distribución de probabilidades con ajuste a modelo de regresión logística multinomial con interacción de la variable grupo y categoría morfológica ($p < 0.0001$) sobre la competencia meiótica.

En base a lo anterior, se construyó una curva de predicción sobre la probabilidad de alcanzar la fase MII, la cual respalda los resultados previamente descritos. Se observó que un ovocito clasificado como de categoría 1 y que, además, se identificó como BCB[+], tiene un 77% de probabilidad de llegar a MII, en comparación con el grupo BCB[-] (**Figura 6**)

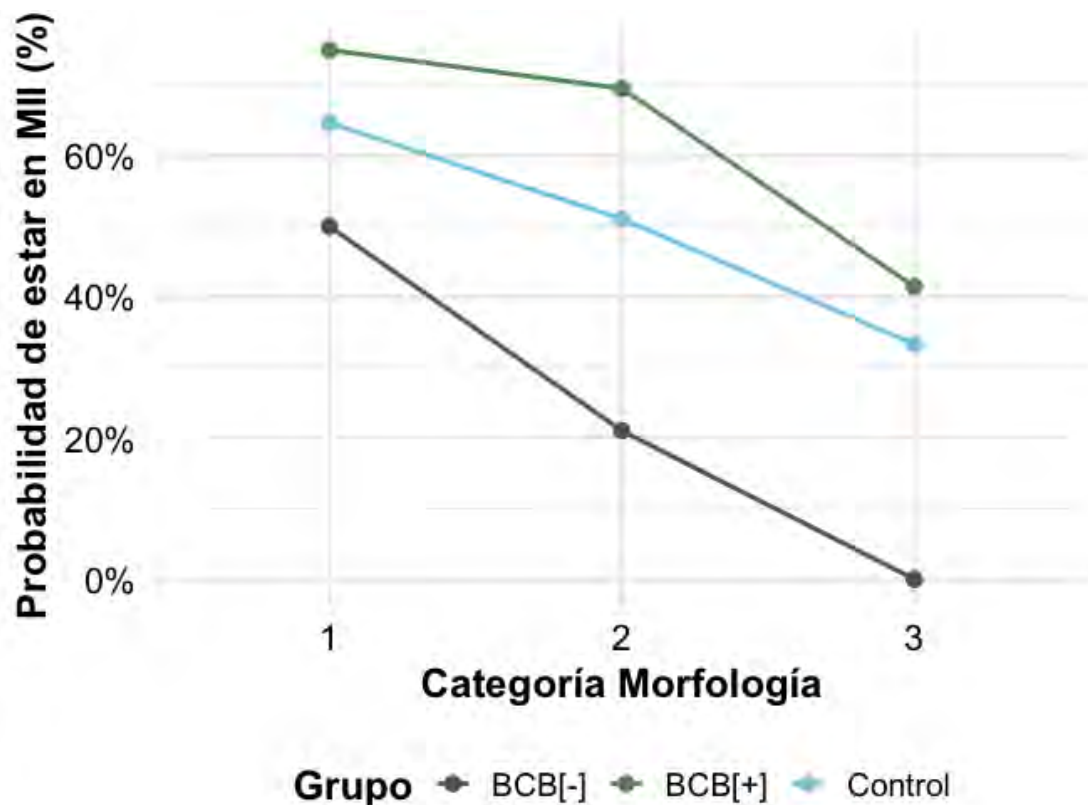


Figura 6. Curva de predicción de llegar a MII en relación a la categoría morfológica y el grupo de ovocitos.

Nuestra hipótesis de trabajo propuso, la evaluación de la determinación de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa influye positivamente sobre la expansión del cumulo y progresión meiótica de ovocitos bovinos madurados *in vitro*. Los resultados del presente estudio evidencian una asociación entre la clasificación de ovocitos a través del azul brillante de cresil, que determina indirectamente la actividad de la G6PDH, y la progresión meiótica de los ovocitos bovinos. Asimismo, se observó una correlación con otros marcadores menos específicos de la maduración ovocitaria, como la expansión del cúmulo. Por lo tanto, nuestra hipótesis de trabajo no se rechaza. Este estudio respalda la utilidad de marcadores biológicos poco invasivos, utilizados rutinariamente para determinar la calidad ovocitaria, y confirma su asociación con la configuración de la cromatina y la competencia meiótica. Inoue *et al.* (2008) señala que los eventos

citoplasmáticos durante la maduración ovocitaria son responsables de la competencia meiótica, mientras que los factores nucleares influyen en la competencia de desarrollo embrionario. El análisis de la configuración de la cromatina se perfila como un marcador biológico relevante de diferenciación y competencia de desarrollo, aunque su estudio requiere el compromiso del material biológico (De La Fuente, 2006; Luciano y Lodde, 2013).

Desde que Ericsson *et al.* (1993) aportó una mejora en la selección de ovocitos porcinos con mayor competencia de desarrollo, el uso de la tinción BCB se ha extendido a varias especies, como cerdos (Wongsrikeao *et al.*, 2006), ovejas (Catalá *et al.*, 2011) y bovinos (Alm *et al.*, 2005). Sin embargo, su difusión y aplicación aún son limitadas debido al aumento en los costos operativos, las modificaciones en los protocolos estándar y la variabilidad en los resultados (Iwasaki *et al.*, 2018). Pawlak *et al.* (2011) demostró en CCO's de cerdas prepúberes una disminución en la proporción de ovocitos que alcanzan la fase MII y un aumento en la incidencia de anomalías cromosómicas en comparación con un grupo control. Se requiere más investigación en esta área para evaluar posibles efectos sobre el ADN, los cambios epigenéticos, la producción y transferencia de embriones tratados previamente con BCB.

V CONCLUSIÓN

Los resultados indican una influencia de la categoría morfológica de CCO's sobre el resultado de la tinción de BCB donde en la categoría morfológica 1 se obtienen más CCO's BCB[+] en comparación con las otras categorías. Así mismo, la exposición de BCB en los CCO's no afecta la progresión meiótica de los ovocitos, incluso la mejora a través de una selección más precisa. Se observó una fuerte asociación entre la categoría morfológica y la selección de CCO's por BCB, por lo que aplicar un esquema de selección ovocitaria mediante marcadores no invasivo incrementa las probabilidades de obtener un ovocito en MII en un 10 %.

VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aardema, H., van Tol, H. T. A., Wubbolts, R. W., Brouwers, J. F. H. M., Gadella, B. M., y Roelen, B. A. J. (2017). Stearoyl-CoA desaturase activity in bovine cumulus cells protects the oocyte against saturated fatty acid stress. *Biology of Reproduction*, 96(5), 982–992.
- Aerts, J. M. J., y Bols, P. E. J. (2010). Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(1). <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01298.x>
- Agarwal, A., Gupta, S., y Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. En *Reproductive Biology and Endocrinology* (Vol. 3). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>
- Aguila, L., Treulen, F., Therrien, J., Felmer, R., Valdivia, M., y Smith, L. C. (2020). Oocyte selection for in vitro embryo production in bovine species: noninvasive approaches for new challenges of oocyte competence. *Animals*, 10(12), 2196.
- Albertini, D. F. (2015). The mammalian oocyte. *Knobil and Neill's Physiology of reproduction*, 4.
- Al-Katanani, Y. M., Webb, D. W., y Hansen, P. J. (1999). Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *Journal of Dairy Science*, 82(12), 2611–2616.
- Alm, H., Torner, H., Löhrke, B., Viergutz, T., Ghoneim, I. M., y Kanitz, W. (2005). Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology*, 63(8), 2194–2205.
- Almansa-Ordóñez, A., Bellido, R., Vassena, R., Barragan, M., y Zambelli, F. (2020). Oxidative stress in reproduction: A mitochondrial perspective. En *Biology* (Vol. 9, Número 9). <https://doi.org/10.3390/biology9090269>
- Araki, Y. (2003). Formation and Structure of Mammalian Ovaries. En D. R. P. Tulsiani (Ed.), *Introduction to Mammalian Reproduction* (pp. 141–153). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0273-9_9

- Assidi, M., y Sirard, M. A. (2013). Cumulus cell gene expression as a marker of oocyte quality. *Oogenesis*, 231–252.
- Báez, F., Camargo, Á. A., y Gastal, G. D. A. (2019). Ultrastructural imaging analysis of the zona pellucida surface in bovine oocytes. *Microscopy and Microanalysis*, 25(4), 1032–1036. <https://doi.org/10.1017/S1431927619000692>
- Banks, W. J. (1986). *Histología veterinaria aplicada*. México, DF: El Manual Moderno,.
- Barcat, J. A. (2003). Orceína y fibras elásticas. *Medicina (Buenos Aires)*, 63(5), 353–356.
- Basso, A. C., y Esper, C. R. (2002). Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 39(6). <https://doi.org/10.1590/s1413-95962002000600007>
- Benavides, F. J., y Guénet, J.-L. (2003). Manual de genética de roedores de laboratorio. *Principios básicos y aplicaciones*, 38.
- Betteridge, K. J. (1981). An historical look at embryo transfer. *Reproduction*, 62(1), 1–13.
- Blondin, P., y Sirard, M. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular reproduction and development*, 41(1), 54–62.
- Boni, R., Cuomo, A., y Tosti, E. (2002). Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. *Biology of Reproduction*, 66(3), 836–842.
- Boucrot, E., y Kirchhausen, T. (2008). Mammalian cells change volume during mitosis. *PLoS ONE*, 3(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001477>
- Bouniol-Baly, C., Hamraoui, L., Guibert, J., Beaujean, N., Szöllösi, M. S., y Debey, P. (1999). Differential Transcriptional Activity Associated with Chromatin Configuration in Fully Grown Mouse Germinal Vesicle Oocytes¹. *Biology of Reproduction*, 60(3), 580–587. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.3.580>

- Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F., y Dressel, M. A. (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of reproduction*, 27(1), 147–158.
- Braw-Tal, R., y Yossefi, S. (1997). Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 109(1). <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1090165>
- Buratini, J., Dellaqua, T. T., Dal Canto, M., y Renzini, M. M. (2020). Oocyte secreted factors regulate FSHR and AMH mRNA levels in cumulus cells. *Fertility and Sterility*, 114(3), e440.
- Camacho de Gutiérrez, A. R., Calisici, O., Wrenzycki, C., Gutiérrez-Añez, J. C., Hoeflich, C., Hoeflich, A., Bajcsy, Á. C., y Schmicke, M. (2024). Effect of IGFBP-4 during In Vitro Maturation on Developmental Competence of Bovine Cumulus Oocyte Complexes. *Animals*, 14(5), 673.
- Carolan, C., Monaghan, P., Gallagher, M., y Gordon, I. (1994). Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro. *Theriogenology*, 41(5), 1061–1068.
- Carroll, J., y Marangos, P. (2013). The DNA damage response in mammalian oocytes. En *Frontiers in Genetics* (Vol. 4, Número JUN). <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00117>
- Castaneda, C. A., Kaye, P., Pantaleon, M., Phillips, N., Norman, S., Fry, R., y Michael, J. D. (2013). Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl blue staining in bovine oocytes. *Theriogenology*, 79(3), 417–422.
- Catalá, M. G., Izquierdo, D., Uzbekova, S., Morató, R., Roura, M., Romaguera, R., Papillier, P., y Paramio, M. T. (2011). Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. *Reproduction*, 142(4), 517.
- Choi, B. H., Bang, J. I., Jin, J. I., Kim, S. S., Jo, H. T., Deb, G. K., Ghanem, N., Cho, K. W., y Kong, I. K. (2013). Coculturing cumulus oocyte complexes with denuded oocytes alters zona pellucida ultrastructure in in vitro matured

- bovine oocytes. *Theriogenology*, 80(9), 1117–1123.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.015>
- Choi, Y. H., Carnevale, E. M., Seidel Jr, G. E., y Squires, E. L. (2001). Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology*, 56(4), 661–670.
- Choudhary, K. K., Kavya, K. M., Jerome, A., y Sharma, R. K. (2016). Advances in reproductive biotechnologies. *Veterinary world*, 9(4), 388.
- Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de León, F. A., y Robl, J. M. (1998). Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280(5367), 1256–1258.
- Collier, R. J., Hall, L. W., Rungruang, S., y Zimbleman, R. B. (2012). Quantifying heat stress and its impact on metabolism and performance. *Department of Animal Sciences University of Arizona*, 68(1), 1–11.
- Collins, J. K., Lane, S. I. R., Merriman, J. A., y Jones, K. T. (2015). DNA damage induces a meiotic arrest in mouse oocytes mediated by the spindle assembly checkpoint. *Nature Communications*, 6.
<https://doi.org/10.1038/ncomms9553>
- Conti, M., y Franciosi, F. (2018). Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: Integrated nuclear and cytoplasmic events. En *Human Reproduction Update* (Vol. 24, Número 3).
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmx040>
- Cran, D. G., y Moor, R. M. (1980). The development of oocytes and ovarian follicles of mammals. *Science Progress (1933-)*, 371–383.
<https://www.jstor.org/stable/43420509>
- Da Silva-Buttkus, P., Jayasooriya, G. S., Mora, J. M., Mobberley, M., Ryder, T. A., Baithun, M., Stark, J., Franks, S., y Hardy, K. (2008). Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary. *Journal of Cell Science*, 121(23). <https://doi.org/10.1242/jcs.036400>
- De Bem, T. H. C., Adona, P. R., Bressan, F. F., Mesquita, L. G., Chiaratti, M. R., Meirelles, F. V., y Leal, C. L. V. (2014). The influence of morphology, follicle

- size and Bcl-2 and Bax transcripts on the developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(4), 576–583.
- De La Fuente, R. (2006). Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. En *Developmental Biology* (Vol. 292, Número 1, pp. 1–12). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.01.008>
- De Loos, F. A. M., Bevers, M. M., Dieleman, S. J., y Kruip, T. A. M. (1991). Morphology of preovulatory bovine follicles as related to oocyte maturation. *Theriogenology*, 35(3), 527–535.
- De Loos, F., Kastrop, P., Van Maurik, P., Van Beneden, T. H., y Kruip, T. A. M. (1991). Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Molecular reproduction and development*, 28(3), 255–259.
- De Loos, F., Van Vliet, C., van Maurik, P. V. y Kruip, T. A. M. (1989). Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete research*, 24(2), 197–204.
- Dieci, C., Lodde, V., Labreque, R., Dufort, I., Tessaro, I., Sirard, M. A., y Luciano, A. M. (2016). Differences in cumulus cell gene expression indicate the benefit of a pre-maturation step to improve in-vitro bovine embryo production. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 1–16.
- Dieleman, S. J., Hendriksen, P. J. M., Viuff, D., Thomsen, P. D., Hyttel, P., Knijn, H. M., Wrenzycki, C., Kruip, T. A. M., Niemann, H., y Gadella, B. M. (2002). Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology*, 57(1), 5–20.
- Doležel, J., Bartoš, J., Voglmayr, H., y Greilhuber, J. (2003). *Nuclear DNA content and genome size of trout and human*.
- Downs, S. M. (1993). Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology*, 39(1), 65–79.
- Ericsson, S. A., Boice, M. L., Funahashi, H., y Day, B. N. (1993). Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue. *Theriogenology*, 39(1), 214.

- Estrella, C. A., Suconota, A. G. y Ayala, L. E. (2013). Evaluación de la calidad de ovocitos bovinos obtenidos de folículos con tres tamaños diferentes. *Maskana, producción animal*, 8:101-103.
- Fair, T. (2009). Mammalian oocyte development: checkpoints for competence. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(1), 13–20. <https://doi.org/10.1071/RD09216>
- Fair, T., Hulshof, S. C. J., Hyttel, P., Greve, T., y Boland, M. (1997). Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*, 195(4). <https://doi.org/10.1007/s004290050052>
- Fair, T., y Lonergan, P. (2024). The oocyte: the key player in the success of assisted reproduction technologies. En *Reproduction, Fertility and Development* (Vol. 36, Números 1–2). <https://doi.org/10.1071/RD23164>
- Fass. (1999). Guide for the care and use of agricultural animals in agricultural research and teaching. En *Fed. Anim. Sci. Soc.*,.
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., y Ross, P. J. (2020). Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991–1004.
- Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., y Navarro, P. A. A. S. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71(5). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.023>
- Filipiak, Y., y Larocca, C. (2012). Biotecnología en reproducción bovina. *Montevideo: MEAAP-UDELAR*.
- Freeman, B. (2003). The active migration of germ cells in the embryos of mice and men is a myth. En *Reproduction* (Vol. 125, Número 5). <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250635>
- Fu, B., Ren, L., Liu, D., Ma, J. Z., An, T. Z., Yang, X. Q., Ma, H., Zhang, D. J., Guo, Z. H., y Guo, Y. Y. (2015). Subcellular characterization of porcine oocytes with different glucose-6-phosphate dehydrogenase activities. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 28(12), 1703.

- Gandolfi, F., Luciano, A. M., Modina, S., Ponzini, A., Pocar, P., Armstrong, D. T., y Lauria, A. (1997). The in vitro developmental competence of bovine oocytes can be related to the morphology of the ovary. *Theriogenology*, 48(7), 1153–1160.
- García, G. M., Parral, R. A. M., y Corral, J. A. R. (1998). *Los climas de México: una estratificación ambiental basada en el componente climático*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
- García Monterde, J., y Gil Cano, F. (2013). *Embriología veterinaria: un enfoque dinámico del desarrollo animal*. Buenos Aires: Inter-Médica,.
- Ghica, M. E., y Brett, C. M. A. (2009). Poly (brilliant cresyl blue) modified glassy carbon electrodes: Electrosynthesis, characterisation and application in biosensors. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 629(1–2), 35–42.
- Ghoneimy M, K., El-Naby, A., Youssef, Y., y El-Roos, A. (2017). Impact of using brilliant cresyl blue stain on oocyte and embryo selection. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*, 48(1), 43–51.
- Gosden, R., Krapez, J., y Briggs, D. (1997). Growth and development of the mammalian oocyte. *Bioessays*, 19(10), 875–882.
- Hafez, E. S. E., y Hafez, B. (2013). *Reproduction in farm animals*. John Wiley & Sons.
- Hafez, Y. M. (2015). *Assisted reproductive technologies in farm animals. ICMALPS, Alexandria University, Egypt*.
- Hagemann, L. J., Beaumont, S. E., Berg, M., Donnison, M. J., Ledgard, A., Peterson, A. J., Schurmann, A., y Tervit, H. R. (1999). Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 53(4), 451–458.
- Hajarian, H., Shahsavari, M. H., Karami-Shabankareh, H., y Dashtizad, M. (2016). The presence of corpus luteum may have a negative impact on in vitro developmental competency of bovine oocytes. *Reproductive Biology*, 16(1), 47–52.

- Hansen, P. J. (2014). Current and future assisted reproductive technologies for mammalian farm animals. *Current and future reproductive technologies and world food production*, 1–22.
- Hansen, P. J. (2020). Implications of assisted reproductive technologies for pregnancy outcomes in mammals. *Annual review of animal biosciences*, 8(1), 395–413.
- Hartman, C. G., Lewis, W. H., Miller, F. W., y Swett, W. W. (1931). First findings of tubal ova in the cow, together with notes on oestrus. *The Anatomical Record*, 48(2), 267–275.
- Hewitt, D. A., Watson, P. F., y England, G. C. W. (1998). Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology*, 49(6), 1083–1101.
- Hopper, R. M. (2021). *Bovine reproduction*. John Wiley & Sons.
- Hulshof, S. C. J., Figueiredo, J. R., Beckers, J.-F., Bevers, M. M., y Van Den Hurk, R. (1994). Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Veterinary Quarterly*, 16(2), 78–80.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., y Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47(1). [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(96\)00336-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00336-6)
- Hyttel, P., Greve, T., y Callesen, H. (1989). Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 38, 35–47.
- INEGI. (2021). *Aspectos Geográficos Coahuila de Zaragoza*. https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/areasgeograficas/resumen/resumen_05.pdf
- Inoue, A., Nakajima, R., Nagata, M., y Aoki, F. (2008). Contribution of the oocyte nucleus and cytoplasm to the determination of meiotic and developmental competence in mice. *Human reproduction*, 23(6), 1377–1384.
- Iritani, A., Utsumi, K., Miyake, M., Hosoi, Y., y Saeki, K. (1988). *In vitro fertilization by a routine method and by micromanipulation*.

- Ivanoff, E. I. (1922). On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. *The Journal of Agricultural Science*, 12(3), 244–256.
- Iwasaki, W., Yamanaka, K., Sugiyama, D., Teshima, Y., Briones-Nagata, M. P., Maeki, M., Yamashita, K., Takahashi, M., y Miyazaki, M. (2018). Simple separation of good quality bovine oocytes using a microfluidic device. *Scientific reports*, 8(1), 14273.
- Jiang, Y., He, Y., Pan, X., Wang, P., Yuan, X., y Ma, B. (2023). Advances in oocyte maturation in vivo and in vitro in mammals. *International journal of molecular sciences*, 24(10), 9059.
- Kacinskis, M. Á., Lucci, C. M., Luque, M. C. A., y Bao, S. N. (2005). Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, 87(1–2).
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.09.003>
- Kim, Y., Kim, E. Y., Seo, Y. M., Yoon, T. K., Lee, W.-S., y Lee, K. A. (2012). Function of the pentose phosphate pathway and its key enzyme, transketolase, in the regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Clinical and experimental reproductive medicine*, 39(2), 58.
- Kok, A., Chen, J., Kemp, B., y Van Knegsel, A. T. M. (2019). Review: Dry period length in dairy cows and consequences for metabolism and welfare and customised management strategies. *Animal*, 13(S1).
<https://doi.org/10.1017/S1751731119001174>
- K-state. (2018). *Electronic lab manual, cytogenetic techniques* . https://www.k-state.edu/wgrc/electronic_lab/aceto_orc_stain.html
- Langbeen, A., Jorssen, E. P. A., Fransen, E., Rodriguez, A. P. A., Chong Garcıa, M., Leroy, J. L. M. R., y Bols, P. E. J. (2015). Characterization of freshly retrieved preantral follicles using a low-invasive, mechanical isolation method extended to different ruminant species. *Zygote*, 23(5).
<https://doi.org/10.1017/S0967199414000331>
- Lee, S., Kang, H. G., Jeong, P. S., Nanjidsuren, T., Song, B. S., Jin, Y. B., Lee, S. R., Kim, S. U., y Sim, B. W. (2020). Effect of oocyte quality assessed by brilliant cresyl blue (BCB) staining on cumulus cell expansion and sonic

- hedgehog signaling in porcine during in vitro maturation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4423.
- Lille, R. D., y Conn, H. J. (1969). Biological stains. *Baltimore: Williams and Wilkins Company*.
- Lima, P. F., Ormond, C. M., Caixeta, E. S., Barros, R. G., Price, C. A., y Buratini, J. (2016). Effect of kit ligand on natriuretic peptide precursor C and oocyte maturation in cattle. *Reproduction*, 152(5), 481–489.
- Lodde, V., Luciano, A. M., Franciosi, F., Labrecque, R., y Sirard, M. A. (2017). Accumulation of chromatin remodelling enzyme and histone transcripts in bovine oocytes. *Oocytes: Maternal Information and Functions*, 223–255.
- Lodde, V., Modina, S., Maddox-Hyttel, P., Franciosi, F., Lauria, A., y Luciano, A. M. (2008). Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 75(5), 915–924.
- Lonergan, P., y Fair, T. (2016). Maturation of oocytes in vitro. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4(1), 255–268.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M. P., y Gordon, I. (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular reproduction and development*, 37(1), 48–53.
- Lucci, C. M., Rumpf, R., Figueiredo, J. R., y Bao, S. N. (2002). Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: Morphological characterization and development of an efficient isolation method. *Theriogenology*, 57(5).
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00641-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00641-6)
- Luciano, A. M., y Lodde, V. (2013). Changes of large-scale chromatin configuration during mammalian oocyte differentiation. *Oogenesis*, 93–108.
- Lussier, J. G., Matton, P., y Dufour, J. J. (1987). Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, 81(2).
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0810301>

- Macaulay, A. D., Gilbert, I., Scantland, S., Fournier, E., Ashkar, F., Bastien, A., Saadi, H. A. S., Gagné, D., Sirard, M.-A., y Khandjian, É. W. (2016). Cumulus cell transcripts transit to the bovine oocyte in preparation for maturation. *Biology of reproduction*, *94*(1), 11–16.
- Mangia, F., y Epstein, C. J. (1975). Biochemical studies of growing mouse oocytes: preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. *Developmental Biology*, *45*(2), 211–220.
- Manjunatha, B. M., Gupta, P. S. P., Ravindra, J. P., Devaraj, M., Ramesh, H. S., y Nandi, S. (2007). In vitro developmental competence of buffalo oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology*, *68*(6), 882–888.
- Mapletoft, R. J., y Hasler, J. F. (2005). Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, *24*(1), 393.
- Mapletoft, R. J., Steward, K. B., y Adams, G. P. (2002). Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, *42*(6), 601–611.
- Marangos, P., Stevense, M., Niaka, K., Lagoudaki, M., Nabti, I., Jessberger, R., y Carroll, J. (2015). DNA damage-induced metaphase i arrest is mediated by the spindle assembly checkpoint and maternal age. *Nature Communications*, *6*. <https://doi.org/10.1038/ncomms9706>
- Marc-Zarcula, S., Cernescu, H., Markowsky, A., Nica, N., Tulcan, C., Bonca, G., Ardelean, V., Godja, G., Mircu, C., y Patraş, I. (2015). *Some aspects regarding in vitro maturation of bovine oocytes*.
- Marei, W. F. A., De Bie, J., Mohey-Elsaeed, O., Wydooghe, E., Bols, P. E. J., y Leroy, J. L. M. R. (2017). Alpha-linolenic acid protects the developmental capacity of bovine cumulus–oocyte complexes matured under lipotoxic conditions in vitro. *Biology of reproduction*, *96*(6), 1181–1196.

- Matzuk, M. M., Burns, K. H., Viveiros, M. M., y Eppig, J. J. (2002). Intercellular communication in the mammalian ovary: Oocytes carry the conversation. En *Science* (Vol. 296, Número 5576). <https://doi.org/10.1126/science.1071965>
- Mehlmann, L. M. (2013). Signaling for meiotic resumption in granulosa cells, cumulus cells, and oocyte. En *Oogenesis*. https://doi.org/10.1007/978-0-85729-826-3_12
- Morales-Cruz, J. L., Calderon-Leyva, G., Angel-García, O., Guillen-Muñoz, J. M., Santos-Jimenez, Z., Mellado, M., Pessoa, L. G., y Guerrero-Gallego, H. Z. (2023). The Effect of Month of Harvesting and Temperature–Humidity Index on the Number and Quality of Oocytes and In Vitro Embryo Production in Holstein Cows and Heifers. *Biology*, 12(9), 1174.
- Morbeck, D. E., Esbenshade, K. L., Flowers, W. L., y Britt, J. H. (1992). Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biology of Reproduction*, 47(3). <https://doi.org/10.1095/biolreprod47.3.485>
- Motta, P. M., Nottola, S. A., Familiari, G., Makabe, S., Stallone, T., y Macchiarelli, G. (2002). Morphodynamics of the follicular-luteal complex during early ovarian development and reproductive life. En *International Review of Cytology* (Vol. 223). [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)23004-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)23004-8)
- Moussa, M., Shu, J., Zhang, X. H., y Zeng, F. (2015). Maternal control of oocyte quality in cattle “a review”. *Animal reproduction science*, 155, 11–27.
- Murasawa, M., Takahashi, T., Nishimoto, H., Yamamoto, S., Hamano, S., y Tetsuka, M. (2005). Relationship between ovarian weight and follicular population in heifers. *Journal of Reproduction and Development*, 51(5). <https://doi.org/10.1262/jrd.17014>
- Nevoral, J., Orsák, M., Klein, P., Petr, J., Dvořáková, M., Weingartová, I., Vyskočilová, A., Zámotná, K., Krejčová, T., y Jílek, F. (2015). Cumulus cell expansion, its role in oocyte biology and perspectives of measurement: a review. *Sci Agric Bohem*, 45, 212–225.
- Nom Norma Oficial Mexicana. (1999). *Nom-062-Zoo 1999*. <https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>

- Oktem, O., y Oktay, K. (2008). The ovary: Anatomy and function throughout human life. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1127. <https://doi.org/10.1196/annals.1434.009>
- Palma, G. A. (2001). Producción in vitro de embriones bovinos. *Biotecnología de la Reproducción. Buenos Aires: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)*, 225–294.
- Palma, G. A., Argañaraz, M. E., Barrera, A. D., Rodler, D., Mutto, A. Á., y Sinowatz, F. (2012). Biology and biotechnology of follicle development. En *The Scientific World Journal* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1100/2012/938138>
- Paulini, F., Silva, R. C., De Paula Rôlo, J. L. J., y Lucci, C. M. (2014). Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. En *Journal of Ovarian Research* (Vol. 7, Número 1). <https://doi.org/10.1186/s13048-014-0102-6>
- Pawlak, P., Pers-Kamczyc, E., Renska, N., Kubickova, S., y Lechniak, D. (2011). Disturbances of nuclear maturation in BCB positive oocytes collected from peri-pubertal gilts. *Theriogenology*, 75(5), 832–840.
- Pawlak, P., Warzych, E., Chabowska, A., y Lechniak, D. (2014). Differences in cytoplasmic maturation between the BCB+ and control porcine oocytes do not justify application of the BCB test for a standard IVM protocol. *Journal of Reproduction and Development*, 60(1), 28–36.
- Perea, F., Quezada, A., Mocha, A., Argudo, G., Ayala, L., Mendez, Ssoria, M. E., Galarza, A. L. R. y Hernández, F. H. J. (2017). Efecto de la presión de vacío sobre las características funcionales de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero. *Maskana, producción animal*, 8(2): 69-71.
- Picton, H. M. (2001). Activation of follicle development: The primordial follicle. *Theriogenology*, 55(6). [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00478-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00478-2)
- Pieterse, M. C., Vos, P., Kruij, T. A. M., Willemse, A. H., y Taverne, M. A. M. (1991). Characteristics of bovine estrous cycles during repeated transvaginal, ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum pick-up. *Theriogenology*, 35(2), 401–413.

- Pollard, J. W., y Leibo, S. P. (1994). Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*, 41(1), 101–106.
- Ponsart, C., y Pozzi, N. (2018). Sanitary requirements for bovine gametes and embryos in international trade. *Animal Reproduction (AR)*, 10(3), 283–296.
- Prentice-Biensch, J. R., Singh, J., Alfoteisy, B., y Anzar, M. (2012). A simple and high-throughput method to assess maturation status of bovine oocytes: comparison of anti-lamin A/C-DAPI with an aceto-orcein staining technique. *Theriogenology*, 78(7), 1633–1638.
- Pujol, M., López-Béjar, M., y Paramio, M.-T. (2004). Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*, 61(4), 735–744.
- Qamar, A. Y., Khan, A. U., Jamil, A., y Abubakar, M. (2015). Biotechnology and animal reproduction. En *The Role of Biotechnology in Improvement of Livestock: Animal Health and Biotechnology* (pp. 1–26). Springer.
- Quezada-Casasola, A., Martínez-Armendáriz, K. E., Itzá-Ortiz, M. F., Escárcega-Ávila, A. M., Pérez-Eguía, E., Filipiak, Y., Larocca, C., y Carrera-Chávez, 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.
- Raes, A., Azari-Dolatabad, N., Athanasiou, G., Sadeghi, H., Andueza, S. G., Arcos, J. L., Cerquides, J., Pavani, K. C., Opsomer, G., y Pascottini, O. B. (2023). *Measuring cumulus expansion of mammalian oocytes: comparing the reliability of methods and how artificial intelligence could automate the measurement*.
- Rastani, R. R., Grummer, R. R., Bertics, S. J., Gümen, A., Wiltbank, M. C., Mashek, D. G., y Schwab, M. C. (2005). Reducing dry period length to simplify feeding transition cows: milk production, energy balance, and metabolic profiles. *Journal of dairy science*, 88(3), 1004–1014.
- Regassa, A., Rings, F., Hoelker, M., Cinar, U., Tholen, E., Looft, C., Schellander, K., y Tesfaye, D. (2011). Transcriptome dynamics and molecular cross-talk

- between bovine oocyte and its companion cumulus cells. *BMC genomics*, 12(1), 1–20.
- Rémillard-Labrosse, G., Dean, N. L., Allais, A., Mihajlović, A. I., Jin, S. G., Son, W. Y., Chung, J. T., Pansera, M., Henderson, S., Mahfoudh, A., Steiner, N., Agapitou, K., Marangos, P., Buckett, W., Ligeti-Ruiter, J., y FitzHarris, G. (2020). Human oocytes harboring damaged DNA can complete meiosis I. *Fertility and Sterility*, 113(5). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.12.029>
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P. A. T., Boland, M. P., y Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular reproduction and development*, 61(2), 234–248.
- Rodgers, R. J., y Irving-Rodgers, H. F. (2010). Morphological classification of bovine ovarian follicles. En *Reproduction* (Vol. 139, Número 2). <https://doi.org/10.1530/REP-09-0177>
- Rodriguez-Venegas, R., Meza-Herrera, C. A., Robles-Trillo, P. A., Angel-Garcia, O., Legarreta-Gonzalez, M. A., Sánchez-Vocanegra, H. F., y Rodriguez-Martinez, R. (2023). Effect of THI on milk production, percentage of milking cows, and time lying in Holstein cows in northern-arid Mexico. *Animals*, 13(10), 1715.
- Rodriguez-Venegas, R., Meza-Herrera, C. A., Robles-Trillo, P. A., Angel-Garcia, O., Rivas-Madero, J. S., y Rodriguez-Martínez, R. (2022). Heat 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.
- Roeder, G. S. (1997). Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes & development*, 11(20), 2600–2621.
- Rosenblatt, J. (2008). Mitosis: Moesin and the Importance of Being Round. En *Current Biology* (Vol. 18, Número 7). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.02.013>
- Roth, Z. (2017). Effect of heat stress on reproduction in dairy cows: insights into the cellular and molecular responses of the oocyte. *Annual review of animal*

- biosciences*, 5, 151–170. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022849>
- Roth, Z. (2020). Reproductive physiology and endocrinology responses of cows exposed to environmental heat stress-Experiences from the past and lessons for the present. *Theriogenology*, 155, 150–156.
- Roth, Z., Arav, A., Bor, A., Zeron, Y., Braw-Tal, R., y Wolfenson, D. (2001). Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction-cambridge-*, 122(5), 737–744.
- Rüsse, I., y Sinowatz, F. (1991). *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*.
- Samaniego, J., Ayala, L., Nieto, P., Rodas, R., Vázquez, J., Murillo, Y. A., Dután, J., Calle, G., Argudo, D., y Perea, F. (2017). Competencia del ovocito bovino obtenido por Ovum pick-up valorado mediante el azul brillante de Cresilo. *Maskana*, 8, 77–80.
- Satrio, F. A., Karja, N. W. K., Setiadi, M. A., Kaiin, E. M., Gunawan, M., Memili, E., y Purwantara, B. (2022). Improved maturation rate of bovine oocytes following sericin supplementation in collection and maturation media. *Tropical Animal Science Journal*, 45(1), 24–29.
- Scaramuzzi, R. J., Baird, D. T., Campbell, B. K., Driancourt, M. A., Dupont, J., Fortune, J. E., Gilchrist, R. B., Martin, G. B., McNatty, K. P., y McNeilly, A. S. (2011). Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(3), 444–467. <https://doi.org/10.1071/RD09161>
- Segerson, E. C., Hansen, T. R., Libby, D. W., Randel, R. D., y Getz, W. R. (1984). Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. *Journal of animal science*, 59(4). <https://doi.org/10.2527/jas1984.5941026x>
- SENASICA. (2024, mayo 17). *Directorio de establecimientos TIF* . Servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/916689/DIRECTORIO_TIF_17-05-2024.pdf

- Senbon, S., Ota, A., Tachibana, M., y Miyano, T. (2003). Bovine oocytes in secondary follicles grow and acquire meiotic competence in severe combined immunodeficient mice. *Zygote*, 11(2), 139–149.
- Senger, P. L. (2012). Pathways To Pregnancy y Parturition. En *AJN, American Journal of Nursing* (Vol. 76, Número 5).
- Silva, D. S., Rodriguez, P., Galuppo, A., Arruda, N. S., y Rodrigues, J. L. (2013). Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. *Zygote*, 21(3), 250–255.
- Silva-Santos, K. C., Santos, G. M. G., Siloto, L. S., Hertel, M. F., Andrade, E. R., Rubin, M. I. B., Sturion, L., Melo-Sterza, F. A., y Seneda, M. M. (2011). Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*, 76(6). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.008>
- Strączyńska, P., Papis, K., Morawiec, E., Czerwiński, M., Gajewski, Z., Olejek, A., y Bednarska-Czerwińska, A. (2022). Signaling mechanisms and their regulation during in vivo or in vitro maturation of mammalian oocytes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 20(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s12958-022-00906-5>
- Suebthawinkul, C., Babayev, E., Zhou, L. T., Lee, H. C., y Duncan, F. E. (2022). Quantitative morphokinetic parameters identify novel dynamics of oocyte meiotic maturation and cumulus expansion. *Biology of reproduction*, 107(4), 1097–1112.
- Sun, S. C., y Kim, N. H. (2013). Molecular mechanisms of asymmetric division in oocytes. *Microscopy and Microanalysis*, 19(4). <https://doi.org/10.1017/S1431927613001566>
- Sutton-McDowall, M. L., Gilchrist, R. B., y Thompson, J. G. (2010). The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. En *Reproduction* (Vol. 139, Número 4). <https://doi.org/10.1530/REP-09-0345>

- Tirone, E., Siracusa, G., Hascall, V. C., Frajese, G., y Salustri, A. (1993). Oocytes preserve the ability of mouse cumulus cells in culture to synthesize hyaluronic acid and dermatan sulfate. *Developmental biology*, 160(2), 405–412.
- Torner, H., Ghanem, N., Ambros, C., Hölker, M., Tomek, W., Phatsara, C., Alm, H., Sirard, M.-A., Kanitz, W., y Schellander, K. (2008). Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Reproduction (Cambridge, England)*, 135(2), 197–212.
- Tukur, H. A., Aljumaah, R. S., Swelum, A. A.-A., Alowaimer, A. N., y Saadeldin, I. M. (2020). The Making of a Competent Oocyte – A Review of Oocyte Development and Its Regulation. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 35(1). <https://doi.org/10.12750/jarb.35.1.2>
- Turathum, B., Gao, E.-M., y Chian, R.-C. (2021). The function of cumulus cells in oocyte growth and maturation and in subsequent ovulation and fertilization. *Cells*, 10(9), 2292.
- Turhan, A., Pereira, M. T., Schuler, G., Bleul, U., y Kowalewski, M. P. (2021). Hypoxia-inducible factor (HIF1alpha) inhibition modulates cumulus cell function and affects bovine oocyte maturation in vitro. *Biology of reproduction*, 104(2), 479–491.
- Turnbull, K. E., Braden, A. W. H., y Mattner, P. E. (1977). The Pattern of Follicular Growth and Atresia in the Ovine Ovary. *Australian Journal of Biological Sciences*, 30(3). <https://doi.org/10.1071/BI9770229>
- Uyar, A., Torrealday, S., y Seli, E. (2013). Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertility and sterility*, 99(4), 979–997.
- Van Den Hurk, R., y Zhao, J. (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63(6). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.005>
- Van Hoeck, V., Bols, P. E. J., Binelli, M., y Leroy, J. L. M. R. (2014). Reduced oocyte and embryo quality in response to elevated non-esterified fatty acid concentrations: A possible pathway to subfertility? *Animal Reproduction Science*, 149(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.07.015>

- van Kneegsel, A. T. M., van der Drift, S. G. A., Čermáková, J., y Kemp, B. (2013). Effects of shortening the dry period of dairy cows on milk production, energy balance, health, and fertility: A systematic review. *The Veterinary Journal*, 198(3), 707–713.
- Vargas Reyes, J. N., y Chacón Jaramillo, L. (2016). Cryopreservation method and composition of the vitrification solution affect viability of in vitro bovine embryos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 29(2), 130–137.
- Walker, B. N., Nix, J., Wilson, C., Marrella, M. A., Speckhart, S. L., Wooldridge, L., Yen, C.-N., Bodmer, J. S., Kirkpatrick, L. T., y Moorey, S. E. (2022). Tight gene co-expression in BCB positive cattle oocytes and their surrounding cumulus cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 20(1), 119.
- Wang, L., Xu, Z., Khawar, M. B., Liu, C., y Li, W. (2017). The histone codes for meiosis. *Reproduction*, 154(3), R65–R79.
- Wang, Z., Yu, S., y Xu, Z. (2007). Effects of collection methods on recovery efficiency, maturation rate and subsequent embryonic developmental competence of oocytes in holstein cow. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 20(4), 496–500.
- Weinberg, J. M. (2006). Lipotoxicity. *Kidney international*, 70(9), 1560–1566.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., y Campbell, K. H. S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619), 810–813.
- Wolfenson, D., Thatcher, W. W., Badinga, L., Savio, J. D., Meidan, R., Lew, B. J., Braw-Tal, R., y Berman, A. (1995). Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biology of Reproduction*, 52(5), 1106–1113.
- Wongsrikeao, P., Otoi, T., Yamasaki, H., Agung, B., Taniguchi, M., Naoi, H., Shimizu, R., y Nagai, T. (2006). Effects of single and double exposure to brilliant cresyl blue on the selection of porcine oocytes for in vitro production of embryos. *Theriogenology*, 66(2), 366–372.

- Wrobel, K. H., y Süß, F. (1998). Identification and temporospatial distribution of bovine primordial germ cells prior to gonadal sexual differentiation. *Anatomy and Embryology*, 197(6). <https://doi.org/10.1007/s004290050156>
- Wu, Y.-G., Liu, Y., Zhou, P., Lan, G.-C., Han, D., Miao, D.-Q., y Tan, J.-H. (2007). Selection of oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. *Cell research*, 17(8), 722–731.
- Yang, M. (2023). Oocyte may be a promising target for the study of reproductive biology and medicine. *Medical Hypotheses*, 177, 111107.
- Yang, M. Y., y Fortune, J. E. (2008). The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biology of Reproduction*, 78(6). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.066688>
- Zhang, M., Su, Y.-Q., Sugiura, K., Xia, G., y Eppig, J. J. (2010). Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science*, 330(6002), 366–369.
- Zickler, D., y Kleckner, N. (2015). Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(6), a016626.
- Zimin, A. V., Delcher, A. L., Florea, L., Kelley, D. R., Schatz, M. C., Puiu, D., Hanrahan, F., Pertea, G., Van Tassell, C. P., y Sonstegard, T. S. (2009). A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome biology*, 10, 1–10.